

**DESARROLLO DE VECTORES
LENTIVIRALES PARA TERAPIA GÉNICA DEL
SÍNDROME DE HIPER-IgM LIGADO AL
CROMOSOMA X (X-HIGM1)**

ZULEMA ROMERO GARCÍA

GRANADA, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Zulema Romero García
D.L.: GR 2286-2009
ISBN: 978-84-692-3084-8

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	...6
1.- INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS	...8
1.a. Generalidades: tratamientos actuales	...9
1.b. Situación actual de la terapia génica	...12
1.c. Terapia génica de inmunodeficiencias primarias	...15
1.c.1. Logros actuales de la terapia génica en las inmunodeficiencias primarias	...15
1.c.2. Vectores usados en la terapia génica de inmunodeficiencias primarias	...20
2.- SÍNDROME DE HIPER IgM LIGADO AL CROMOSOMA X	...21
2.a. Generalidades	...21
2.b. Gen de <i>CD40L</i>	...23
2.c. Proteína CD40L	...24
2.d. Promotor de <i>CD40L</i>	...26
3.- TERAPIA GÉNICA	...28
3.a. Vectores de transferencia	...29
3.b. Vectores integrativos: gamma-retrovirus y lentivirus	...30
4.- VECTORES LENTIVIRALES	...31
4.a. Vectores lentivirales basados en el HIV-1	...31
4.b. Mejora de vectores lentivirales	...32
4.b.1. Vectores auto-inactivables (SIN: <i>self-inactivating vectors</i>)	...32
4.b.2. Aisladores	...33
4.b.3. Sitios de poliadenilación	...34
4.b.4. Modificación del promotor	...34
5.- SEGURIDAD BIOLÓGICA DE LA TERAPIA GÉNICA APLICADA A LAS INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS	...36
5.a. Genotoxicidad	...36
5.b. Expresión ectópica	...37
6.- TERAPIA GENICA DE X-HIGM1	...38
6.a. Modelos experimentales para terapia génica de X-HIGM1	...38
6.a.1. Modelo celular	...38

6.a.2. Modelo animal	...39
6.b. Antecedentes de la terapia génica en X-HIGM1	...40
OBJETIVOS	...43
MATERIAL Y MÉTODOS	...47
1.- LÍNEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO	...49
2.- PLÁSMIDOS	...49
3.- PRODUCCIÓN DE VECTORES	...50
4.- TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS	...51
5.- TITULACIÓN DE LOS VECTORES	...51
6.- PREPARACIÓN DE ADN Y PCR CUANTITATIVA	...52
7.- INMUNODETECCIÓN Y CITOMETRÍA DE FLUJO	...53
8.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR <i>CD40L</i> MEDIANTE ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE <i>eGFP</i> POR CITOMETRÍA DE FLUJO	...54
9.- ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T CON PMA E IONOMICINA	...55
10.- ENSAYO DE RESCATE FENOTÍPICO	...55
10.a. Proliferación de células B	...55
RESULTADOS	...57
1.- CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES LENTIVIRALES	...59
2.- EL VECTOR S-<i>CD40L</i> EXPRESA EL TRANSGÉN <i>CD40L</i> DE FORMA CONSTITUTIVA	...63
3.- LA EXPRESIÓN DE <i>CD40L</i> A TRAVÉS DEL PROMOTOR DE <i>Was</i> ESTÁ RESTRINGIDA A CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS	...66
4.- LOS VECTORES LENTIVIRALES DIRIGIDOS POR EL PROMOTOR DE <i>CD40L</i> SIGUEN UN PATRÓN FISIOLÓGICO	...68
4.a. El fragmento del promotor <i>CD40L</i> contenido en el vector Lentiviral <i>pCD40L-GFP</i> expresa <i>eGFP</i> siguiendo el mismo patrón que el <i>CD40L</i> endógeno	...68

4.a.1. El vector <i>pCD40L</i> -GFP se expresa preferentemente en líneas celulares CD40L ⁺	...69
4.a.2. La expresión de eGFP conseguida por el vector <i>pCD40L</i> -GFP es inducible por activación celular	...69
4.b. El vector <i>pCD40L</i> -CD40L expresa <i>CD40L</i> siguiendo un patrón fisiológico	...74
4.b.1. La expresión de <i>CD40L</i> a través del vector <i>pCD40L</i> -CD40L es residual en células hematopoyéticas no activadas	...74
4.b.2. La expresión de <i>CD40L</i> dirigida por el vector <i>pCD40L</i> -CD40L es inducible en células T	...77
5.- ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA CD40L EXPRESADA A TRAVÉS DE VECTORES LENTIVIRALES	...78
DISCUSIÓN	...81
CONCLUSIONES	...89
BIBLIOGRAFÍA	...93
PUBLICACIONES y COMUNICACIONES A CONGRESOS	...109

INTRODUCCIÓN

1.- INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

1.a. Generalidades: tratamientos actuales

Las inmunodeficiencias primarias (IPs) son enfermedades causadas por mutaciones en genes no redundantes que afectan a la actividad y/o desarrollo del sistema inmunológico, así como en el resto de elementos del mismo. Las IPs abarcan defectos en células B y T, desordenes en la fagocitosis o deficiencias en el complemento, entre otros. La gravedad de estas patologías depende directamente de los tipos celulares y del nivel del desarrollo celular que se vean afectados por la mutación. Las células que forman parte de los componentes específicos e inespecíficos de la respuesta inmune proceden de las células troncales pluripotentes que dan origen a células progenitoras multipotentes; estas, a su vez, son las precursoras de los diferentes tipos celulares hematopoyéticos existentes. Cada uno de los pasos de las células progenitoras en el camino a su diferenciación puede ser alterado por las condiciones genéticas o ambientales.

Actualmente, el tratamiento de las IPs se basa en el trasplante de médula ósea. El primer trasplante de médula ósea llevado a cabo con éxito en humanos tuvo lugar en 1968 en tres pacientes con IPs [1]. Durante estos 40 años se han producido grandes progresos en este campo, permitiendo el desarrollo de procedimientos más seguros y eficaces. Estos avances incluyen la caracterización inmunológica de los tejidos, permitiendo determinar la compatibilidad entre el donante y el receptor, el desarrollo de técnicas que posibilitan regímenes de condicionamiento, previos al trasplante, mediante quimioterapia o inmunosupresión y el establecimiento de registros de donantes que facilitan y amplían la oportunidad de hallar donantes compatibles. Asimismo, también han sido de gran importancia los avances que se han producido en el conocimiento de las bases genéticas de la mayoría de las IPs, permitiendo el diagnóstico temprano de las mismas.

El trasplante de médula es un procedimiento que consiste en la transferencia de una médula ósea sana a un paciente cuya médula ósea no está funcionando apropiadamente. Dicho trasplante tiene variantes en función del donante y de la similitud con el HLA del receptor. El donante ideal sería un

hermano compatible con HLA idéntico, a continuación un familiar que comparta un solo haplotipo del sistema HLA (trasplante haploidéntico) y por último un donante no emparentado compatible.

El condicionamiento del receptor antes del trasplante es necesario si existe una inmunidad residual de linfocitos T (inmunodeficiencias combinadas y enfermedades relacionadas con la alteración de la fagocitosis) para prevenir la enfermedad injerto frente al huésped (GVHD) [2]. Los protocolos de condicionamiento han de asegurar la duración del implante con la menor toxicidad posible [3]. Se ha observado, en el caso de la Inmunodeficiencia combinada severa (SCID), que la tasa de supervivencia de los trasplantes es del 80% en condiciones no mieoloablativas, aún cuando se recurre a donantes haploidénticos (como el padre). Sin embargo, la inmuno-reconstitución a largo plazo es sólo parcial, sobre todo en el caso de donantes con HLA no idéntico. Como consecuencia, se producen infecciones oportunistas, GVHD crónica, procesos autoinmunes y la muerte [4]. Actualmente se tiende a realizar condicionamiento de intensidad reducida, que conlleva una mayor actividad inmunosupresora y una reducción de la mielo-toxicidad [5]. En el caso del Síndrome de Wiskott Aldrich (WAS), la mutación del gen de WAS afecta al linaje linfoide y mieloide, de modo que es necesario un condicionamiento mioeloablativo para la corrección de la inmunodeficiencia. Además, en el caso de WAS encontramos que, a pesar de que el trasplante tenga éxito, el recurrir a donantes no relacionados puede conducir al desarrollo de citopenias autoinmunes, particularmente durante el primer año del trasplante, a pesar de que no se produzca GVHD [3]. Respecto al Síndrome de Hiper IgM ligado al cromosoma X (XHIM), hay menos datos publicados en relación a los trasplantes de medula ósea. Se estima que la supervivencia de los pacientes oscila entre un 40-50%, aunque un elevado número de paciente desarrollaron neutropenia, daños pulmonares y disfunciones hepáticas. El pronóstico de supervivencia y calidad de vida en el caso de la Enfermedad Crónica Granulomatosa ligada al cromosoma X (X-CGD) es variable. Se han obtenido resultados clínicos excelentes [6] en casos de trasplantes con donante de HLA idéntico y régimen de condicionamiento mioeloablativo, incluso en pacientes con infecciones pre-existentes serias. Sin

embargo, en los ensayos con regímenes de condicionamiento menos intenso se observan tasas de supervivencia del trasplante menores [3].

En resumen, el éxito del trasplante de médula ósea va a depender de [2, 3]:

a) El diagnóstico temprano y la realización precoz del trasplante, que conllevan, en general, un mejor pronóstico para el paciente. Por ejemplo, en el caso de pacientes de SCID el trasplante tiene sus cifras de mayor éxito cuando éste es realizado entre los tres y seis primeros meses de vida, incluso con donantes no idénticos [7-9]. En el caso de WAS, el éxito del trasplante es sustancialmente mayor si se realiza por debajo de los cinco años de edad [10, 11].

b) El grado de compatibilidad del donante y el receptor.

c) El régimen de condicionamiento previo al trasplante

Además del trasplante de médula ósea, los pacientes pueden recibir tratamientos paliativos como la administración de inmunoglobulinas (Igs) intravenosas o subcutáneas [12]. El tratamiento mediante Igs intravenosas se caracteriza por su fácil administración a grandes dosis, su rápido tiempo de acción, la ausencia de proteólisis del producto y la carencia de dolor [13]. Las Igs suministradas son obtenidas a partir de suero humano, presentando una vida media de 18 a 25 días e incluyen todas las subclases de IgGs, con mínima actividad frente al complemento [14]. Este tratamiento reduce la sintomatología del paciente, neutraliza la acción de agentes infecciosos, modula y potencia la respuesta inmune y favorece la fagocitosis. Sin embargo, la dosis necesaria para mantener a un paciente sin síntomas depende de la severidad de la inmunodeficiencia. Se han descrito efectos secundarios (cefaleas, náuseas, vómitos, rigor, dolor abdominal y en articulaciones) en el 5-15% de los casos, y reacciones severas en el caso de pacientes con deficiencias en subclases de IgG con deficiencia de IgA y/o anticuerpos anti-IgA [2, 15-17]. Una alternativa a las Igs intravenosas es el suministro de las mismas mediante inyección subcutánea a nivel abdominal o en el muslo. La ventaja frente a la administración intravenosa es la posibilidad de que el paciente pueda suministrársela por sí solo, lo que permite una mayor independencia del hospital, mejorando la calidad de vida del mismo [18]. La inyección suele ser tolerada bien y las reacciones locales son

mínimas, incluyendo eritema y/o dolor; con reacciones sistémicas poco frecuentes. La dosis usada es la misma que en la administración intravenosa, pero repartida semanalmente. Estudios comparativos entre la administración intravenosa y subcutánea no han encontrado diferencias significativas respecto a la eficiencia y seguridad de las mismas [2], por lo que ésta es una alternativa terapéutica que en la actualidad está claramente ganado terreno. Además, el sistema de inyección subcutánea sirve en ocasiones como alternativa al suministro intravenoso cuando en el paciente hay difícil acceso a las venas o cuando se produce un episodio de meningitis tras el uso de Igs intravenosas [2].

1.b. Situación actual de la terapia génica

En palabras de Levine y Friedmann [19] la terapia génica consiste en “la producción de una sustancia clínicamente útil *in vivo* mediante la introducción de un gen o células modificadas genéticamente, para aliviar las enfermedades humanas” [19]. En 1972, los estudios de Friedmann y Robin con ARN y ADN de virus tumorales, capaces de transferir su material genético a determinadas células, establecieron los elementos teóricos básicos para el establecimiento de la terapia génica [20]. Posteriormente, la aplicación de la tecnología del ADN recombinante para la transferencia de material genético por retrovirus, tanto *in vitro* como *in vivo* [21], determinó que a finales de la década de los 80 se considerase la posibilidad de transferir genes a células con propósitos curativos. Esto condujo al inicio de los primeros experimentos de terapia génica, con el objetivo inicial puesto en las enfermedades de tipo hereditario. Actualmente se han descrito unas 4.000 enfermedades hereditarias, de las cuales muchas no están aún caracterizadas molecularmente. Dentro del grupo de las enfermedades hereditarias, las monogénicas, causadas por mutaciones en un solo gen y que siguen un patrón de herencia mendeliana, son las más fácilmente tratables por terapia génica. Sin embargo, la terapia génica también es una importante alternativa para enfermedades que no son hereditarias estrictamente, puesto que no afectan a la línea germinal, pero sí tienen un componente genético: procesos tumorales, enfermedades de tipo vascular y enfermedades infecciosas [22]. En este momento se han iniciado más de 1200 ensayos clínicos, de los cuales unos 200 se

encuentran en fase II y 32 en fase III. Como se muestra en la figura 1 (obtenida de la base de datos global de ensayos clínicos en terapia génica mantenida por la revista *The Journal of Gene Medicine*: <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>) el 65,2% de los ensayos clínicos se centran en el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento del cáncer, seguido de los ensayos orientados a las enfermedades cardiovasculares, monogénicas e infecciosas que constituye el 9,3%, 8,2% y 7,6% de los ensayos, respectivamente.

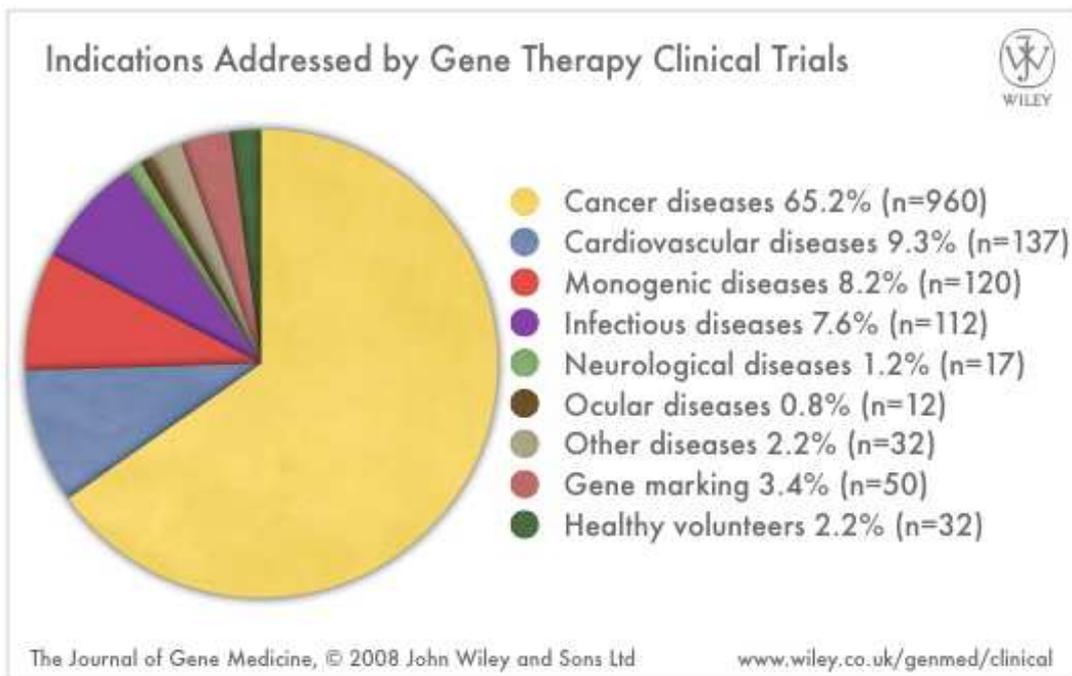


Figura 1: Ensayos clínicos de terapia génica por tipo de enfermedad. Los ensayos orientados a nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer ocupan el primer lugar, seguidos de las enfermedades cardiovasculares, enfermedades monogénicas y enfermedades infecciosas. Las enfermedades neurológicas y oculares, junto con el grupo de otras enfermedades ocupan las últimas posiciones. Información obtenida de la base de datos de la revista *The Journal of Gene Medicine* (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>)

Actualmente las estrategias de terapia génica frente al cáncer se agrupan en dos tipos: métodos directos, para corregir una alteración génica concreta en las células tumorales y métodos indirectos, que tratan de estimular la inmunidad antitumoral de los pacientes o la eficacia antitumoral de otras modalidades terapéuticas como la quimioterapia o la radioterapia [23-25].

-Métodos directos:

- 1) Inactivación de oncogenes. Mediante técnicas que permitan el bloqueo específico de la expresión de un oncogén. Los oncogenes de la familia *ras* han sido frecuentemente utilizados como diana para interrumpir el desarrollo tumoral. Dos técnicas fundamentales han sido usadas: el ADN y ARN antisentido y las ribozimas [26, 27].
- 2) El reemplazamiento de genes supresores de tumores. La disfunción de los genes supresores de tumores conduce al desarrollo neoplásico, por lo que en este tipo de alteración se puede recurrir al reemplazamiento genético mediante la transferencia de una copia del gen normal a las células tumorales, permitiendo así restablecer la función perdida; por ejemplo, un número importante de protocolos se basan en la transferencia de *p53* normal mediante retrovirus y adenovirus recombinantes [28, 29].
- 3) Transferencia de genes inductores de la apoptosis. La inactivación de las rutas pro-apoptóticas es fundamental para la tumorigénesis y puede ser responsable de la resistencia de los tumores a los tratamientos. La estrategia basada en la transferencia de genes pro-apoptóticos a las células tumorales, se ha convertido en una herramienta importante en el desarrollo de terapias eficientes frente al cáncer. Los genes transferidos incluyen *Fas ligando*, *Fas*, *FADD*, *caspasa-8*, *p33ING1*, *p73alpha*, *Bax*, *Apaf-1*, *caspase-9*, *IkappaBdn*, *caspase-3*, *Bcl-2* y *Bcl-X(L)* [30, 31].

-Métodos indirectos:

- 1) Terapia mediante genes suicidas. Esta técnica consiste en la transferencia a las células tumorales de un gen cuyo producto es capaz de metabolizar un fármaco inactivo y convertirlo en un derivado tóxico que mata las células en las que se generó [32, 33].
- 2) La terapia mediante genes que incrementan la resistencia de las células hematopoyéticas a fármacos citotóxicos. La técnica se basa en la transferencia del gen *MDR1 ex vivo* a células de la médula ósea, y

luego transferirlas de nuevo a los pacientes [34, 35]. El producto del gen *MDR1* es una glicoproteína localizada en la membrana celular, que bombea los agentes citotóxicos al exterior de las células [36], protegiendo a las células hematopoyéticas del efecto tóxico que causarían dosis de agentes quimioterapéuticos superiores a las normales.

- 3) La inmunoterapia genética. Se basa en la estimulación de la respuesta inmune del paciente frente al tumor primario o hacia las lesiones metastásicas. Para esto se modifican genéticamente las células tumorales, los linfocitos T o las células dendríticas transfiriéndole genes cuya expresión resulte en un incremento de la respuesta inmune. Para estimular el sistema inmune se pueden utilizar los genes que codifican para citocinas (IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF- α , etc. [37, 38]), moléculas de membrana que participan en la coestimulación de los linfocitos específicos (CD80, CD40, ICAM-1, etc.) o el propio antígeno tumoral a modo de vacuna (alfafetoproteína, antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, MAGE-1, MUC-1, MART-1, etc. [39, 40]).

1.c. Terapia génica de inmunodeficiencias primarias

1.c.1. Logros actuales de la terapia génica en las inmunodeficiencias primarias

Como se ha dicho anteriormente, solamente el trasplante de médula ósea idéntico permite alcanzar la curación de los pacientes con IPs, aunque el 27% de los mismos desarrollan anormalidades tanto endocrinas como neurológicas. El resto de los tratamientos son sólo paliativos. A esto hay que sumar la dificultad de encontrar donantes de médula ósea idénticos. Ante esta situación, la terapia génica aparece como un tratamiento alternativo para las IPs, mediante la inserción del gen correcto en las células hematopoyéticas troncales (HSCs) del paciente [41, 42]. Los vectores usados con este fin han de ser integrativos en el ADN de las HSCs con el objetivo de que el transgen se exprese no sólo en la célula

transducida, sino en toda su progenie. Esta necesidad se confronta con las dos principales limitaciones de la terapia génica en el campo de las IPs: la baja eficiencia de transducción de las HSCs (caracterizadas por ser muy restrictivas a la transducción), y la potencialmente elevada genotoxicidad derivada de la integración aleatoria de los vectores retrovirales.

El primer ensayo clínico de terapia génica con éxito se llevó a cabo en Francia [43] por el grupo de Alain Fischer. Consistió en la transducción de células HSCs de pacientes de Inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X (SCID-X1) con vectores MLV para la expresión correcta del gen de la cadena gamma del receptor de citoquina (γc) en condiciones no mieloablativas. Entre 1999 y 2002 este ensayo de terapia génica incluyó a 10 niños [44], de los cuales en 9 se pudo detectar la corrección del gen γc en linfocitos T y células NK. En 7 de los 9 pacientes, el recuento celular alcanzó valores normales al cabo de los tres meses, manteniéndose sin cambios hasta la fecha. En los otros dos pacientes sólo se produjo una reconstitución parcial de las células T, probablemente porque se transfirió un número insuficiente de células $CD34^+ \gamma c^+$. El segundo ensayo de terapia génica en SCID-X1 se llevó a cabo en el Reino Unido [45], donde se trataron 4 pacientes, en los que los progenitores $CD34^+$ de médula ósea fueron transducidos *ex vivo*, para su posterior reinfusión en los mismos. En este caso tampoco se llevó a cabo un condicionamiento previo de los pacientes mediante quimioterapia. Todos los pacientes mostraron una mejora sustancial a nivel celular, humoral y de su estado clínico general. Así, hasta hoy, 17 de los 20 pacientes sometidos a terapia génica han sido tratados con éxito [46]. Los resultados indican que estos pacientes sometidos a terapia génica tienen un sistema inmunológico funcional que les permite llevar una vida normal y sana sin necesidad de otros tratamientos. A pesar de esto, 4 de los pacientes del ensayo francés y uno del ensayo inglés desarrollaron leucemia de tipo oligoclonal al cabo de 3-6 años. Este efecto indeseado ha sido relacionado con la expresión aberrante de oncogenes (como por ejemplo *LMO2*), inducida por la integración del vector retroviral en las proximidades de los mismos [47]. Este síndrome linfoproliferativo fue fatal para uno de los pacientes, mientras que en los cuatro restantes la leucemia fue tratada con éxito mediante quimioterapia, logrando

mantener las funciones inmunes normales tras el tratamiento de la misma [46]. Las condiciones de los ensayos clínicos de terapia génica realizados en el caso de la inmunodeficiencia combinada severa con deficiencia de adenosín deaminasa (SCID-ADA) fueron muy similares a las usadas en los pacientes de SCID, pero requerían condiciones parciales de mieloablación previas a la terapia [48]. La inmunodeficiencia fue corregida de forma total o parcial en los 13 pacientes tratados [46, 48, 49]. Es importante remarcar que, a diferencia de los ensayos realizados en SCID-X1, no se han observado efectos secundarios en los pacientes de SCID-ADA tratados con terapia génica. Aiuti *et al* [50] analizaron con detalle los sitios de inserción preferentes de vectores MLV-ADA en las HSCs, encontrando preferencia por sitios próximos a oncogenes y genes controladores de factores de crecimiento celular, incluyendo a *LMO2*. Pero, en este caso, las integraciones no están asociadas con selección o expansión clonal *in vivo*. Los autores proponen que la diferencia entre SCID-X1 y SCID-ADA puede estar relacionada con que *ADA* es un gen de expresión constitutiva, mientras que γc puede tener una función como oncogén al ser un receptor potencial de factores de crecimiento. Sin embargo, a pesar de los buenos resultados obtenidos en el caso de SCID-ADA, el hecho de que estos ensayos se realizaran con vectores MLV, como en SCID, mantiene la incertidumbre acerca del riesgo potencial de transformación a medio-largo plazo.

Por otra parte, desde 1997 se han llevado a cabo varios ensayos clínicos de terapia génica para X-CGD, enfermedad causada por mutaciones que producen la ausencia o mal funcionamiento de la NADPH de las células fagocíticas [51]. Los estudios iniciales con vectores retrovirales para la transducción de HSCs dieron malos resultados debido a que en las células corregidas la expresión del transgen era baja y poco duradera [52]. Recientemente se ha completado un pequeño ensayo clínico en dos adultos para corregir X-CGD, usando un vector retroviral en el que la expresión del transgen está dirigida por el LTR del *friend mink cell spleen focus-forming virus*, muy activo en HSCs y progenitores mieloides. Se observó un importante número de fagocitos que habían recuperado la funcionalidad; sin embargo, también observaron una inesperada inestabilidad cromosómica de las células modificadas por la inserción retroviral en los genes

MDS1-EVII, *PRDM16* y *SETBP1* que condujo a la expansión de las células que presentaban el gen modificado. Esta expansión clonal ocurrió principalmente a nivel de los precursores mielogénicos inmaduros, pero no se detectaron leucemias en los pacientes a pesar de que la activación de estos genes, producida por la inserción del vector, está relacionada con proliferaciones descontroladas, hematopoyesis anormal y, eventualmente leucemias[53]. Por otra parte, los efectos terapéuticos del transgen se perdieron al cabo de dos años como consecuencia de la metilación de las zonas ricas en CpG, conduciendo al silenciamiento del transgen. Además, se demostró que la metilación en las zonas CpG afectaba al promotor, pero no a la actividad *enhancer* del LTR viral, de modo que la alteración de la expresión de los genes *MDS1-EVII*, *PRDM16* y *SETBP1* se mantenía en ausencia de la expresión del transgen de interés. Uno de los pacientes murió al cabo de dos años y medio de tratamiento por sepsis [53]. Recientemente se han realizado un estudio similar en pacientes de 5 y 8 años, con resultados inicialmente positivos, pero de nuevo se produjo silenciamiento del transgen al cabo de 1 o 2 años.

En el caso de WAS, de la enfermedad de Bruton o agammaglobulemia ligada al X (XLA) y de XHIM-1 los ensayos de terapia génica se encuentran en fase pre-clínica (ver Tabla 1). La deficiencia de WAS se ha logrado corregir *in vitro* [54-59] e *in vivo*, en ratones deficientes para WAS, que han sido tratados con éxito mediante la infusión de HSCs transducidas con vectores MLV. El resultado ha sido la restauración de la proteína, corrección de los defectos del citoesqueleto y activación celular e inflamación [60-64]. Esto ha conducido al grupo del Dr. Klein a iniciar el primer ensayo clínico con WAS, del que se conocen datos preliminares presentados como comunicaciones en congresos, pero del que aún no hay datos publicados. En el caso de XLA, los ensayos de terapia génica se limitan a modelos animales con ratones deficientes en Btk y/o Tec, que simulan los distintos grados de severidad que puede tener la enfermedad [65-67]. A partir de estos modelos se ha podido observar que quizá los ensayos de terapia génica en pacientes con grado medio de la enfermedad no tengan éxito debido a la falta de ventaja selectiva de las células reconstituidas. Sin embargo, en el resto de

Tabla 1: Inmunodeficiencias primarias (IPs) en las que se han realizado ensayos de terapia génica.

	Enfermedad	Vector	Resultados	Efectos secundarios	Mejoras
IP con datos sobre ensayos clínicos	SCID-X1	Vectores basados en MLV, dirigidos a través de los LTRs	Cura de 17 de los 20 pacientes tratados [43, 44, 49]. Sistema inmune completamente funcional	Desarrollo de leucemias: desregulación de oncogenes en las células diana, debido a la fuerte actividad <i>enhancer</i> de los LTRs de los vectores MLV [68, 69]	Vector gamma-retroviral SIN dirigidos por promotores humanos [70]. Vectores lentivirales SIN UCOE [71]
	SCID- ADA	Vectores basados en MLV, dirigidos a través de los LTRs	Cura de 13 de los 13 pacientes tratados [46, 48-50]. Reconstitución inmunológica y metabólica	Sin efectos adversos.	Vectores lentivirales SIN, dirigidos por el promotor PGK [72]. Vectores lentivirales SIN, dirigidos por el promotor/ enhancer MND [73]
	X-CGD	Retrovirus dirigidos por el LTR de SFFV	Recuperación temporal de 4 de los 4 pacientes tratados [53]. Reconstitución funcional de la fagocitosis y la capacidad de eliminar microorganismos	Expansión e inestabilidad cromosómica de las células modificadas genéticamente, por la inserción retroviral. Metilación en CpG del promotor LTR: silenciamiento del transgen.	Vectores lentivirales SIN basados en el HIV [74]. Vectores SIN, basados en el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV) [75]
IP con datos pre-clínicos	WAS	Vectores basados en MLV, dirigidos a través de los LTRs	Corrección de los defectos del citoesqueleto, activación celular e inflamación [60, 61]	Efectos no adversos	Vectores lentivirales SIN basados en HIV dirigidos por promotores hematopoyético-específicos [56, 57, 64]
	XLA	Vectores retrovirales basados en MSCV	Desarrollo de células B primarias y periféricas, corrección de la respuesta inmune de células T independiente de tipo II [76]	Efectos no adversos	Vectores lentivirales SIN de expresión restringida al linaje B [77-80]
	XHIGM-1	Vectores retrovirales dirigidos por promotores constitutivos	Corrección total o parcial de la respuesta humoral y celular (cambio de isotipo de las Igs) [81]	Linfoproliferaciones tímicas descontroladas [81]	<i>Trans-splicer</i> [82]: corrección del ARN de CD40L. Cromosoma artificial humano que alberga un fragmento del ADN genómico CD40L [83]

los casos los resultados son muy esperanzadores, y el que los protocolos de terapia génica se pongan en marcha dependerá del balance entre los riesgos y beneficios de la terapia génica respecto al tratamiento paliativo con Igs intravenosas.

En el caso de XHIM-1 es importante tener en cuenta que, a diferencia de otras IPs como SCID, SCID-ADA y WAS donde los genes mutados se expresan constitutivamente en las células hematopoyéticas, el gen mutado está finamente regulado y cualquier fallo en la regulación de su expresión puede tener efectos fatales. Así lo han demostrado los ensayos de terapia génica en ratones deficientes para CD40L, mediante vectores retrovirales, donde la expresión no regulada de *CD40L* condujo a enfermedades linfoproliferativas [81, 84]. Otro aspecto importante de esta IP es la ausencia de ventaja selectiva de las células que expresan *CD40L*, puesto que la mutación en este gen no afecta directamente a la supervivencia de los linfocitos T, de modo que las células transducidas no desplazarían a las células afectadas por la mutación. Por todo esto es importante tener en cuenta que XHIM-1 requiere el desarrollo de estrategias que permitan una expresión eficiente y regulada de *CD40L*.

1.c.2. Vectores usados en la terapia génica de inmunodeficiencias primarias

Los vectores más usados en los ensayos de terapia génica en IPs han sido los retrovirus derivados de los oncorretrovirus (*murine leukaemia virus-MLV*) y los únicos que se han llevado hasta ensayos clínicos. Estos vectores son eficientes, integrativos, fácilmente manipulables, poco inmunogénicos y derivados de un virus no patógeno para el hombre [85-87]. Estas características convirtieron a los vectores basados en MLV en la única herramienta para terapia génica de IPs durante años. Sin embargo, las HSCs son quiescentes o tienen tasas de división muy bajas [88], por lo que para la utilización de los vectores MLV se requiere de una pre-estimulación con citoquinas que induzca la proliferación celular. Estos protocolos de pre-estimulación pueden modificar características de las HSCs necesarias para que los ensayos de terapia génica sean eficientes y seguros [89, 90]. Por ejemplo, se podrían activar genes relacionados con la proliferación y, teniendo en cuenta que los vectores MLV tienden a integrarse preferentemente en zonas del genoma activadas, estas zonas podrían ser más susceptibles a la

integración y por tanto a la mutagénesis. Además, los protocolos para el mantenimiento *in vitro* de las HSCs producen diferenciación y pérdida de pluripotencialidad de las mismas. Adicionalmente, una vez transducidas, la diferenciación de las HSCs puede conducir al silenciamiento del transgen por remodelación y/o metilación de la cromatina. Por ello, los protocolos de terapia génica a partir de vectores MLV tienden a usar un gran número de partículas virales por célula (multiplicidad de infección, MOI) para aumentar la eficiencia. Esto incrementa el riesgo de genotoxicidad por mutagénesis debida a la inserción, como demostraron Baum *et al.* cuando encontraron una clara relación entre la eficiencia de transducción, número de integraciones virales y la expansión clonal [91, 92].

Las principales conclusiones obtenidas de los primeros ensayos clínicos son que la terapia génica es una importante alternativa para el futuro tratamiento de las IPs, aunque es necesario el desarrollo de vectores más seguros y eficientes para poder conseguir su aplicación clínica. Respecto a la seguridad de los vectores hemos de considerar dos aspectos:

- 1- Genotoxicidad (alteración genética derivada de la integración del vector).
- 2- Expresión del transgen ectópica y/o desregulada.

2.-SÍNDROME DE HIPER IgM LIGADO AL CROMOSOMA X

2.a. Generalidades

El Síndrome de hiper IgM ligado al cromosoma X (X-HIGM1) es una inmunodeficiencia primaria descrita por primera vez en 1961 (Revisado en referencia [93]). En 1993 varios grupos demostraron que su causa se encuentra en mutaciones en el gen que codifica para CD40L [94-97], una glicoproteína de tipo II expresada fundamentalmente en la superficie de los linfocitos T CD4⁺ activados [98, 99] finamente regulada a nivel transcripcional. Su ligando es CD40, receptor de la superfamilia del TNF, expresado principalmente en células B, células dendríticas y fagocitos mononucleares [100]. CD40L y CD40 juegan un papel crucial en el sistema inmune, debido a que su interacción conduce a la formación

de centros germinales, al escape de la apoptosis de las células B así como a la activación de estas células, induciendo proliferación celular y cambio de isotipo [97, 101]. La interacción CD40-CD40L también determina la activación y diferenciación de los linfocitos T, interviniendo en varios aspectos de la respuesta inflamatoria mediada por células T, tales como la regulación de la expresión de moléculas de adhesión, extravasación celular, producción de citoquinas pro-inflamatorias y activación de macrófagos [97]. Por ello, se ha sugerido que la falta de regulación en la expresión de *CD40L* estaría relacionada con procesos autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES), en el que una prolongada expresión de *CD40L* por parte de las células T CD4⁺ puede conducir a una excesiva activación de las células B con la consecuente producción de auto-anticuerpos [102]. Por ello, una de las nuevas estrategias propuestas para el tratamiento de enfermedades humanas mediadas por células T consiste en la disrupción de la unión CD40-CD40L [103], por ejemplo mediante el uso de anticuerpos frente a CD40L humano. Incluso se establece la hipótesis de que la falta o pérdida de regulación de *CD40L* pueda intervenir enfermedades que van de la aterosclerosis al Alzheimer [104]. Sin embargo, los conocimientos sobre la regulación de *CD40L* a nivel transcripcional son limitados y todavía es difícil afirmar esto con seguridad.

Las mutaciones identificadas en el gen de *CD40L* son muy heterogéneas; incluyen inserciones, deleciones, mutaciones por cambio de sentido, mutaciones sin sentido y mutaciones que afectan a la zona de aceptación entre exón-intrón [105, 106]. Como resultado de estas mutaciones la interacción entre los linfocitos T CD4⁺ activados y células B se ve alterada, con el consecuente fallo en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas. La molécula CD40L también es necesaria para que los linfocitos T y macrófagos adquieran su maduración funcional, por lo que los pacientes de X-HIGM1 tienen también defectos variables en las funciones de estos tipos celulares.

Las manifestaciones clínicas de esta inmunodeficiencia son infecciones recurrentes, valores muy reducidos de IgG y niveles normales o elevados de IgM. En la mayoría de los casos la enfermedad se pone de manifiesto durante el primer o segundo año de vida, mostrando infecciones recurrentes que incluyen otitis

media, infecciones respiratorias y neumonía por *Pneumocystis carinii*. La neutropenia transitoria o crónica que presentan aproximadamente la mitad del los pacientes, favorece al desarrollo de estas infecciones. También son frecuentes cuadros de diarrea crónica y cirrosis por *Cryptosporidium* [107]. Otras complicaciones descritas son colangiopatías, tumores y desordenes autoinmunes [107-109].

Existen varios síndromes con una sintomatología muy parecida, pero causada por mutaciones en diferentes genes. Así, mutaciones en el gen de la enzima citidín deaminasa inducida por activación (AID), involucrada en la cascada de activación de los linfocitos B, cambio de isotipo, hipermutación somática y formación de centros germinales, dan lugar a una de las formas autosómicas recesivas de este síndrome denominada HIGM2 [110, 111]. Otra forma autosómica recesiva denominada HIGM3 es causada por mutaciones en *CD40* [112]. Por último, mutaciones en el gen que codifica para el factor nuclear kB (NF-kB) producen una inmunodeficiencia primaria ligada al cromosoma X caracterizada por la presencia de displasia ectodermal hipohidrótica (XHM-ED) y por síndrome de hiper IgM [113, 114].

2.b. Gen de *CD40L*

El cADN de *CD40L* humano (h-*CD40L*) fue aislado y caracterizado por varios grupos [98, 99]. El gen de h-*CD40L* está localizado en el cromosoma X (en la posición Xq26.3-Xq27.1) y su *locus* abarca de 12 a 13 Kb. Este gen está constituido por cinco exones y cuatro intrones. El primer exón codifica para la región intracelular, transmembrana y la primera porción (6 aminoácidos) de la región extracelular. El resto de la región extracelular está presente en los exones 2-5. Los exones 3 y 4 son los de menor tamaño, codificando 19 aminoácidos y 21 aminoácidos respectivamente. El quinto y último exón codifica la región C-terminal de 125 aminoácidos, incluyendo tres residuos de cisteína y un sitio potencial de glicosilación [115] (Figura 2).

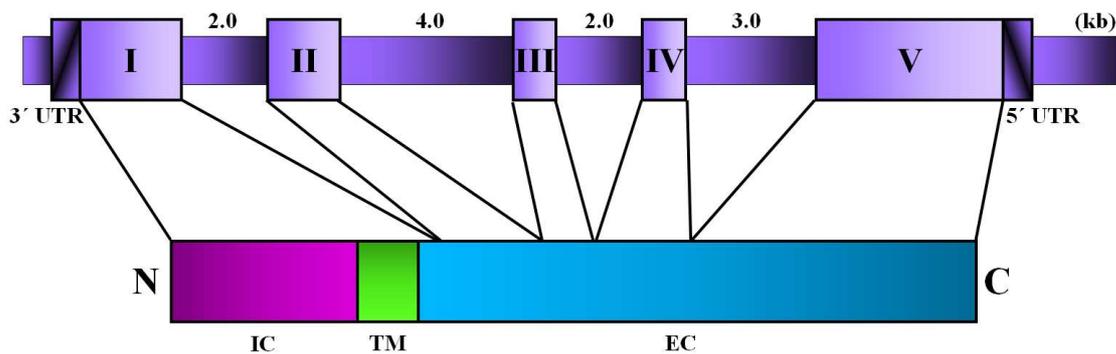


Figura 2: Estructura del gen humano de CD40L. Representación esquemática de la organización del gen de *CD40L*, situado en el cromosoma X (Xq26.3-Xq27.1). El gen consta de cinco exones, de los que el exón I codifica para la región intracelular (IC) y la región transmembrana (TM) y los exones II-V codifican para la región extracelular (EC). El tamaño de los intrones viene dado en la parte superior de los mismos en Kb.

Mediante análisis por *Northern Blot* se ha demostrado la existencia de dos especies de ARN mensajero (mARN) de 2.1 y 1.4 Kb en células T humanas activadas [98] que difieren en el tamaño de la región final 3' no traducida. El mARN de *CD40L* ha sido identificado en células T CD4⁺, CD8⁺ y $\gamma\delta$ activadas. Estos análisis por *Northern Blot* muestran señales específicas de hibridación que incluyen tamaños alternativos de 3.7 y 1.7 Kb en otros tipos celulares como monocitos, células dendríticas, células B, mastocitos, basófilos y eosinófilos [116]. Igualmente, se ha demostrado mediante PCR cuantitativa la expresión del mARN de *CD40L* en células *natural killer* (NK), en células endoteliales y líneas megacarioblásticas [117, 118].

2.c. Proteína CD40L

CD40L, también conocida como gp39 [99], T-BAM [119], o TRAP [120], es una glicoproteína de membrana, de 261 aminoácidos, perteneciente a la superfamilia del TNF. Los primeros estudios determinaron un peso molecular de 39 kilodaltons (kDa), pero en la mayoría de los tipos celulares el peso molecular es de 32-33 kDa. El esqueleto aminoacídico predice un peso molecular de 29 kDa, lo que sugiere que sufre modificaciones post-transduccionales [100].

Los miembros pertenecientes a la familia del TNF se caracterizan por presentarse como proteínas de membrana de tipo II, cuya configuración consiste

en un corto dominio citoplasmático N-terminal, un dominio transmembrana, una cola extracelular y una región C-terminal homóloga para los miembros del TNF [121]. La estructura cristalográfica determinada mediante rayos X es muy similar entre los miembros del TNF: TNF α [122], LT α [123] y CD40L [124]. A pesar de la baja homología de sus secuencias animoacídicas los tres ligandos tienen estructuras tridimensionales muy similares, consistentes en homotrímeros formados por tres subunidades que se pliegan en sándwich de dos hojas β con topología “*jelly roll*” o de remolino.

CD40L se expresa como una glicoproteína de membrana de tipo II; sin embargo, además de esta forma completa de la proteína se han identificado otras dos formas de menor tamaño, presentes también en la superficie celular de los linfocitos T formando heterotrímeros con las moléculas completas de CD40L. Estas dos formas de menor tamaño son p31, que es el resultado del truncamiento de la molécula de CD40L completa en la región N-terminal, perdiendo, así, la cola intracitoplasmática; y p18 que carece de la cola citoplasmática, la región transmembrana y la porción extracelular. Se establece la hipótesis de que las moléculas completas de CD40L se forman como homotrímeros y durante el transporte a la superficie celular, o una vez allí, sufren procesos proteolíticos que generan los heterotrímeros CD40L-p31. Una fracción menor de CD40L, homotrímeros de CD40L o heterotrímeros de CD40L-p31 sufren un proceso adicional de proteólisis para generar los heterotrímeros con p18 [125].

Estos heterotrímeros son funcionalmente activos. Hsu *et al.* [125] demostraron que tanto los homotrímeros de CD40L, como los heterotrímeros, son capaces de unirse a CD40. También observaron que las moléculas de CD40L presentes en la superficie de células Jurkat D1.1, capaces de estimular células B vía CD40, eran fundamentalmente heterotrímeros [125], por lo que los diferentes procesos de modificación post-transduccional deben dar lugar a los diferentes formas funcionales de CD40L. Hay estudios que indican que los heterotrímeros CD40L-p31 podrían ser las formas funcionales de CD40L durante la síntesis *de novo* [125]. La identificación de heterotrímeros en la superficie de los linfocitos T implica la existencia de procesos adicionales de regulación de esta proteína durante el contacto entre células B y T [125].

La actividad proteolítica de ciertas enzimas, existentes sólo en compartimentos celulares de los linfocitos T activados, sobre la molécula completa de CD40L da lugar a la forma soluble de la misma. Esta forma soluble también tiene una estructura trimérica, carece de la región transmembrana y parte del dominio extracelular, pero mantiene completa la región homóloga al dominio TNF α y, por tanto, es capaz de unirse a CD40 [126]. La forma soluble de CD40L no constituye un mecanismo de destrucción de CD40L tras su actividad, ya que comparte actividades funcionales con el CD40L anclado a membrana y su liberación está finamente regulada, como la expresión de CD40L de membrana [127].

La existencia de un CD40L ligado a membrana y otro soluble sugiere que esta molécula manda señales de activación de dos modos distintos. Las dos formas de la molécula pueden compartir algunas actividades, pero también desarrollan funciones específicas. La forma de membrana está implicada en procesos de activación mediante interacción célula-célula, lo cual supone una limitación física en la propagación de las señales; mientras que la forma soluble actuaría como una citoquina, representando una forma rápida para la célula T de transmitir las señales [127].

2.d. Promotor de *CD40L*

El fragmento de ADN responsable de la regulación de la transcripción de *CD40L* abarca 1.2 Kb en dirección 5' del gen *CD40L* respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1) [128]. Inicialmente se describieron dos sitios de unión de proteínas activadoras de la transcripción de la familia NF-AT identificados entre la posición -259 a la -265 y -62 a la -69 [128]. Un tercer sitio de unión a proteínas de la familia NF-AT fue descrito posteriormente entre la posición -761 a la -756 [129]. Estos sitios unen al factor de transcripción NF-AT_{C2} (NF-ATp). Los miembros de la familia NF-AT juegan un papel crucial en la transcripción de múltiples citoquinas inducibles y factores de transcripción que se expresan de forma temprana tras la activación de los linfocitos T. El factor NF-AT se encuentra constitutivamente inactivo, fosforilado en el citoplasma de las células T en reposo. Tras la activación de la célula T, los elevados niveles de calcio

intracelular activan la calcineurina, de modo que ésta defosforila a NF-AT que puede así ser traslocado al núcleo. Allí, NF-AT y la proteína AP-1 se unen cooperativamente para la activación del promotor correspondiente; en nuestro caso el de *CD40L* [130, 131].

Posteriormente se ha demostrado que no es suficiente la actividad promotora de la región 5' al gen *CD40L* para explicar las modificaciones en el patrón de expresión. Esto condujo al descubrimiento, en la región 3' de *CD40L*, inmediatamente después del último exón, de una secuencia reguladora en cis, NF- κ B/Rel, que actúa como *enhancer* tras la unión del homodímero de p50 (de la familia NF- κ B). Este sitio actúa como un *enhancer* típico aumentando la transcripción de *CD40L* de forma independiente a la orientación, y está restringido al linaje de células T CD4⁺, no actuando en células B ni monocitos [132].

Tanto el promotor como el *enhancer* en 3' de *CD40L* tienen, *in vitro*, una baja actividad en células T, incluso tras la activación de los linfocitos T (aunque se produce un rápida generación de nuevos mARNs) [132, 133]. La observación de que la actividad transcripcional del promotor de 1,2 Kb, previamente descrito en 5' de *CD40L*, era menor que la de otras citoquinas, unido a que los niveles de mensajeros en las células eran similares, condujo al descubrimiento de otro elemento regulador en dirección 5' del promotor de *CD40L*. Este nuevo *enhancer* (localizado, aproximadamente, a 1,5 Kb del inicio de transcripción) permite la unión de factores de transcripción como las proteínas NFAT1 y GATA-3 (factor de transcripción específico para Th2), *in vivo* e *in vitro*; y, al igual que el *enhancer* de 1,2 Kb, restringe la expresión de *CD40L* a linfocitos T CD4⁺ activados [133].

Brunner *et al.* han demostrado que hay las células T CD4⁺ productoras de IL-4 (Th2), tienen una especial preferencia para expresar CD40L tras su activación. Como se ha dicho, el *enhancer* en 5' de *CD40L* presenta múltiples sitios de unión para el factor de transcripción GATA-3, que también están presentes en el *enhancer* en 3' del promotor de la *IL-4* [134]. La unión de GATA-3 al *enhancer* en 5' de *CD40L*, induce un incremento en la expresión de *CD40L*, pero no es absolutamente necesaria para ésta. Sin embargo, la importancia de

GATA-3 podría deberse a que su unión interviene en la producción de IL-4 y en la expresión de *CD40L* en la mayoría de las células T $CD4^+$; y tanto *CD40L* como la IL-4 interfieren en funciones vitales de los linfocitos B como es el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas [133].

El conocimiento de la existencia de regiones *enhancer* aguas arriba y abajo del gen de *CD40L*, con un patrón de acción dependiente de activación y específico para células T, puede tener múltiples aplicaciones. Por ejemplo, este es el caso del tratamiento de X-HIGM1 mediante terapia génica, donde el mantenimiento de la expresión de *CD40L* dentro de los valores fisiológicos es tan importante como han demostrado trabajos previos, en los que se observó que la expresión de *CD40L* a través de vectores retrovirales con promotores de expresión constitutiva conduce al desarrollo de linfomas de células T en ratones [81]. Por este motivo, es de gran interés demostrar si la inclusión de estos elementos reguladores de la transcripción en los vectores de expresión mejoraría, *in vivo*, la seguridad biológica de los mismos mediante una expresión de *CD40L* restringida a células T y dependiente de activación, [132].

3.- TERAPIA GÉNICA

Hoy en día la terapia génica se puede describir como la modificación genética de determinadas células o tejidos con el fin de curar o aliviar una enfermedad. Esta estrategia puede suponer una nueva forma de tratamiento para un amplio rango de enfermedades entre las que, como ya se ha dicho, se incluyen las IPs. Consta de tres elementos básicos: la célula diana, el transgen terapéutico y el vector de transferencia. La célula diana es aquella que queremos modificar genéticamente, pudiendo coincidir o no con la célula afectada por la enfermedad. Por ejemplo, en algunas de las estrategias de la terapia génica contra el cáncer se utiliza como célula diana a linfocitos T (inmunoterapia génica). El desarrollo de la terapia génica ha sido factible gracias a la identificación de los genes capaces de corregir el fenotipo de la enfermedad y a la posibilidad de la producción de los mismos para su aplicabilidad clínica. Por otra parte, el éxito de la terapia génica dependerá del desarrollo de vectores adecuados para la transferencia del transgen

en la célula diana [135]. El sistema ideal de terapia génica sería aquel en el que el transgen es administrado *in vivo* a través de un vector seguro, estable, de fácil producción en grandes cantidades y capaz de alcanzar una expresión eficiente y tejido-específica. Sin embargo, hasta el momento, el sistema más desarrollado es la terapia *ex vivo*, en la que se transfiere el transgen a las células extraídas del paciente para su posterior reimplante.

3.a. Vectores de transferencia

Se han desarrollado diferentes estrategias para la transferencia de genes a células eucariotas, que clasificamos en vectores virales y no virales. Los vectores no virales son especialmente favorables por la facilidad de su producción a gran escala, pero sobre todo porque no producen respuesta inmune; sin embargo, su principal limitación es que tienen una eficiencia de transducción muy baja.

Los principales sistemas de transferencia no virales son:

- 1) Sistemas de transferencia de ADN desnudo que incluyen:
 - a) Transferencia del plásmido de ADN a través de inyección intramuscular [136].
 - b) Electroporación mediante la aplicación de campos eléctricos controlados para la permeabilización de la célula [137].
 - c) “*Gene gun*” o biolística, consistente en la aceleración de las partículas de ADN a través de helio comprimido [138]
- 2) Sistemas de transferencia por lípidos: liposomas neutros y aniónicos [139], liposomas catiónicos [140], micelas, emulsiones y otras estructuras lipídicas organizadas.

Los virus han evolucionado eficazmente como vehículos en la transferencia de su genoma en el huésped; esta capacidad les convierte en una herramienta de interés para crear sistemas de transferencia de genes terapéuticos [141]. Los vectores virales son virus de replicación defectiva en los que parte de sus secuencias codificantes han sido reemplazadas por el o los genes de terapéuticos [135]. Actualmente los vectores virales usados incluyen: retrovirus, adenovirus, adeno-asociados, herpes virus y papiloma virus, entre otros.

3.b. Vectores integrativos: gamma-retrovirus y lentivirus

Como ya se ha mencionado, los vectores usados para terapia génica de IPs han de ser vectores integrativos, con el fin de que el transgen no sólo se exprese en la célula transducida, sino que se mantenga en su progenie. Los vectores integrativos (retrovirus, adenoasociados, etc.) más utilizados en los ensayos de terapia génica han sido los retrovirus; en concreto los derivados de los oncorretrovirus (*murine leukaemia virus-MLV*). Aunque la integración de estos retrovirus es aleatoria, tienen tendencia a insertarse en las zonas activadas del genoma incrementando el riesgo de mutagénesis. Otra de las limitaciones de los oncorretrovirus es que necesitan que la célula se encuentre en división para su integración, de modo que no pueden ser usados para la transducción de HSCs sin el pre-tratamiento de las mismas con las consecuencias que de ello se derivan (Ver apartado 1.c.2.).

Por todo esto, la capacidad de los lentivirus de transducir de forma estable células que no están en división les ha convertido en una atractiva herramienta para la terapia génica [86]. Los lentivirus, que también forman parte de la familia de los retrovirus, presentan una serie de ventajas frente a los oncorretrovirus (como los vectores MLV) para su utilización como vectores de transferencia génica [142]: (1) la transducción de HSCs no requiere una pre-activación de 2-3 días (podría conducir al cambio de algunas de las propiedades de las HSCs), (2) los lentivirus son más resistentes al silenciamiento, (3) el patrón de integración es menos genotóxico y (4) el esqueleto lentiviral es más flexible a la hora de inducir modificaciones e inserciones en el mismo.

El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1 [143] y HIV-2 [144]) es el más usado hasta ahora para el desarrollo de vectores lentivirales, pero también se han usado otros lentivirus como el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV [145]), el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV [146]), el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV [147]) y el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV [148]).

4.- VECTORES LENTIVIRALES

4.a. Vectores lentivirales basados en el HIV-1

Los vectores lentivirales basados en el HIV-1 han sufrido progresivas modificaciones para mejorar su aplicabilidad clínica. Así, las primeras generaciones de vectores incluían todas las partículas virales excepto las de la envuelta [149]. El siguiente paso fue la demostración de que las principales propiedades del sistema se mantenían intactas tras la delección de cuatro genes virales adicionales, que codificaban para proteínas que influyen en la virulencia: Vpr, Vif, Vpu y Nef [150]. De esta manera, los genes necesarios para las proteínas requeridas para la formación de las partículas virales y actividades enzimáticas son suministrados en *trans*, en plásmidos separados que codifican para las proteínas gag (proteínas de nucleocápside), pol (enzimas para la transcripción en reverso), env (glicoproteínas de la envuelta), tat (proteína de regulación de la transcripción del ADN proviral) y rev (proteína de exportación del ARN mensajero del núcleo) (Figura 3).

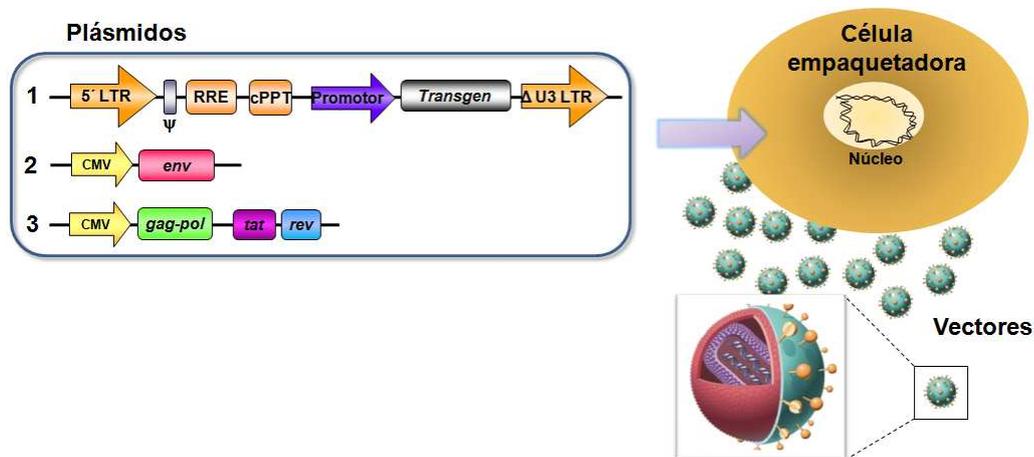


Figura 3: Sistema de producción de vectores lentivirales. La producción de los vectores se produce por co-transfección de tres plásmidos en la célula empaquetadora. **1) Plásmido vector** que contiene el ARN genómico en el que los genes virales han sido eliminados y sustituidos por el promotor y el gen de interés. Este plásmido es un vector SIN, ya que la región U3 del LTR en 3' está truncada para eliminar la actividad promotora de los LTRs virales. **2) Plásmido envuelta** que porta el gen necesario para la formación de la cubierta del virus y fusión a las células diana. **3) Plásmido empaquetador** que porta *gag* que permite el empaquetamiento del ARN genómico en la partícula viral; y *pol* necesario para la transcripción en reverso e integración en el genoma celular.

La supresión de gran parte del genoma viral evita la posibilidad de una reconstitución del virus original por recombinación homóloga. Además, esta supresión incluye a la señal de empaquetamiento, por lo que también se evita la diseminación del ARN viral como consecuencia de empaquetamientos accidentales, que podrían ocurrir si el paciente tratado con vectores lentivirales está infectado o se infectase posteriormente con el virus HIV-1.

Se ha demostrado que el transactivador *tat* tampoco es indispensable para la generación de vectores eficientes [151]. En estos vectores, la secuencia *tat*, dependiente de la secuencia U3 del LTR en 5' que dirige la transcripción del ARN genómico del vector en la célula transducida, ha sido sustituido por diferentes promotores, permitiendo una transcripción independiente de *tat* que no supone una disminución de los títulos virales [152, 153].

4.b. Mejora de vectores lentivirales

4.b.1. Vectores autoinactivables (SIN: *self-inactivating vectors*)

Los LTR de los vectores retrovirales son imprescindibles para su integración en el genoma celular. La integración de los vectores lentivirales ocurre parcialmente al azar, teniendo preferencia por los sitios transcripcionalmente más activos y zonas cromosómicas con mayor densidad de genes [154, 155]. Una de las principales desventajas de los vectores retrovirales de primera generación fue el uso de la región U3 del LTR viral para dirigir la expresión del transgen. La región U3 contiene fuertes regiones promotoras y *enhancers* que son responsables de la activación de genes cercanos al sitio de integración. En el caso de que estas secuencias activasen oncogenes podría conducir a procesos de transformación celular.

Una de las maneras de incrementar la seguridad biológica de estos vectores es eliminar la región U3 del LTR de 3' en el ADN usado para producir el ARN del vector. Durante la transcripción en reverso, esta delección es transferida al extremo 5' del LTR del ADN proviral. Dado que la región U3 contiene las regiones promotoras y *enhancer* necesarias para la transcripción del ARN viral, estas mutaciones no sólo evitan la movilización del vector, sino que también

reduce la genotoxicidad derivada de la interferencia de promotores/*enhancer* virales. Por este motivo se tiende a sustituir la región U3 del LTR en 3' por promotores alternativos que reduzcan la genotoxicidad [153, 156].

4.b.2. Aisladores

Las limitaciones derivadas de la inserción aleatoria de los vectores retrovirales presentan los dos siguientes aspectos: (1) posibles efectos deletéreos de los *enhancers* del vector al insertarse en puntos calientes del genoma, y (2) el posible silenciamiento de la transcripción del vector por procesos de metilación y/o modificaciones de histonas, como consecuencia de su lugar de inserción en el genoma [157]. Por estos motivos, uno de los objetivos de la terapia génica es aislar al vector de la influencia de la cromatina y viceversa, de modo que los *enhancers* presentes en el vector no influyan en la expresión de genes celulares cercanos, y que las secuencias reguladoras presentes en la cromatina cercana al sitio de inserción no afecten la expresión del vector.

Los aisladores son secuencias de ADN próximas a los límites de los dominios de la cromatina, que funcionan como barreras frente los efectos represivos de los dominios de heterocromatina cercanos o previniendo la activación inapropiada de un promotor por parte de *enhancers* cercanos [157, 158]. El aislador más estudiado en vertebrados es un fragmento de 1.2 kilobases (Kb) contenido en el gen de la β -globina 5' *DNase I hypersensitive site 4* de pollo (5'HS4) [159-163]. La amplia caracterización del elemento 5'HS4 por Yusufzai *et al.* [164] demuestra que es capaz de proteger frente a la posición en el genoma y actuar bloqueando el efecto de *enhancers* próximos; dos características importantes para una aislador, que además son propiedades separadas.

Se ha demostrado que la introducción de estos elementos en el esqueleto del vector disminuye la genotoxicidad [165-167], además de reducir el riesgo de silenciamiento del transgen [157, 168-170]. En este sentido, es importante destacar el trabajo del grupo de Nienhuis, el cual ha demostrado que la inclusión de aisladores en las construcciones retrovirales suprime la transformación celular [171]. Este importante hallazgo ha impulsado la incorporación de estos elementos

en los vectores terapéuticos, especialmente en los casos orientados a la transducción de HSCs [172].

4.b.3. Sitios de poliadenilación

Aparte de los problemas de mutagénesis derivados de la inserción y actividad *enhancer* de elementos del esqueleto de los retrovirus, otro problema es la no parada de la transcripción en el sitio de poliadenilación contenido en el vector (*read-through*) [173, 174].

En los retrovirus la señal de poliadenilación está contenida en la región R del LTR, por lo que está presente en ambas terminaciones del transcrito. Para prevenir terminaciones prematuras de la transcripción o poliadenilación en la región 5'R, los retrovirus han evolucionado a presentar sitios de poliadenilación débiles y mecanismos adicionales de supresión de la poliadenilación de la región 5'R [175]. Algunos grupos han demostrado que la inserción de elementos *enhancer* de poliadenilación en la región U3 de 3', mejora la eficiencia de terminación en 3' y procesamiento del mensajero, tanto en gamma-retrovirus SIN como en lentivirus SIN, permitiendo incrementar los niveles de expresión del transgen y el título de los vectores [174]. Sin embargo, todavía ha de ser demostrado mediante modelos animales, si la inclusión de fuertes señales de poliadenilación en retrovirus da lugar a una mejora en la bioseguridad.

4.b.4. Modificación del promotor

La terapia génica dirigida al tratamiento de IPs tiene como objetivo la expresión de genes hematopoyéticos en las HSCs, de modo que el transgen terapéutico perdure en la progenie celular. Los ensayos realizados se basan en la re-infusión de las HSCs modificadas genéticamente. Sin embargo, se ha demostrado que las HSCs purificadas se pueden diferenciar o fusionar a diferentes tipos de celulares no hematopoyéticos [176-182], por lo que la expresión de genes hematopoyéticos en células no hematopoyéticas puede ser tóxica [59]. Esta situación ocurre en el contexto de promotores constitutivos (como los LTRs del virus) que permiten la expresión del transgen en cualquier tipo celular y de forma no fisiológica.

Una de las mejoras más importantes, en cuanto a seguridad biológica de los vectores, es el uso de promotores tejido-específicos que permitan restringir la expresión del transgen a las células diana. Esto se ha logrado a partir de los vectores retrovirales SIN, en los que, como se explico anteriormente, se elimina parte del U3 del LTR en 3', de modo que, en ausencia de un promotor interno, muchos laboratorios han introducido elementos promotores heterólogos, en el lugar de del U3 delecionado [153].

Pero no sólo es necesario lograr una expresión tejido-especifica del transgen, sino alcanzar niveles fisiológicos del mismo. Una de las estrategias usadas con este fin es la inserción del propio promotor del gen terapéutico, ya que en teoría contendrá los *enhancers* y elementos reguladores que permitirán la expresión fisiológica deseada. Sin embargo, la inclusión de secuencias promotoras propias del transgen en los vectores retrovirales no siempre tiene un efecto tejido-especifico y/o fisiológico. Hay que tener en cuenta que la integración de los retrovirus en el genoma ocurre parcialmente al azar, e introduce la nueva secuencia en un lugar génico diferente a su *locus* natural. Esta nueva disposición del promotor en el genoma está sujeta a factores ambientales que pueden conducir a una expresión descontrolada del transgen. Para minimizar estas influencias cromosómicas se han incorporado elementos adicionales como fragmentos de intrones [77], *enhancers* [172] y/o aisladores [183].

Trabajos recientes han demostrado que la utilización de promotores derivados de genes humanos, como el del factor de elongación alfa (*EFla*) y el del fosfoglicerato kinasa (*PGK*), mejora la seguridad biológica, reduciendo los procesos de transformación derivados de la integración del vector en el genoma. En estas investigaciones observaron que la actividad transformante de estos promotores era mucho menor que la de otros promotores retrovirales usados, incluso cuando estos incluían elementos *enhancer* bien caracterizados [184].

5. SEGURIDAD BIOLÓGICA EN TERAPIA GÉNICA APLICADA A LAS INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

5.a. Genotoxicidad

La genotoxicidad puede definirse como el daño producido en el material genético como consecuencia de la integración aleatoria del vector. Los efectos de la genotoxicidad son potencialmente mutagénicos y/o carcinogénicos. Los vectores integrativos son genotóxicos debido a que, a pesar de que su inserción es parcialmente aleatoria, tienen preferencia de inserción en los puntos calientes del genoma, y dicha integración puede modificar la expresión de genes. En el peor de los casos la genotoxicidad puede causar transformación y desarrollo de tumores [91]. Como ya se ha mencionado, diferentes factores pueden influir en la genotoxicidad: preferencia por determinados sitios de inserción, presencia de fuertes *enhancers* en el vector, señales débiles de poliadenilación, etc. Actualmente los esfuerzos en disminuir la genotoxicidad de los vectores retrovirales se basan en los mecanismos explicados anteriormente: vectores SIN, aisladores, *enhancers*, señales de poliadenilación, introducción de promotores específicos, etc.

Existen nuevos sistemas en desarrollo para la corrección del gen afectado directamente en el genoma celular, introduciendo moléculas de ADN en el interior de la célula, que sustituyen el correspondiente fragmento de cromosoma mediante recombinación homóloga. Este mecanismo de corrección génica es la forma más lógica de curar las IPs, ya que la corrección *in situ* de la mutación o mutaciones permite reconstituir la expresión del gen a un nivel fisiológico, garantizando la expresión a través de su promotor endógeno y otros elementos reguladores presentes en la cromatina. A pesar de ello, las modificaciones sitio-específicas del genoma tienen aún la limitación de la baja frecuencia de la recombinación homóloga [185], el requerimiento de vectores muy complejos y mecanismos de selección por drogas [186]. Recientemente, se han desarrollado nuevas tecnologías que han despertado de nuevo el interés por estos mecanismos de corrección *in situ* como estrategia ideal para la terapia génica. Estas nuevas estrategias usan los mecanismos celulares de recombinación homóloga para

modificar de forma exacta la secuencia seleccionada mediante *zinc-finger nucleases* (ZNF) [187] o meganucleasas [188]. Ambas estrategias consiguen incrementar 10.000 veces los mecanismos celulares de recombinación homóloga permitiendo una corrección eficaz del gen *in situ*. Hasta el momento, sólo las ZFNs han sido usadas en estudios de terapia génica de IPs, permitiendo una modificación fácil y estable de las HSCs, pero con baja eficiencia. Las ZFNs combinan la capacidad de corte no específica de las endonucleasas, con la capacidad de reconocimiento específico de las proteínas *zinc finger* [189] para cortar en el *locus* elegido dentro de la célula [190-192]. Una vez que el ADN diana ha sido cortado, el mecanismo celular de reparación homóloga directa actúa utilizando el ADN suministrado para corregir el defecto. Estudios recientes han demostrado que las ZFNs pueden ser usadas para obtener una frecuencia del 5-50% sobre las dianas en ausencia de selección en diferentes líneas celulares [191-196] incluyendo linfocitos T primarios [197] y HSCs [196]. A pesar de todos estos progresos, las ZFNs están aún en desarrollo y muchos aspectos deben ser todavía investigados, antes de que esta nueva tecnología pueda ser aplicada en ensayos clínicos, como la reducción de roturas de doble cadena sobre la diana y la genotoxicidad asociada a ZFNs.

5.b. Expresión ectópica

Como agentes terapéuticos, los transgenes transferidos a través de los vectores han de expresarse de la manera más fisiológica posible. En muchas IPs, la expresión del transgen afectado está restringida a un linaje hematopoyético concreto, a un estado del desarrollo establecido y/o responde a unas condiciones ambientales determinadas. La expresión del transgen en una célula que no sea su diana, así como con niveles no fisiológicos, puede causar efectos tóxicos o deletéreos [59, 81, 198]. Por tanto, otro aspecto relacionado con la bioseguridad de la terapia génica de IPs es lograr expresión regulada y/o fisiológica del transgen. Las estrategias desarrolladas en este aspecto se basan en la utilización de promotores regulables (idealmente el propio promotor del gen terapéutico) para la expresión del gen; lo que ya hemos mencionado en el apartado anterior de genotoxicidad. Otra estrategia en este sentido es el pseudotipaje de los vectores,

diferentes grupos han diseñado envueltas quiméricas [199-201], con el fin de dirigir previamente el tropismo del vector hacia un número limitado de tipos celulares, con el fin de evitar los problemas derivados de la expresión ectópica del transgen

Por otra parte, los vectores desarrollados para terapia génica de las IPs han de ser capaces de transducir eficientemente a las HSCs, de modo que puedan generar un número suficiente de células multipotentes capaces de reconstituir el sistema inmune del paciente. Esto es especialmente importante cuando la proteína terapéutica no confiere una ventaja selectiva respecto a las células del paciente no transducidas. Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, el vector ideal para terapia génica de las IPs ha de ser integrativo, ha de transducir eficientemente a las HSCs y ha de ser capaz de expresar niveles cercanos a los expresados fisiológicamente por la proteína terapéutica, con una sola integración por célula.

6.- TERAPIA GENICA DE X-HIGM1

6.a. Modelos experimentales para terapia génica de X-HIGM1

El desarrollo de modelos biológicos que permitan la evaluación directa a nivel de eficiencia y bioseguridad de los protocolos de terapia génica es fundamental para su posterior aplicación clínica en humanos.

6.a.1. Modelo celular

Como punto de partida en los ensayos de terapia génica es preciso el establecimiento de líneas celulares que permitan estudiar las bases moleculares de las anormalidades fenotípicas y funcionales derivadas de la IP correspondiente.

Así, se pueden establecer líneas celulares de linfocitos T primarios mediante estimulación alogénica [202] tanto de pacientes como de individuos sanos que servirán de controles. Estas líneas conservan las características de las células primarias y manifiestan un fenotipo estable. No obstante, debido a la limitada vida media de las líneas celulares primarias, se han desarrollado estrategias para generar líneas celulares inmortalizadas con el Herpesvirus de Saimiri (HSV) [203]. Las cepas HVS-C484-77 y 488-77 del virus son capaces de

inmortalizar a los linfocitos T humanos (HVS-T), originando líneas celulares con fenotipo y marcadores de superficie estables en el tiempo. Estas células se pueden mantener en cultivo independientemente de la presencia de células presentadoras de antígeno, si hay IL-2 en el medio, conservando la especificidad antigénica, la producción de citoquinas y citotoxicidad [204-206]. Las células T procedentes de pacientes con enfermedades genéticas, inmortalizadas con HVS-T, también mantienen los defectos característicos de las mismas [207, 208]. Por tanto, las células T-HVS procedentes de pacientes con IPs constituirían un modelo ideal para evaluar la reconstitución funcional de las mismas tras la transducción con el gen terapéutico de interés. Así lo demuestran Toscano *et al.* [209] al conseguir transducir eficientemente células T-HVS procedentes de pacientes de WAS, mediante vectores lentivirales. Las células transducidas lograron mantener la expresión génica de forma estable y constante al menos durante 48 días. Este trabajo confirma que las células T-HVS constituyen un modelo adecuado para los ensayos de terapia génica de las IPs, *in vitro*.

A pesar de las limitaciones para el cultivo de estas líneas celulares, el uso de las mismas, mantenidas por alo-estimulación o inmortalizadas con HVS, permite realizar ensayos de rescate fenotípico y funcionalidad de las células de pacientes tras su modificación génica. Este será el paso previo necesario antes de los ensayos con modelos animales.

6.a.2. Modelo animal

Un modelo animal que reproduzca la inmunodeficiencia estudiada es necesario para determinar la viabilidad y seguridad de la terapia génica como tratamiento alternativo para esa inmunodeficiencia. En este sentido, el modelo de ratón *knock-out* para *CD40L* [210] es uno de los mejores modelos simulando una inmunodeficiencia humana, aunque el modelo murino no es tan severo como el humano. Los ratones *knock-out* para *CD40L* muestran deficiencias en la inmunidad humoral (los niveles basales en suero de los distintos isotipos son significativamente inferiores a los encontrados en ratones normales) y fallos en la generación de respuesta antígeno específica secundaria frente a antígenos timo dependientes. Por el contrario, a diferencia de los pacientes humanos de X-

HIGM1, el porcentaje de células B y T son normales y producen anticuerpos específicos de antígeno de todos los isotipos, excepto de IgE, en respuesta a antígenos timo independientes.

6.b. Antecedentes de la terapia génica en X-HIGM1

Como ya se ha señalado anteriormente, el principal tratamiento para esta inmunodeficiencia es el trasplante de médula ósea [211, 212]. La otra alternativa es el suministro de Igs, que permiten disminuir significativamente las infecciones de los pacientes. Sin embargo, todavía hay un número relevante de pacientes que mueren como consecuencia de las infecciones recurrentes o complicaciones de los tratamientos [213]. Todo esto hace necesario el desarrollo de terapias más seguras y eficientes, como la terapia génica en la que se lleva a cabo la reinfusión de las HSCs del paciente, expresando funcionalmente *CD40L*, como consecuencia de haber sido transducidas mediante vectores virales.

Como en la mayoría de las IPs los primeros ensayos de terapia génica en X-HIGM1 se realizaron mediante vectores retrovirales. Brown *et al.* [81] diseñaron un vector retroviral que portaba el ADNc de *CD40L* murino (*mCD40L*) dirigido a través de un promotor constitutivo. Las células de la médula ósea de ratones *knock-out* para *CD40L* fueron transducidas con estos vectores retrovirales e inyectadas de nuevo en los mismos. La expresión constitutiva de *mCD40L* condujo a una corrección total o parcial de la respuesta celular y humoral, pero más de la mitad de los ratones tratados desarrollaron, en un tiempo de 6 a 9 meses, linfoproliferaciones tímicas. Los autores propusieron que la expresión constitutiva de *CD40L* podía producir una respuesta linfoproliferativa anormal en los linfocitos T en desarrollo, aparentemente por una interacción aberrante entre las células $CD40L^+$ y timocitos con fenotipo: $TCR\alpha\beta^+CD40^+$.

Es de gran importancia destacar, cuando hablamos de la terapia génica como tratamiento alternativo para esta inmunodeficiencia, que *CD40L* no se expresa constitutivamente, ya que su expresión está fuertemente regulada a nivel transcripcional, a diferencia de lo que ocurre en otras IPs como SCID-X1, SCID-ADA o WAS. La alteración en la regulación de *CD40L* tiene consecuencias fatales como también se demuestra en el trabajo de Sacco *et al.* [84], en el que se

estudió el efecto de la expresión no regulada de *CD40L* en ratones transgénicos, a través de diferentes promotores no fisiológicos. El resultado obtenido fue que la expresión ectópica de *CD40L* era letal, mientras que la sobreexpresión en células T fue tolerada. En cualquier caso, de nuevo se observó que uno de cada tres ratones desarrollaba linfoproliferaciones atípicas. La principal conclusión derivada de los trabajos de Brown y Sacco es que la terapia génica para X-HIGM1 necesita vectores de expresión fisiológica y regulada.

Otro aspecto de crucial importancia en la terapia génica de X-HIGM1 es la ausencia de ventaja selectiva de las células transducidas frente a las que no lo están, ya que las mutaciones en *CD40L* no afectan directamente a la supervivencia de la célula T, por lo que la población transducida no podrá sobrecrecer a las células no modificadas. En este punto, el principal objetivo de cualquier ensayo de terapia génica mediante vectores de expresión fisiológica y regulada será determinar si los niveles expresión alcanzados no sólo no son tóxicos (ausencia de linfoproliferaciones), sino que son suficientes como para inducir el cambio de isotipo de las células B activadas y proliferación de las mismas.

Una estrategia que ha permitido corregir la mutación de *CD40L*, al tiempo que mantenía su regulación fisiológica, es el *trans-splicing* del pre-mARN [82]. Tahara *et al.* [82] desarrollaron un vector lentiviral que codificaba para un mARN en el cual encontramos un dominio híbrido, un espaciador y la versión correcta de *CD40L*, aguas arriba del dominio híbrido. Las HSCs transducidas con estos vectores y trasplantadas en ratones *knock-out* para *CD40L* fueron capaces de corregir *CD40L* en el mARN. Estas modificaciones fueron suficientes para producir una corrección parcial del cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y generar una expresión regulada de *CD40L*, tras estimulación con CD3 y atenuación de neumonía por *Pneumocystis carinii*. Como dato importante hay que destacar que no se desarrollaron linfoproliferaciones, pero la baja eficiencia (corrección del 10% de mARN total) limita su aplicación a otras IPs y en clínica.

Recientemente, otro grupo ha abordado esta inmunodeficiencia desde una técnica muy diferente. Yamada *et al.* [83] usaron como vector un cromosoma artificial humano (HAC), que contenía el ADN genómico de *CD40L*. De este modo se logró una expresión endógena del transgen a través de su propio

promotor, en células Jurkat (línea celular T). Los inconvenientes derivados de esta técnica son la baja eficiencia conseguida y la necesidad de demostrar que las HSCs pueden ser modificadas de forma estable por HAC.

OBJETIVOS

La terapia génica para X-HIGM1 está limitada por la necesidad de obtener una regulación fina de la expresión del transgen terapéutico (CD40L) y por la ausencia de ventaja selectiva de las células corregidas, ya que las mutaciones en *CD40L* no afectan directamente a la supervivencia de los linfocitos T. Por lo tanto, el objetivo general de la presente tesis es el desarrollo de vectores lentivirales autoinactivables (SIN) que permitan una modificación génica eficiente de las células HSCs y obtengan una expresión fisiológica de CD40L, plasmado en los siguientes objetivos específicos:

1-Desarrollar un vector lentiviral SIN en el que *CD40L* se exprese a través de un promotor tejido-específico para el linaje hematopoyético (promotor endógeno de *Was*) que ha mostrado previamente su capacidad para restringir la expresión del transgen al tejido hematopoyético en un entorno lentiviral.

2- Estudiar el comportamiento del promotor de *CD40L* en un entorno lentiviral, determinando si mantiene su carácter tejido-específico e inducible por activación en las células T transducidas, tal y como ocurre en las células normales pertenecientes a este linaje. Para ello diseñaremos un vector lentiviral SIN en el que la expresión de *eGFP* como gen marcador esté dirigida por el promotor de *CD40L*.

3- Generar, en el caso de demostrar la utilidad del promotor de *CD40L* en un entorno lentiviral, un vector terapéutico inducible y tejido-específico en el que la expresión del transgen CD40L se encuentre dirigida por el propio promotor de CD40L. Evaluaremos, a continuación, la actividad funcionalidad de la proteína CD40L expresada a través de este vector lentiviral al objeto de determinar su capacidad de producir el rescate fenotípico de células B deficientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- LÍNEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO

La línea de linfocitos T primarios, obtenida de un donante sano, denominada N1 ha sido desarrollada en nuestro laboratorio y mantenida mediante alo-estimulación semanal con células B Raji pre-tratadas con Mitomicina C [202]. Los linfocitos T primarios fueron cultivados con medio Panserín (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania) suplementado con suero humano al 5%, glutamax al 1% y 50 UI/ml IL-2 humana recombinante (obtenida del AIDS Reagents and Referente Program, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Las células 293T (células epiteliales de riñón) fueron cultivadas en DMEM (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, California, USA) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y penicilina-estreptomina al 1%. El resto de líneas celulares Ecv 304 (carcinoma de vejiga: epiteliales), Jurkat (leucemia linfoblástica de células T), K562 (leucemia mielogénica: eritrocítica y megacariocítica) y U937 (leucemia mielogénica: monocítica) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Bio-Whittaker, Verviers, Bélgica) suplementado como se ha indicado previamente, incluyendo además glutamax al 1%.

La línea celular Jurkat usada, se caracteriza por que la expresión *CD40L* no es detectable a través del anticuerpo monoclonal empleado en los ensayos (*mouse anti-human CD40L*, clon 24-31; Calbiochem). Sin embargo, este anticuerpo sí es capaz de detectar la expresión de *CD40L* generada por los vectores lentivirales.

2.- PLÁSMIDOS

Para la construcción de nuestros vectores lentivirales el ADN complementario (ADNc) de *CD40L* fue obtenido por reverso-transcripción a partir del ARN total procedente de linfocitos de sangre periférica (PBLs) de un donante sano, obtenido por el método del Trizol. La amplificación del ADNc de *CD40L* se llevó a cabo con Pfu DNA *Polymerase* (Promega), con su correspondiente buffer suplementado con ClMg_2 50mM y dextrinosinucleótidos 10mM. Los cebadores usados fueron descritos previamente por Villa *et al.* [115]:

F-CD40L (5' CATTTCAACTTTAACACAGC 3')

R-CD40L (5' AGCTCCACCACAGCCTGC 3')

Las condiciones de las PCR fueron: 1 x (95°C, 2'); 35 x (94°C, 30''/ 50°C, 1' / 72°C, 3'); 1 x (72°C 10'). El producto de la amplificación fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizado mediante bromuro de etidio, siendo el fragmento amplificado por estos cebadores de 837 pb. El producto de PCR fue purificado (*Perfectprep clean up*, Eppendorf), y subclonado en el plásmido intermediario pCRII-Blunt-TOPO (Invitrogen) para su posterior clonaje en los vectores lentivirales.

El vector S-CD40L fue obtenido a partir del vector lentiviral pHR' SIN cppt-SEW, en el que por doble digestión enzimática BamHI-XhoI se escindió *eGFP* y *WPRES*, sustituyéndose ambos por el ADNc de *CD40L*, escindido de pCRII-Blunt-TOPO por la misma digestión enzimática. El vector W-CD40L se construyó de igual modo que S-CD40L, pero en este caso el ADNc de *CD40L* sustituyó al de *Was*. El vector *pCD40L-CD40L* se construyó por doble digestión BamHI-ClaI de S-CD40L, lo que permitió sustituir el promotor SFFV por el promotor de *CD40L*, contenido en el vector de subclonaje pMK (GENART, Regensburg, Alemania), escindido también por doble digestión BamHI-ClaI. Por último, *pCD40L-GFP* se creó a partir de los vector lentivirales SE y *pCD40L-CD40L* por doble corte con BamHI-XhoI, lo que permitió sustituir en *pCD40L-CD40L* el ADNc de *CD40L* por el de *GFP* procedente del vector SE.

Cada construcción obtenida fue evaluada por digestión diagnóstica y secuenciación en el servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra del CSIC, Granada, mediante los cebadores correspondientes.

3.- PRODUCCIÓN DE VECTORES

Los vectores lentivirales fueron producidos por co-transfección de células empaquetadoras 293T con los tres plásmidos: 1) plásmido vector (S-CD40L, W-CD40L, *pCD40L-CD40L* ó *pCD40L-GFP*), 2) plásmido empaquetador pCMVΔR8.91, y 3) plásmido de la envuelta VSV-G (pMD.G). La co-transfección

se realizó mediante la formación de vesículas lipídicas con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) [209]. Las células empaquetadoras se cultivaron en placas de Petri de 10cm de diámetro (Sarstedt, Newton, NC) a una confluencia del 90-95%. Previamente a la transfección las células fueron lavadas una vez con medio OPTI-MEN (Gibco) precalentado a 37°C, dejando un volumen final de 5ml de OPTI-MEN por placa. Por otra parte, el ADN añadido por placa fue de 27µg totales, en la proporción 3:2:1 de plásmido vector, plásmido empaquetador y plásmido de la envuelta respectivamente. Este ADN fue diluido en 1,5ml de OPTI-MEN y mezclado con 1,5ml de OPTI-MEN que contenía 60 µl de Lipofectamina 2000, dejándose incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de Lipofectamina y ADNs, en un volumen final de 3ml de OPTI-MEN, fue añadida a cada placa, incubándose 6 horas a 37°C al 10% de CO₂. Tras la incubación, se cambió el medio de las placas por 8 ml de OPTI-MEN fresco y se mantuvieron en cultivo 48 horas más hasta la recogida de los vectores, que se realizó recolectando los sobrenadantes de las placas, pasándolos por filtro de 0,45 µm y almacenándolos en alícuotas a -80°C.

4.- TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS

Las células diana fueron transducidas en placas de 24 pocillos a una confluencia de 10⁵ células/pocillo. Los vectores fueron añadidos en concentraciones seriadas sobre un volumen final de 300 µl del medio de cultivo correspondiente, según el tipo celular. Las células se incubaron con los vectores durante 6-8 horas; al cabo de este tiempo se procedió al cambio de medio para retirar los vectores. Las células se mantuvieron en cultivo durante 5 días, tras los cuales se procedió a la detección de la expresión de CD40L por citometría de flujo.

5.- TITULACIÓN DE LOS VECTORES

Para determinar el título de los vectores (unidades de transducción por mililitro) se sembraron 10⁵ células/pocillo en una placa de 24 pocillos. Al día

siguiente se añadieron 1 y 10 μ l de cada una de las soluciones a titular. Las células incubadas con los diferentes vectores se dejaron crecer al menos una semana y se procedió a la obtención de ADN y a la cuantificación del número de copias del vector integrado en cada muestra. Para ello se realizó una q-PCR incluyendo una curva estándar de plásmido (S-CD40L ó *pCD40L-GFP*) con cantidades seriadas del mismo entre 10^3 a 10^7 copias. A partir de esta curva estándar se interpoló el número de copias correspondiente a cada muestra (se utilizó 0.6 μ g de ADN correspondiente a 10^5 células). Este valor nos indica las partículas virales eficientes para transducción presentes en el volumen utilizado inicialmente (1 ó 10 μ l). Para calcular el título (número de partículas eficientes por cada mililitro) se multiplica por 1000 o 100 en función del volumen utilizado inicialmente.

6.- PREPARACIÓN DE ADN Y PCR CUANTITATIVA

Para la extracción del ADN genómico de las células transducidas se partió de $5-10 \times 10^6$ células. Las células recogidas se lavaron dos veces con PBS por centrifugación a 300g durante 5 minutos a 4°C; una vez lavadas se resuspendieron en un mililitro de la solución de lisis filtrada (Tris HCl 20mM, pH 8; EDTA 5mM, pH 8; NaCl 400mM y SDS 1%) con Proteinasa K a 100 μ g/ml, dejándose incubar en agitación a 55°C, durante toda la noche. Tras la inactivación de la Proteinasa K a 95°C, 10 minutos, se incubó con RNasa a 5 μ g/ μ l durante 30 minutos a 60°C. A continuación, se procedió a la extracción del ADN genómico mediante purificaciones con fenol (1:1) y fenol-cloroformo-isoamil alcohol, 25.24.1. (1:1) por ultracentrifugación a 4°C. La precipitación del ADN genómico se realizó con etanol absoluto y acetato amónico al 10%.

Las reacciones de PCR cuantitativa se llevaron a cabo en termociclador ABI Prism 7000 PCR *Detection System* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) usando la mezcla *iQ SYBR Green Supermix* que contiene 0.4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP), 50 unidades/ml *iTaq DNA polymerase*, $MgCl_2$ 6 mM, *SYBR Green I* y *fluoresein* 20 nM (Bio-Rad).

Los cebadores utilizados para la amplificación fueron:

F-Exón 2 CD40L (5'GATACAGAGATGCAACACAGGA 3')

R-Exón 3 CD40L (5'GCTGTTTTCTTTCTTCGTCTCC 3')

F-GFP (5' GCCCGACAACCACTACCT 3')

R-GFP (5' CGTCCATGCCGAGAG TGA 3')

En el caso de CD40L la distancia entre F-Exón 2 y R-Exón3 en el vector lentiviral (ADNc de *CD40L*) es de 127 pb, mientras que en el ADN genómico entre el exón 2 y 3 de *CD40L* hay 4102 pb, por lo que el producto de amplificación por PCR cuantitativa corresponderá al ADNc de *CD40L* de los vectores lentivirales insertados en el genoma celular, discriminando así la amplificación de *CD40L* endógeno. El número de copias de vector fue determinado a partir de la amplificación de la secuencia *CD40L* o *GFP*, en su caso, e interpolación en la curva estándar de plásmido (de 10^7 a 10^3 copias). Las condiciones de la PCR fueron para *CD40L*: 1 x (95°C, 2'); 40 x (95°C, 20''/ 55°C, 30''/ 72°C, 30''), y para *GFP*: 1x (95°C, 2'); 40 x (95°C, 15''/ 63°C, 30''/ 72°C, 30''); 1 x (72°C 2').

7.- INMUNODETECCIÓN Y CITOMETRÍA DE FLUJO

Para la inmunodetección de CD40L se tomaron $2,5 \times 10^5$ células por punto. Las células fueron recogidas y lavadas con PBS a 300g durante 5 minutos. Todo el proceso se realizó a 4°C. Para el boqueo de las muestras se procedió a la incubación de las mismas en PBS al 3% de FBS y Azida Sódica 0,2% durante 15 minutos en agitación. Tras la incubación fueron lavadas y recogidas por centrifugación a 300g durante 5 minutos. Los anticuerpos fueron preparados en PBS al 0,3% de FBS y Azida Sódica 0,02%. Como anticuerpo primario se añadieron 100 µl del anticuerpo monoclonal anti-CD40L 24-31 (*mouse anti-human CD40L*; Calbiochem) a una concentración de 1/100. Se incubó 1 hora en agitación a 4°C. Tras la incubación fueron lavadas con PBS al 0,3% de FBS y Azida Sódica 0,02% y recogidas como se indicó anteriormente. Como anticuerpo

secundario, marcado con PE (*goat anti-mouse* IgG; Caltag Laboratories), se añadieron 100 µl del mismo a una concentración 1/200. Se incubó 1 hora en agitación a 4°C. Tras la incubación se procedió del mismo modo que con el anticuerpo primario, dejando las células resuspendidas en 250-300 µl de PBS para ser analizadas por FACS.

En las citometrías en las que se analizó conjuntamente la expresión de CD40L y eGFP se utilizó, para la detección de CD40L un anticuerpo secundario marcado con APC (*goat-anti-mouse*; BD Pharmingen), cuya lectura se hace en FL-4. El objetivo de esto fue evitar que la expresión de eGFP (cuya lectura se realiza en FL-1) no interfiriese en la detección de CD40L, en el caso de que los niveles de expresión de eGFP fuesen muy altos, interfiriendo en FL-2, donde detectamos el anticuerpo secundario usando normalmente (PE).

8.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR *CD40L* MEDIANTE ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE eGFP POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La fuerza del promotor de CD40L se determinó midiendo el incremento de la intensidad media de fluorescencia (MFI) que se produce en las células transducidas con el vector *pCD40L-GFP*. Dicho incremento se calcula como el cociente del MFI de R2 (población positiva) entre el MFI de R3 (población negativa). En la figura 4 el incremento de MFI de la población control no transducida sería $5,13 / 3,12 = 1,64$, y el de la población transducida $11,23 / 3,12 = 3,60$. A continuación, restamos al MFI de la población transducida el de la población no transducida, en nuestro ejemplo, $3,60 - 1,64 = 1,96$. Por último, normalizamos el incremento de MFI respecto al número de integraciones por célula: $1,96 / 1,03 = 1,9$ (Figura 4).

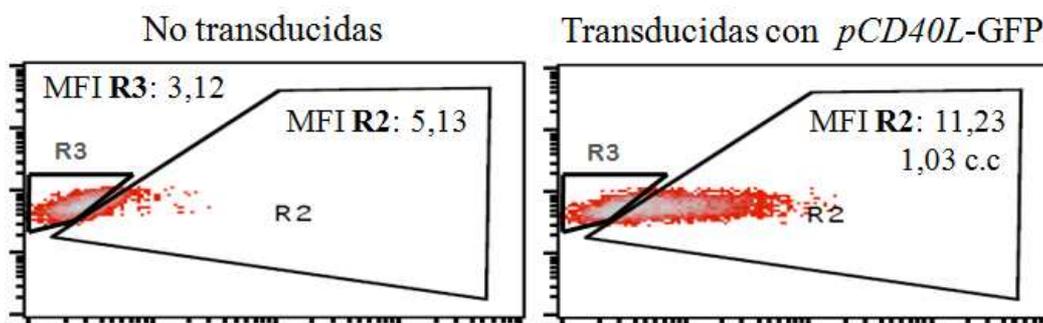


Figura 4: Ejemplo representativo de cómo se determinó la fuerza del promotor *pCD40L*, medida como intensidad media de fluorescencia (MFI) de *eGFP*.

9.- ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T CON PMA E IONOMICINA

La concentración de PMA usada fue de 5ng/ml y la de ionomicina de 0,5 µg/ml. En función del número de células necesario en cada caso se trabajó en placas de 6 a 24 pocillos, pero las concentraciones de PMA e ionomicina usadas fueron siempre las dadas arriba. Las células fueron recogidas y lavadas con PBS; se resuspendieron en el volumen de medio deseado y se añadieron el PMA y la ionomicina, dejándose incubar durante toda la noche a 37°C. Las células fueron utilizadas al día siguiente para el correspondiente experimento.

10.- ENSAYOS DE RESCATE FENOTÍPICO

Con el objetivo de determinar si la proteína CD40L expresada por las células transducidas con nuestros vectores era funcional diseñamos los experimentos de rescate fenotípico que se mostrarán a continuación. Como se ha dicho anteriormente, la deficiencia de CD40L no interfiere directamente en la supervivencia de los linfocitos T, si no que afecta a la segunda señal de activación de los linfocitos B. Por ello, los experimentos de rescate fenotípico se centraron en determinar si el CD40L expresado por las células transducidas era capaz de

inducir esa segunda señal y los cambios que en las células B se producen como consecuencia: cambio de isotipo y proliferación celular.

10.a. Proliferación de células B

Las células B utilizadas fueron extraídas de muestras de amígdala. La purificación y caracterización de estas células fue llevada a cabo por la Dra. Raquel Muñoz Fernández (Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Centro de Investigación Biomédica); obteniéndose una pureza de un 90% de células positivas para CD19⁺.

La medida de proliferación celular se realizó mediante marcaje de las células B con CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*). Previamente al marcaje las células B fueron lavadas dos veces con PBS, con FBS al 0,1%. El marcaje se realizó añadiendo 0,5 µl de CFSE (5 mM) por cada 20x10⁶ células/ml (obteniéndose una concentración final de CFSE de 2,5 µM). Se incubó la mezcla durante 5 minutos a 37°C, en oscuridad. A continuación, se inactivó el CFSE con FBS. Una vez marcadas las células fueron lavadas dos veces con PBS.

La medida de la proliferación celular se realizó mediante co-cultivo de las células B marcadas con CFSE con las células T (Jurkat) transducidas con los vectores lentivirales o las células T usadas como controles, a razón de 10⁵ células B con 10⁵ células T, por pocillo, en placas de 96 pocillos. Previamente, las células T fueron tratadas con Mitomicina C para evitar su proliferación; para esto se usó 50 µg de Mitomicina C (1 mg/ml) por cada 10⁶ células/ml durante dos horas a 37°C y después fueron lavadas tres veces con PBS.

Las células fueron cultivadas en RPMI 1640 (10% FBS, 1% de glutamax y 1% penicilina-estreptomicina) suplementado con IL-4 e IL-5 (Pepro tech), ambas a 10 ng/ml. Las células se mantuvieron en estas condiciones durante una semana, al cabo de la cual se midió la proliferación celular por citometría de flujo.

RESULTADOS

Como se ha descrito en la introducción, *CD40L* es un gen inducible con un estricto patrón de regulación y de expresión tisular. Por tanto, la función de su proteína depende del correcto funcionamiento de estos mecanismos. La importancia de la correcta expresión de *CD40L* es crítica en el contexto general de la respuesta inmune, como se pone de manifiesto no sólo por la aparición del Síndrome de Hiper IgM como consecuencia de su mutación, sino en los ejemplos de síndromes linfoproliferativos en aquellos casos en los que se ha intentado corregir la enfermedad mediante aproximaciones experimentales que conllevaban la expresión ectópica y no regulada del transgen [81]. Por este motivo, cualquier tipo de abordaje de terapia génica para el tratamiento de X-HIGM1 necesitará de vectores que permitan una expresión del transgen tejido-específica, fisiológica y regulada. Con el propósito de avanzar hacia este objetivo, hemos diseñado un conjunto de vectores lentivirales que cumplan los requisitos antes mencionados, como punto de arranque para el desarrollo de una estrategia de terapia génica eficiente y segura en estos pacientes.

1.- CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES LENTIVIRALES

El ADNc de *CD40L*, obtenido de linfocitos de sangre periférica (PBLs), fue amplificado por PCR, purificado y subclonado en el plásmido intermediario pCRII-Blunt-TOPO, para su posterior clonaje en los vectores lentivirales. El vector lentiviral pHR' SIN cppt-SEW utilizado en nuestro estudio para construir el vector lentiviral S-CD40L contiene el LTR del virus SFFV (*Spleen Focus Forming Virus*) dirigiendo la expresión de *eGFP*, el elemento regulador post-transcripcional WPRE (*Woodchuck posttranscripcional regulatory element*) y el fragmento central de polipurina (cPPT). Mediante digestión con las enzimas de restricción BamHI y XhoI se escindió *eGFP* y WPRE, sustituyéndose por el ADNc de *CD40L* subclonado en pCRII-Blunt-TOPO (Figura 5).

El vector W-CD40L fue construido a partir del vector lentiviral pHR' SIN cppt-WW, en el que el promotor proximal de *Was* de 500 pb, dirige la expresión de *Was* [57]. En este caso la doble digestión enzimática BamHI-XhoI nos permitió sustituir el ADNc de *Was* por el de *CD40L* (Figura 5). En la figura 6 se

muestra un ejemplo del patrón de restricción observado durante el clonaje de los vectores S-CD40L y W-CD40L.

La secuencia del promotor de *CD40L* elegida para la construcción del vector *pCD40L-CD40L*, se extiende desde -1294 pb hasta -23 pb. Esta secuencia fue escindida del plásmido de subclonaje pMK por digestión enzimática BamHI-ClaI. Del mismo modo se digirió el vector lentiviral S-CD40L con BamHI-ClaI, para eliminar el promotor SFFV, en cuyo lugar se clonó el promotor de *CD40L* (Figura 5).

El vector *pCD40-GFP* fue generado a partir del vector *pCD40L-CD40L*, en el que se escindió el ADNc de *CD40L* por doble digestión con BamHI-XhoI. A partir del vector SE, (derivado de pHR' SIN cppt-SEW, tras la escisión de WPRE), se obtuvo *eGFP* por doble digestión con BamHI-XhoI, subclonándose en el esqueleto lentiviral reemplazando a *CD40L* (Figura 5).

Cada una de las construcciones fue analizada por digestión diagnóstica. En el caso de S-CD40L y W-CD40L se comprobó la presencia de *CD40L* mediante digestión BamHI-XhoI, que soltaría un fragmento de 920 pb, correspondiente a *CD40L*. El vector *pCD40L-CD40L* fue analizado con EcoRI y PstI y el vector *pCD40L-GFP* con NcoI.

Posteriormente, en todos los casos, los vectores construidos fueron secuenciados en el servicio de secuenciación de Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra” del CSIC mediante los cebadores correspondientes. Los cebadores fueron elegidos de tal manera que arrancasen dentro del esqueleto del vector lentiviral y en la secuencia objeto de análisis, de modo que se verificó no sólo posibles mutaciones de las secuencias, sino también la correcta orientación de las mismas. En la figura 7 mostramos un ejemplo de cómo se llevó a cabo la secuenciación y comprobación de la integridad de los vectores construidos. El vector W-CD40L fue secuenciado utilizando dos cebadores: el “*F previo*” que arranca en el vector lentiviral por delante del promotor de *Was* y el “*R interno*” que se encuentra en el ADNc de *CD40L* (Ver Material y Métodos).

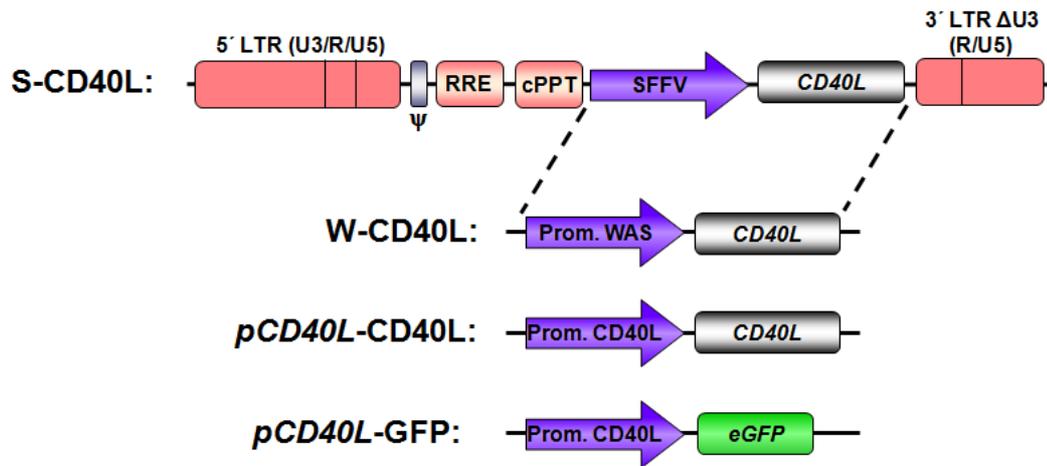


Figura 5: Esquema de los vectores lentivirales construidos. El vector S-CD40L contiene el promotor constitutivo SFFV dirigiendo la expresión de *CD40L*. En W-CD40L la expresión de *CD40L* está bajo el control de un fragmento proximal del promotor de *Was*. En los dos restantes, *pCD40L-CD40L* y *pCD40L-GFP*, el promotor de *CD40L* dirige la expresión de *CD40L* y *eGFP* respectivamente. En la figura las flechas representan a los promotores seguidos por el transgen. RRE: Rev Responsive Element; cPPT: central poly-purine track.

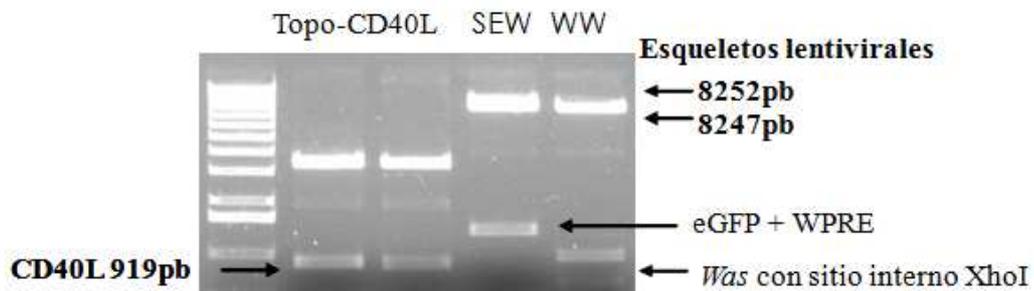


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa mostrando los fragmentos de ADN utilizados para el subclonaje de *CD40L* en los vectores lentivirales S-CD40L y W-CD40L. El plásmido intermediario pCRII-Blunt-TOPO, en el que se subclonó el ADNc de *CD40L*, y los vectores lentivirales de partida SEW y WW fueron sometidos a doble digestión enzimática BamHI-XhoI (B-X). El fragmento B-X de 919 pb correspondiente a *CD40L* se introdujo en los esqueletos lentivirales de SEW (8252 pb) y WW (8247 pb) para construir los vectores S-CD40L y W-CD40L respectivamente.

2.- EL VECTOR S-CD40L EXPRESA EL TRANSGÉN *CD40L* DE FORMA CONSTITUTIVA

Para analizar el comportamiento del vector lentiviral S-CD40L, en el que la expresión de *CD40L* está dirigida a través del promotor de expresión constitutiva SFFV, se transdujeron diversas líneas celulares entre las que se incluían células T CD4⁺ (Jurkat), células de origen mieloide (K562, U937), células epiteliales (293T) y células endoteliales (Ecv304). A los 5-7 días se determinó el porcentaje de expresión de CD40L por citometría de flujo y el número de integraciones del vector por célula mediante PCR cuantitativa. Únicamente se muestra las citometrías de las células Jurkat y 293T como ejemplo representativo del análisis realizado en cada tipo celular (Figuras 8 y 9). En la figura 8 se muestra como CD40L no es detectado en la superficie de estos dos tipos celulares mediante el anticuerpo anti CD40L 24-31.

En todos los estudios donde se realizó inmunodetección de CD40L, la utilización del porcentaje como medida de expresión nos dio una lectura más fiel de la expresión del vector que el incremento en el MFI. Esto se debe a que el fondo (células CD40L⁻ marcadas con el anticuerpo anti-CD40L) obtenido durante las inmunotinciones enmascaraba al MFI de las células transducidas.

En la línea celular Jurkat empleada en los ensayos, la expresión de CD40L no es detectable a través del anticuerpo monoclonal 24-31. Sin embargo, este anticuerpo sí es capaz de detectar la expresión de *CD40L* en células transducidas con los vectores lentivirales conteniendo CD40L.

En la figura 9 se observa cómo el se obtienen niveles similares de *CD40L* en los diferentes tipos celulares transducidos con el vector lentiviral S-CD40L salvo en la línea K562, donde la expresión del vector es más eficiente.

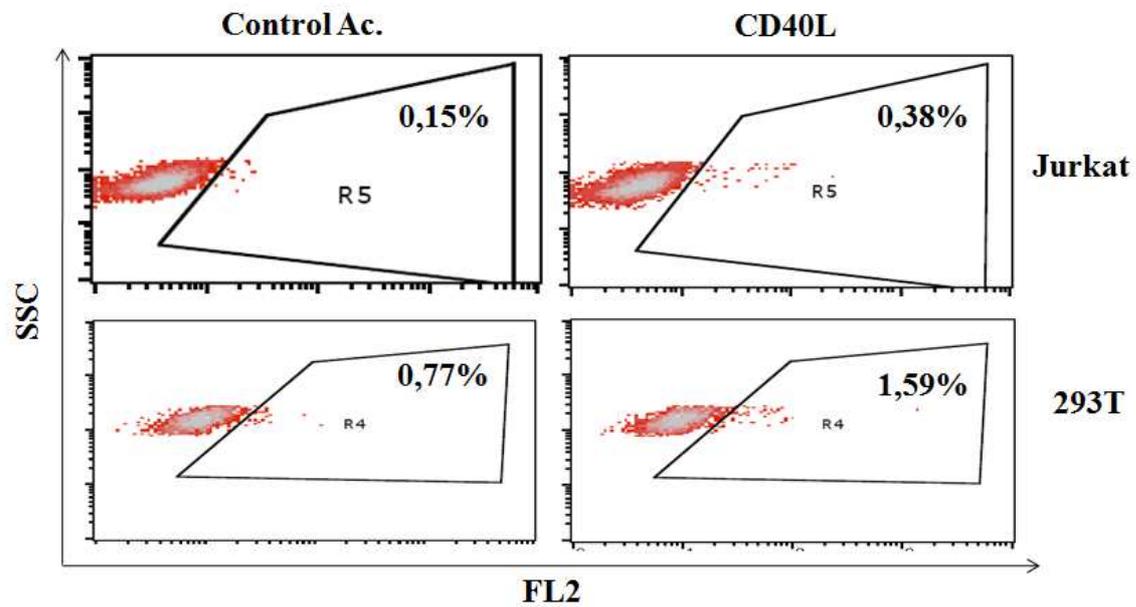


Figura 8: *Las células Jurkat y 293T sin transducir no expresan CD40L.* Citogramas en los que se muestra en los paneles de la izquierda el control del anticuerpo secundario (PE) y en los paneles de la derecha las células no transducidas marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-CD40L (clon 24-31) y el anticuerpo secundario (PE).

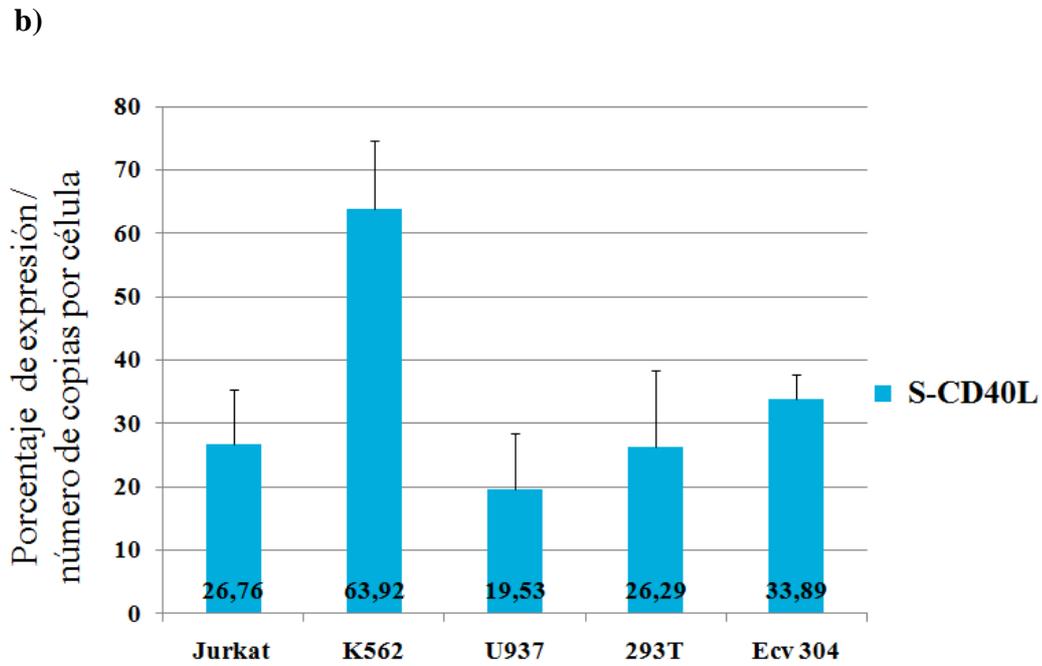
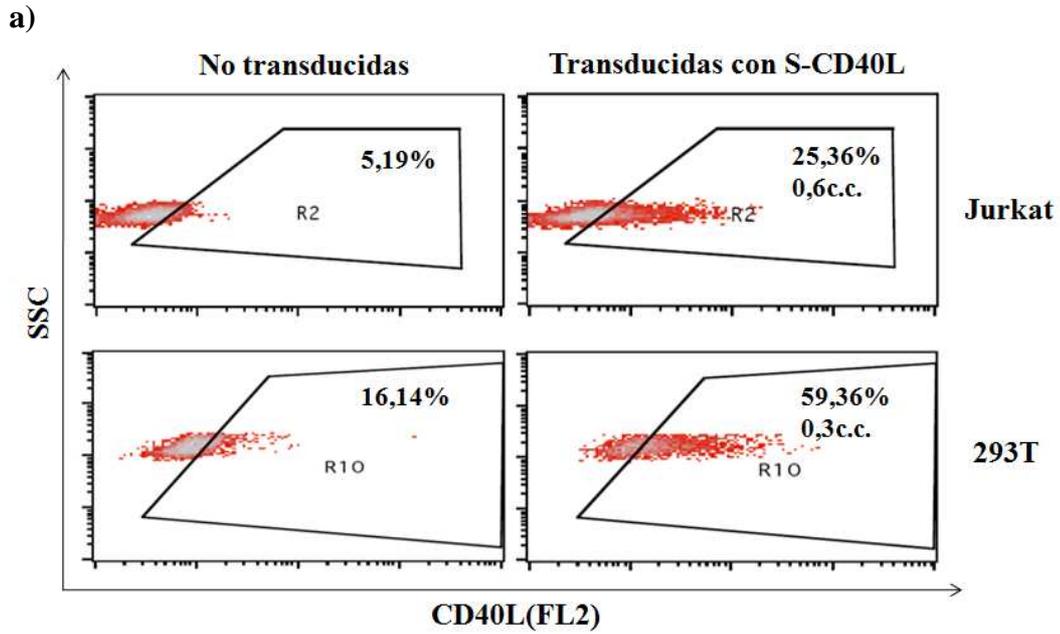


Figura 9: El vector lentiviral S-CD40L obtiene una expresión ubicua del transgen.

a) Citogramas que muestran la expresión de *CD40L* a través del promotor SFFV en células Jurkat, (paneles superiores) y 293T (paneles inferiores). En los dos paneles de la izquierda se muestran las células no transducidas marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-*CD40L* 24-31 más el anticuerpo secundario (PE). En los paneles de la derecha se muestran las células transducidas con el vector S-*CD40L*. En cada citograma se indica el porcentaje de expresión de *CD40L* y el número de copias de vector por célula (c.c), en el caso de las células transducidas. Las regiones se definieron para alcanzar el mayor punto diferencial entre células transducidas y no transducidas.

b) Porcentaje de expresión de *CD40L* a través del promotor constitutivo SFFV, respecto al número de integraciones de vector por célula; en células hematopoyéticas (Jurkat, K562 y U937) y no hematopoyéticas (293T y Ecv 304). El porcentaje de expresión representado es el resultado de restarle al porcentaje de expresión de *CD40L* a través del promotor SFFV el porcentaje de expresión de *CD40L* de su control correspondiente sin transducir. A continuación el valor obtenido se normalizó respecto al número de integraciones por célula.

3.- LA EXPRESIÓN DE *CD40L* A TRAVÉS DEL PROMOTOR DE *Was* ESTÁ RESTRINGIDA A CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

La utilización del promotor de *Was* para dirigir la expresión de *CD40L* (vector W-CD40L) tiene como objetivo lograr una expresión moderada y hematopoyético-específica, tal y como se ha demostrado previamente para la expresión de *Was*. El análisis del comportamiento del vector W-CD40L se realizó de manera similar al del vector S-CD40L: se transdujo el mismo panel de células, se determinó el porcentaje de expresión de *CD40L* por citometría de flujo y el número de integraciones por célula por PCR cuantitativa. Los resultados son mostrados en la figura 10 donde puede observarse cómo la expresión del vector W-CD40L se restringe a las células hematopoyéticas (Jurkat, K562, U937).

Así, en la figura 10a se observa que en las células Jurkat, 1,2 integraciones de vector por célula inducen un porcentaje de expresión del 24,20% (resultante de restar la expresión basal de *CD40L* de las células sin transducir, al porcentaje de expresión a través del vector W-CD40L: 29,39 - 5,19) mientras que en las células 293T, 3,0 integraciones de vector por célula expresan niveles indetectables de *CD40L*.

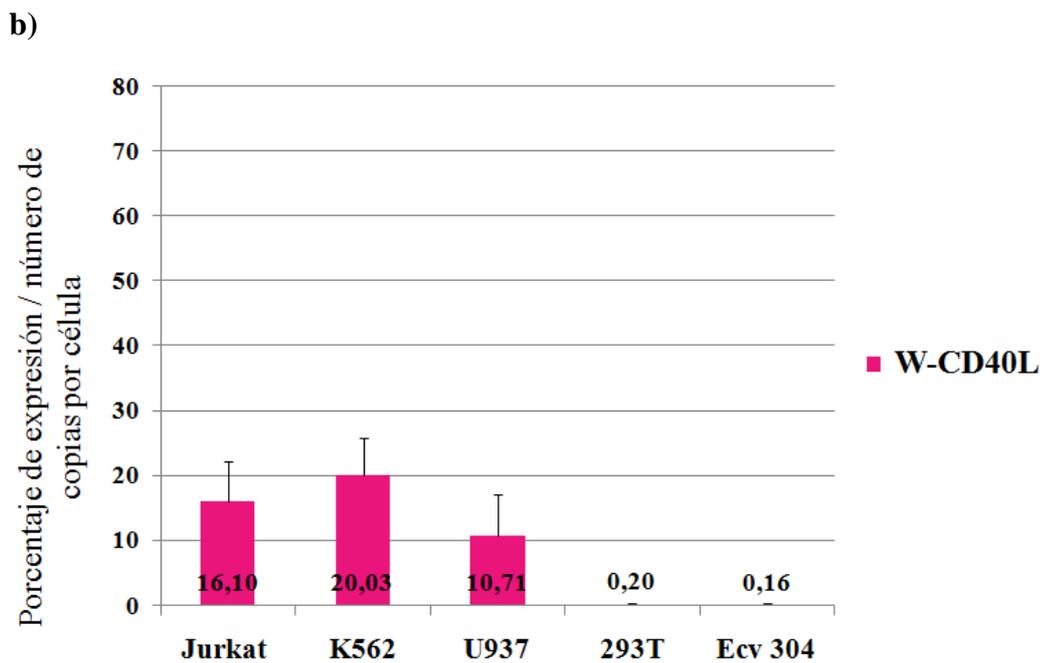
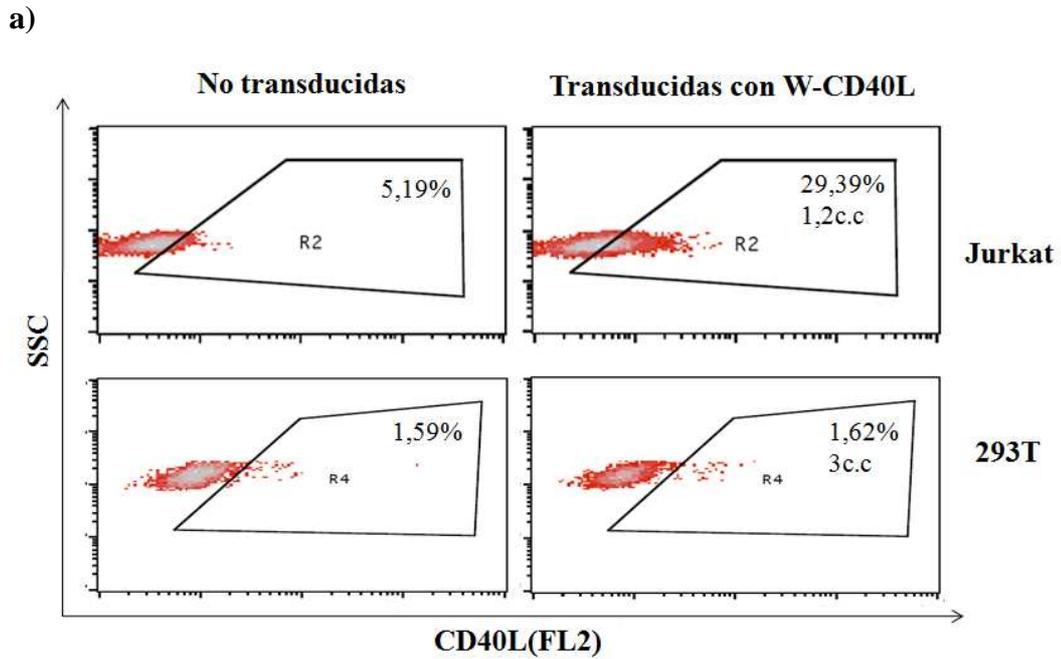


Figura 10: El vector W-CD40L es hematopoyético-específico. a) Citogramas que muestran la expresión de *CD40L* obtenida mediante la transducción de células Jurkat (paneles superiores) y 293T (paneles inferiores) con el vector W-CD40L. En los dos paneles de la izquierda se muestra las células no transducidas marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-*CD40L* 24-31, más el anticuerpo secundario (PE). En los paneles de la derecha se muestran las células transducidas con el vector W-CD40L. En cada citograma se indica el porcentaje de expresión de *CD40L* y el número de copias de vector por célula (c.c), en el caso de las células transducidas. Las regiones se definieron para alcanzar el mayor punto diferencial entre células transducidas y no transducidas. b) Gráfica mostrando la proporción entre los porcentajes de expresión del vector W-CD40L relativo al número de integraciones por célula en células hematopoyéticas (Jurkat, K562 y U937) y no hematopoyéticas (293T y Evc 304). El porcentaje de expresión representado es el resultado de restar al porcentaje de expresión de *CD40L* a través del promotor *Was* el porcentaje de expresión de *CD40L* de su control correspondiente sin transducir. A continuación, el valor obtenido se normalizó respecto al número de integraciones por célula.

4.- LOS VECTORES LENTIVIRALES DIRIGIDOS POR EL PROMOTOR DE *CD40L* SIGUEN UN PATRÓN FISIOLÓGICO

En condiciones ideales, los vectores que se utilicen en ensayos de terapia génica deberían expresar el transgen terapéutico siguiendo el mismo patrón que el gen endógeno. Con esta finalidad se construyeron los vectores lentivirales *pCD40L-GFP* y *pCD40L-CD40L* que nos permitirían, por un lado, estudiar en detalle el patrón de expresión del promotor de *CD40L* en un entorno lentiviral y, por otro, analizar el potencial de un vector terapéutico para X-HIGM1 basado en la expresión fisiológica de *CD40L*. Para la construcción de estos vectores lentivirales se usó un fragmento de 1,2 Kb perteneciente al promotor de *CD40L* situado en dirección 5' del gen. Este fragmento fue descrito por Schubert *et al* [128], quienes demostraron que es suficiente para inducir la expresión de *CD40L* en los linfocitos T activados.

4.a. El fragmento del promotor *CD40L* contenido en el vector lentiviral *pCD40L-GFP* expresa *eGFP* siguiendo el mismo patrón que el *CD40L* endógeno

La falta de modelos celulares humanos deficientes para *CD40L*, así como la escasez de muestras de pacientes, imposibilitan el análisis en detalle del patrón de expresión de estos vectores. Por este motivo, elegimos para el análisis funcional del fragmento seleccionado como promotor de *CD40L* un sistema que nos permitiese una fácil detección del mismo. El sistema seleccionado fue la expresión de la proteína verde fluorescente (eGFP), como gen marcador de la actividad del promotor de *CD40L* en un entorno lentiviral, para lo que se procedió a construir el vector lentiviral *pCD40L-GFP*. Este vector nos permitió analizar el patrón de expresión del promotor de *CD40L* en cualquier tipo celular (medido en función de los niveles de eGFP) y compararlo con el patrón de expresión de *CD40L* endógeno.

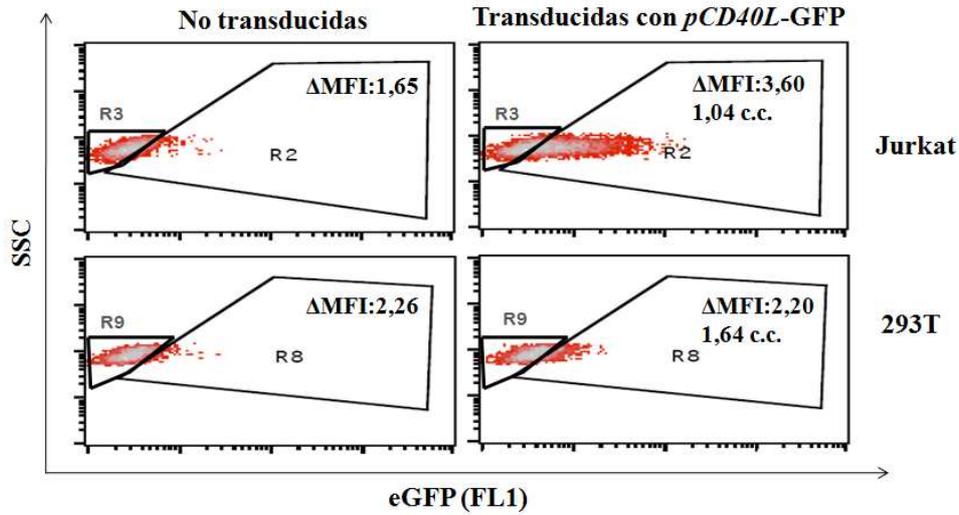
4.a.1. El vector *pCD40L-GFP* se expresa preferentemente en líneas celulares $CD40L^+$

Los primeros estudios se centraron en comparar el patrón de expresión del vector *pCD40L-GFP* con los niveles de expresión de *CD40L* en las células utilizadas. Para ello se transdujo el mismo panel de células que en los casos anteriores, y se analizó el perfil de expresión de todas ellas, tanto para *eGFP* (expresado a través del vector) como para *CD40L*, así como el número de integraciones por célula. La figura 11a muestra el incremento de la Intensidad Media de Fluorescencia (Δ MFI) en células Jurkat y 293T transducidas con estos vectores. El Δ MFI se calculó como el cociente de la MFI de la población positiva (R2 y R8 en Jurkat y 293T respectivamente) entre la MFI de la población negativa (R3 y R9 en Jurkat y 293T respectivamente). En la figura 11b se detalla cómo el vector *pCD40L-GFP* se expresa eficientemente en células hematopoyéticas (Jurkat y K562), mientras que no lo hace en aquellas líneas celulares analizadas pertenecientes a linajes no hematopoyéticos.

4.a.2. La expresión de eGFP conseguida por el vector *pCD40L-GFP* es inducible por activación celular

El siguiente paso en el estudio funcional del promotor de *CD40L* fue verificar su carácter inducible por activación en células T [128], en el contexto de un vector lentiviral. Con este objetivo se analizaron los niveles de expresión de *eGFP* en células Jurkat transducidas con el vector lentiviral *pCD40L-GFP*, antes y después de la activación con PMA e ionomicina. Tras la activación de las células transducidas mediante el tratamiento con los agentes indicados, la expresión de *eGFP* aumentó de un 37,02% a un 51,34%, registrando además un incremento en MFI de 1,34 (Figura 12).

a)



b)

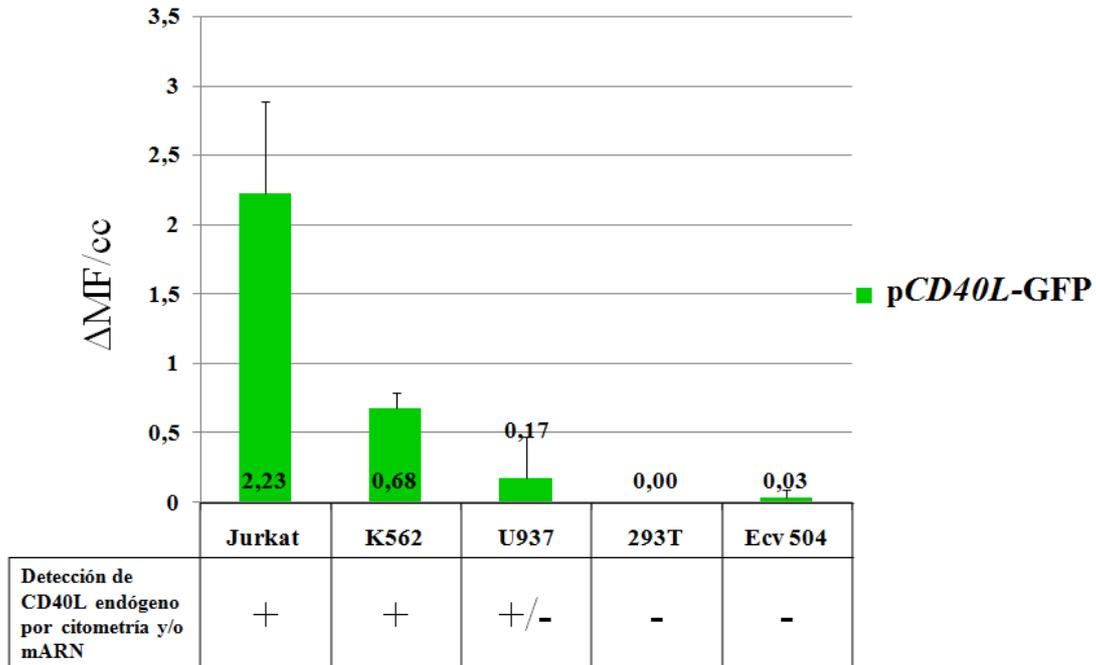


Figura 11: El vector *pCD40L-GFP* restringe la expresión de *eGFP* a células hematopoyéticas.

a) Citogramas que muestran la expresión de *eGFP* en células Jurkat (paneles superiores) y 293T (paneles inferiores) transducidas con el vector *pCD40L-GFP*. A la izquierda se muestran las células control no transducidas y a la derecha las células transducidas con dicho vector. En cada citograma se representa el incremento de la Intensidad Media de Fluorescencia (Δ MFI) de *eGFP* y el número de copias de vector por célula (c.c), en el caso de las células transducidas. Las regiones se definieron para alcanzar el mayor punto diferencial entre células transducidas y no transducidas. El Δ MFI se calculó respecto a la población negativa. **b)** Incremento de la intensidad media de fluorescencia respecto al número de integraciones de vector por célula. Se midió la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) por citometría de flujo, como parámetro de fuerza del promotor, y se normalizó respecto al número de integraciones por célula (ver Material y Métodos). En la parte inferior de la figura se indica en qué células se detectó expresión de CD40L endógeno, mediante citometría de flujo y/o mRNA.

Células Jurkat transducidas con *pCD40L-GFP*

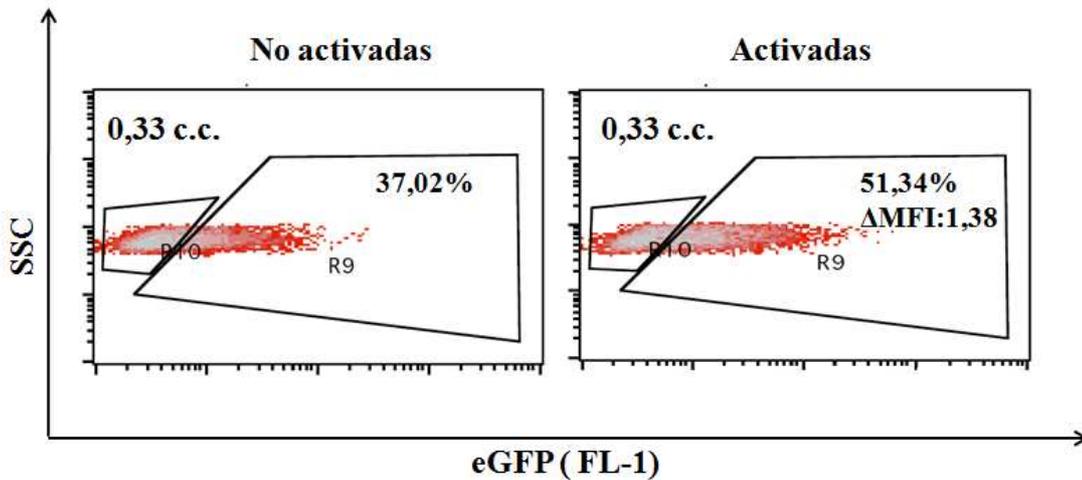


Figura 12: La expresión de *eGFP* obtenida por el vector *pCD40L-GFP* es inducible por activación en células Jurkat. El citograma de la izquierda muestra la expresión de *eGFP* en células Jurkat transducidas con el vector *pCD40L-GFP* sin activar. A la derecha se muestra la expresión de *eGFP* en las mismas células tras su activación con PMA e Ionomicina. En el margen superior izquierdo de cada citograma se indica el número de integraciones por célula y en el derecho el porcentaje de expresión y el incremento de la Intensidad Media de Fluorescencia (Δ MFI), en el caso de las células activadas. El Δ MFI se determinó como el cociente resultante entre el MFI en R9 de las células tras la activación y el MFI de R9 en las células sin activar.

A continuación, se comprobó si el carácter inducible del promotor de *CD40L* en el contexto de un vector lentiviral se mantendría en linfocitos T primarios. Para ello se procedió igual que en el caso anterior, transduciendo linfocitos T primarios con el vector *pCD40L-GFP* para analizar la expresión de *eGFP*, antes y después de su activación. Este ensayo permitió analizar, a través de *eGFP*, la modulación del promotor de *CD40L* en los vectores lentivirales, y compararla con la modulación del promotor endógeno mediante el análisis de la expresión de *CD40L* en los linfocitos T primarios transducidos. Para poder realizar este ensayo las células fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-*CD40L* (clon 24-31) y se usó, para su detección un anticuerpo secundario marcado con APC, evitando, así, que la expresión de *eGFP* interfiriese en la detección de *CD40L* (ver Material y Métodos).

En la figura 13 se muestra el patrón de expresión de *CD40L* en linfocitos T primarios, dependiente de activación. Se observa que la expresión de *CD40L* se induce de un 15,0% a un 98,7% con un incremento de MFI de 8,12, tras la activación.

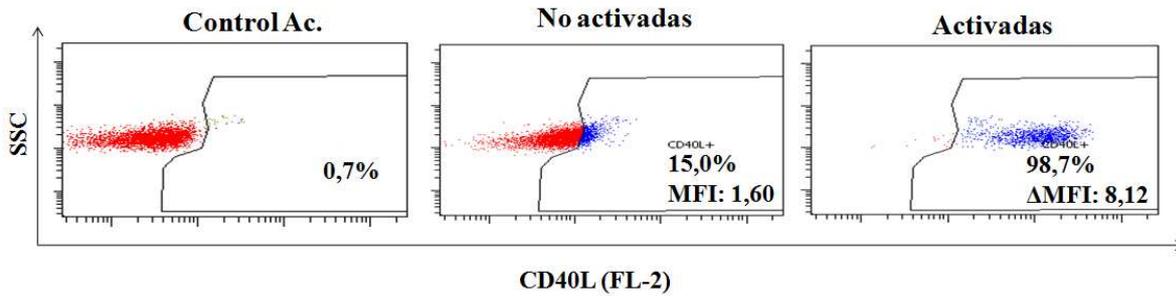


Figura 13: La expresión de *CD40L* en linfocitos T primarios es inducida por activación. En el panel de la izquierda se muestra el control del anticuerpo secundario; en el panel central las células previa activación y en el panel de la derecha las células tras la activación. En el margen inferior derecho de cada citograma se representa el porcentaje de expresión de *CD40L* y el incremento en MFI en el caso de las células activadas.

En la figura 14 se muestra en paralelo la expresión de *CD40L* y *eGFP* en linfocitos T primarios antes y después de ser activados. Se observa que tras la activación la expresión de *eGFP* incrementa de un 2,8% a un 6,6% con un incremento de MFI de 1,77 (Figura 14b).

En la figura 14b se representa la población de linfocitos T primarios *eGFP*⁺, antes y después de la activación; asimismo en el histograma de la figura 14c se muestra la expresión de *CD40L* a través del promotor endógeno previa y post-activación, en esta misma población *eGFP*⁺.

Linfocitos T primarios transducidos con
pCD40L-GFP

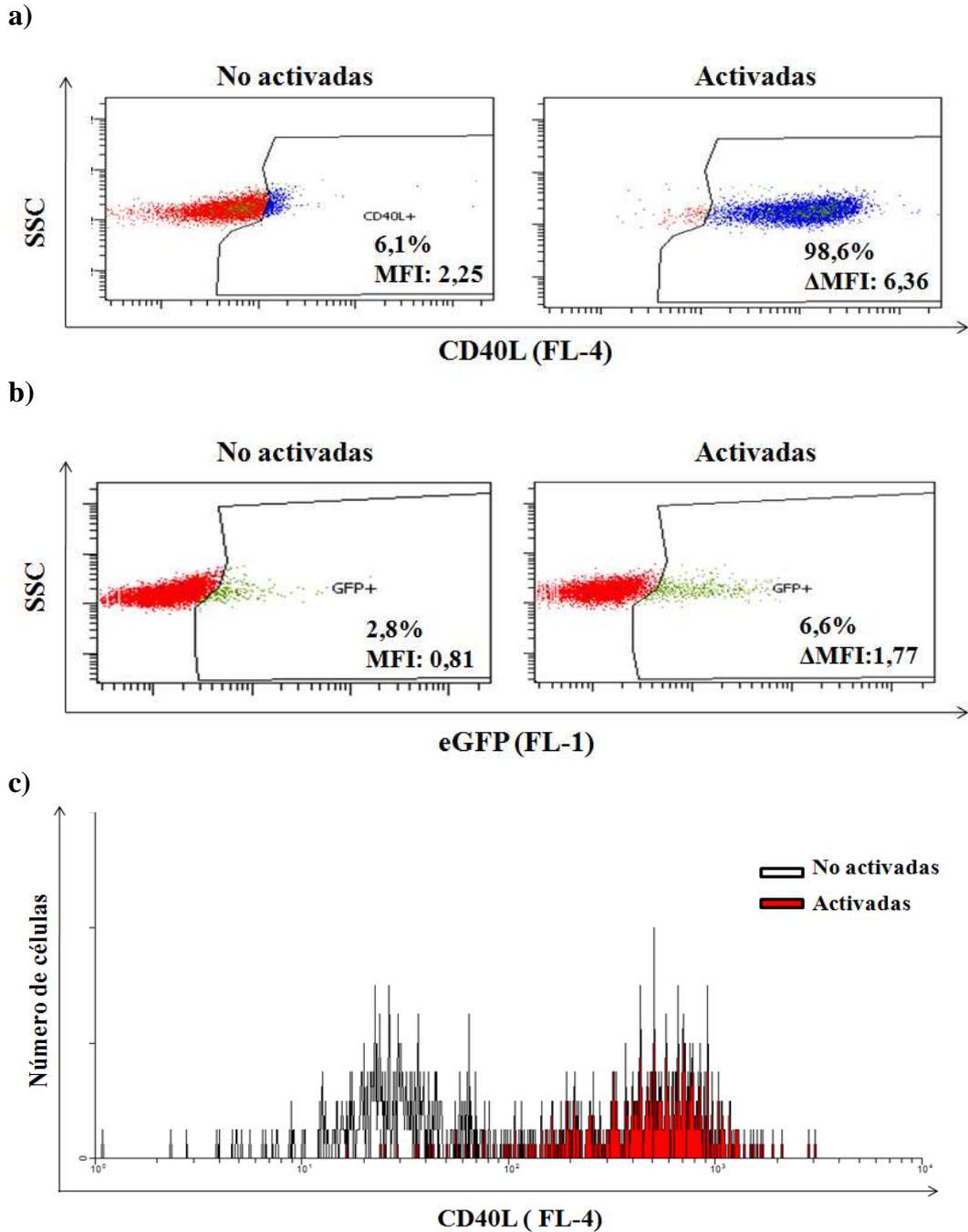


Figura 14: La expresión de *eGFP* dirigida por el vector *pCD40L-GFP* es inducible por activación en linfocitos T primarios. **a)** Citogramas en los que se muestra la expresión de *CD40L* endógeno, antes y después de la activación, mediante tinción con el anticuerpo monoclonal anti-*CD40L* (clon 24-31) y el anticuerpo secundario (APC). Se muestra cómo la transducción con *pCD40L-GFP* no interfiere con la modulación y expresión endógena de *CD40L* (Ver Figura 13). **b)** Citogramas en los que se representa la expresión de *eGFP* a través del promotor de *CD40L* en las mismas células, antes y después de ser activadas. **c)** Niveles de expresión de *CD40L* en la población *eGFP*⁺ antes y después de la activación. La población representada en el histograma se corresponde con la población *eGFP*⁺ de la figura **b)**.

4.b. El vector *pCD40L*-CD40L expresa *CD40L* siguiendo un patrón fisiológico

4.b.1. La expresión de *CD40L* a través del vector *pCD40L*-CD40L es residual en células hematopoyéticas no activadas

Se comprobó si el comportamiento del promotor de *CD40L* dirigiendo la expresión de *CD40L*, en un vector lentiviral (*pCD40L*-CD40L), sería similar a lo observado a través del vector *pCD40L*-GFP. Para el análisis del vector lentiviral *pCD40L*-CD40L se transdujo el mismo panel de células que en los casos anteriores, determinando el porcentaje de expresión y el número de integraciones.

En la figura 15 se muestran los citogramas en los que se representa la expresión del vector *pCD40L*-CD40L en los cinco tipos celulares analizados. Se observa que dentro del grupo de las células hematopoyéticas, sólo hay trazas de expresión de *CD40L* endógeno en Jurkat y K562. En el caso de las células Jurkat, en las que el anticuerpo monoclonal empleado no detecta *CD40L* endógeno, se corroboró la expresión del mismo por ARN mensajero, mientras que en las células K562 se aprecia una pequeña expresión endógena de *CD40L* de un 4,12% (6,72-2,60%). Si se comparan los niveles expresión del vector *pCD40L*-CD40L con la expresión endógena de *CD40L*, se advierte que sólo se detectan niveles bajos de expresión del vector en las líneas celulares que fisiológicamente expresan *CD40L*, a pesar de que estos niveles sean mínimos.

El análisis de citometría de flujo llevado a cabo a partir de los citogramas de la figura 15 es normalizado en los datos representados en la figura 16, en la que se representa el cociente entre el porcentaje de expresión de *CD40L* relativo al número de integraciones por célula.

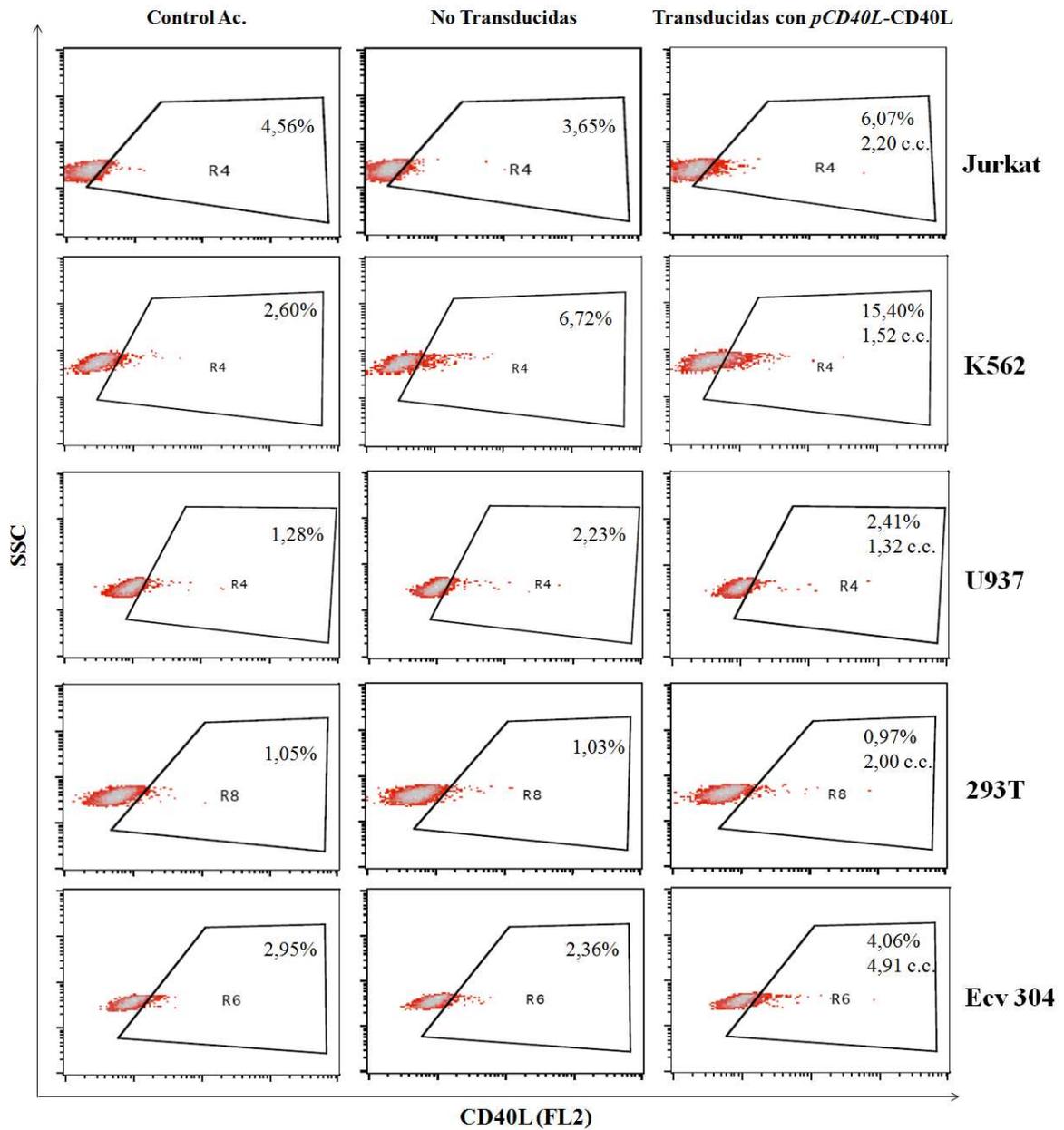


Figura 15: Expresión de CD40L a través del vector *pCD40L-CD40L* en diferentes tipos celulares. Citogramas que muestran la expresión de CD40L a través del vector *pCD40L-CD40L* en células hematopoyéticas (Jurkat, K562, U937) y no hematopoyéticas (293T y Ecv304 respectivamente). En los paneles de la izquierda se muestra el control del anticuerpo secundario (PE); en los paneles centrales las células no transducidas marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-CD40L (clon 24-31) y el anticuerpo secundario (PE); y en los paneles de la derecha se muestran las células transducidas con el vector *pCD40L-CD40L*. En la esquina superior derecha de cada citograma se indica el porcentaje de expresión de CD40L y el número de copias de vector por célula (c.c.), en el caso de las células transducidas. Las regiones se definieron para alcanzar el mayor punto diferencial entre células transducidas y no transducidas.

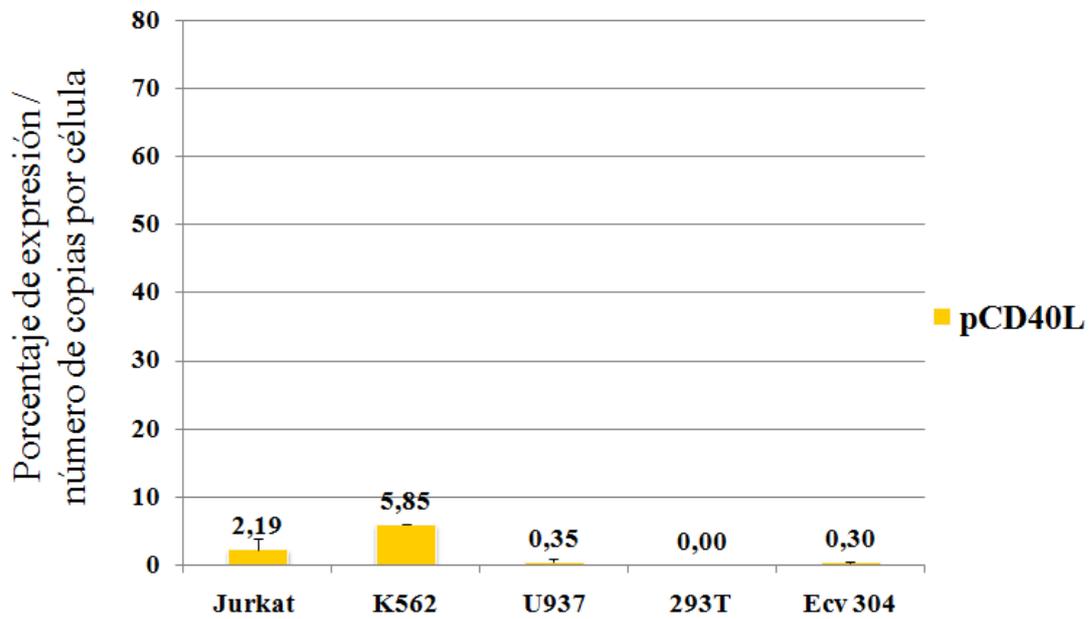


Figura 16: *El promotor de CD40L tiene un comportamiento fisiológico dirigiendo la expresión de CD40L en un entorno lentiviral.* Gráfica mostrando el cociente entre los porcentajes de expresión del vector *pCD40L-CD40L* relativo al número de integraciones por célula en células hematopoyéticas (Jurkat, K562 y U937) y no hematopoyéticas (293T y Evc 304). El porcentaje de expresión representado es el resultado de restarle al porcentaje de expresión de *CD40L* a través del promotor de *CD40L* el porcentaje de expresión de *CD40L* de su control correspondiente sin transducir. A continuación el valor obtenido se normalizó respecto al número de integraciones por célula.

4.b.2. La expresión de *CD40L* dirigida por el vector *pCD40L-CD40L* es inducible en células T

Con el objetivo de determinar si la expresión de *CD40L* a través de su promotor en un entorno lentiviral conservaba su carácter inducible se transdujeron células Jurkat con el vector lentiviral *pCD40L-CD40L* y se analizó la expresión de *CD40L* antes y después de la activación mediante PMA e ionomicina. Como control positivo de la expresión de *CD40L* se utilizaron linfocitos T primarios, y como control negativo células Jurkat, sin transducir. La estimulación celular induce la expresión de *CD40L* en las células Jurkat transducidas (Figura 17).

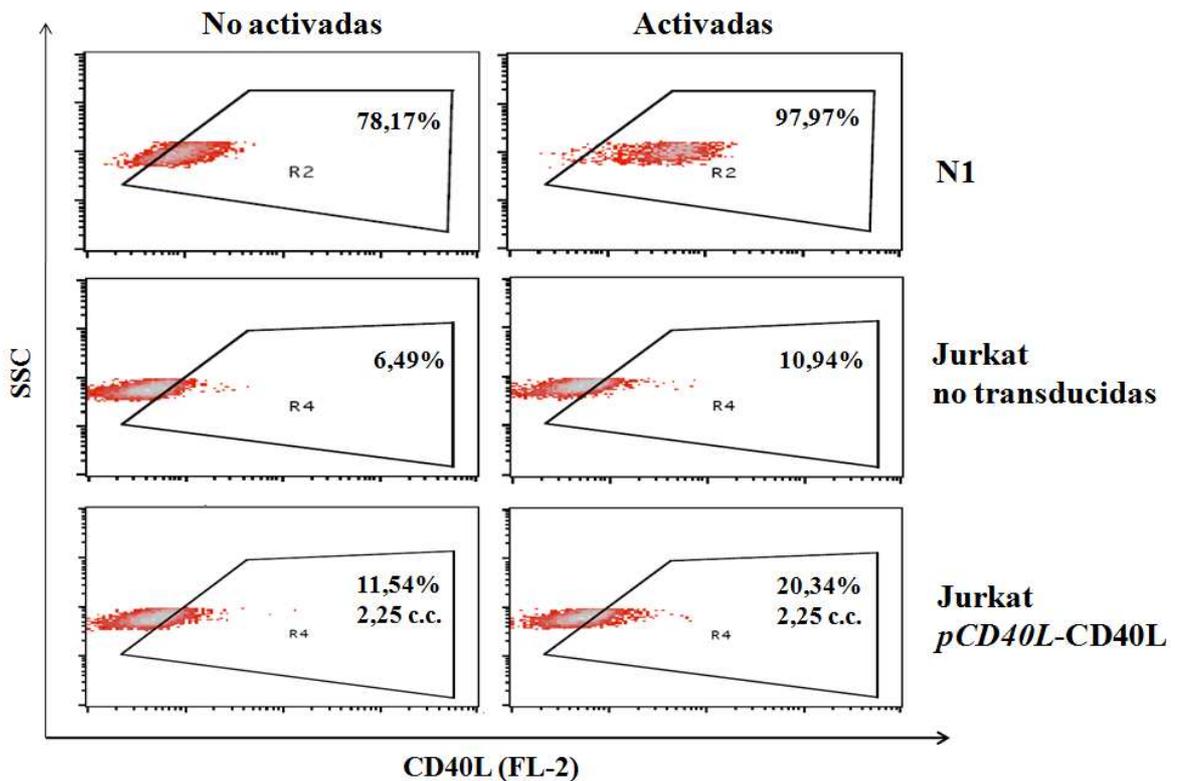


Figura 17: La expresión de *CD40L* dirigida por el vector *pCD40L-CD40L* es inducible en células T (Jurkat). Citogramas en los que se representa la expresión de *CD40L* antes y después de la activación. En los paneles superiores se muestra el control positivo: linfocitos T primarios (N1); en los paneles centrales el control negativo: células Jurkat no transducidas; y en los paneles inferiores se muestran las células Jurkat transducidas con el vector *pCD40L-CD40L*. En la esquina superior derecha se indican el porcentaje de expresión de *CD40L* y el número de integraciones por célula (c.c.) en el caso de las células transducidas. Las regiones se definieron para alcanzar el mayor punto diferencial entre células transducidas y no transducidas.

5.- ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA CD40L EXPRESADA A TRAVÉS DE VECTORES LENTIVIRALES

Para analizar la funcionalidad de la proteína CD40L expresada a través de los vectores lentivirales se estudió la capacidad que las células transducidas con CD40L tenían para sustentar la proliferación de células B mediante CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*). Para ello, las células B fueron mantenidas en cultivo con células T transducidas con los vectores lentivirales S-CD40L y *pCD40L*-CD40L, con el objetivo de determinar si la proteína CD40L expresada a través de estos vectores era capaz de activar a las células B e inducir proliferación de las mismas. Como control positivo de este ensayo se puso en cocultivo con las células B linfocitos T primarios; y como control negativo células Jurkat sin transducir (Figura 18).

Las células Jurkat transducidas con *pCD40L*-CD40L, que fueron cocultivadas con las células B, presentan 14,2 integraciones de vector por célula; mientras que las transducidas con S-CD40L presentan 5 integraciones por célula.

En las células B mantenidas solas en cultivo no se detecta proliferación, mientras que el resto de los casos se observa que la proteína CD40L expresada por las células T transducidas por los vectores lentivirales S-CD40L y *pCD40L*-CD40L es funcional, ya que en ambos casos son capaces de coadyuvar la proliferación de las células B.

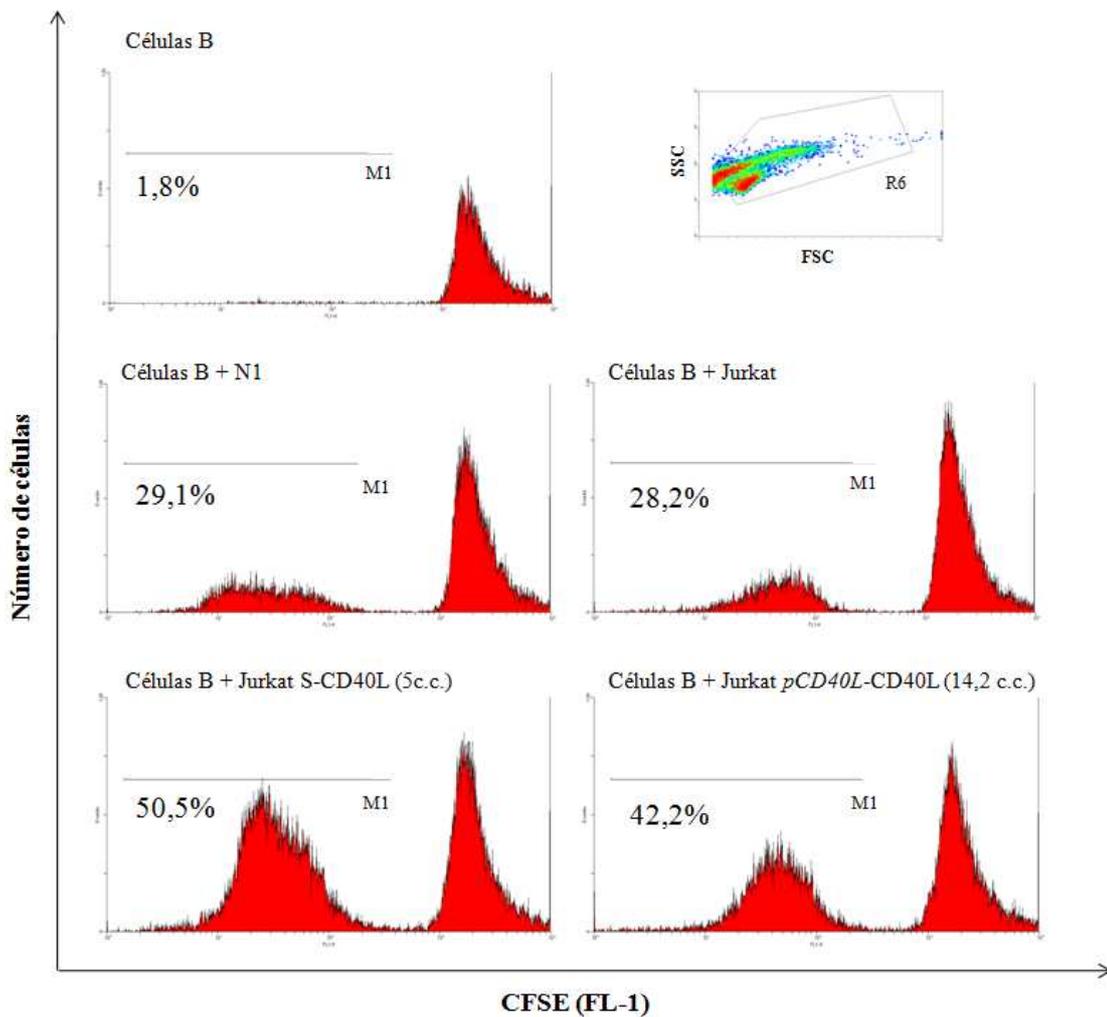


Figura 18: Proliferación de células B tras activación por células T transducidas con vectores lentivirales que expresan CD40L. En la figura se indica la proliferación de células B medida mediante CFSE. En la esquina superior derecha se muestra la población de células B seleccionada para el análisis según tamaño y granulosidad. En el panel superior izquierdo se presentan las células B control que no fueron co-cultivadas con células T. En los paneles de en medio se presentan las células B co-cultivadas con linfocitos T primarios (N1) a la izquierda, y con células Jurkat a la derecha. En los paneles inferiores se muestran las células B co-cultivadas con células Jurkat transducidas con el vector S-CD40L a la derecha; y con el vector *pCD40L-CD40L* a la izquierda. En cada histograma se indica, a la izquierda, el porcentaje de células B que han proliferado y en el caso de las células T transducidas el número de integraciones de vector por célula (c.c.).

DISCUSIÓN

El tratamiento de X-HIGM1 mediante terapia génica requiere el desarrollo de vectores que expresen *CD40L* lo más fisiológicamente posible. *CD40L* se expresa específicamente en las células T activadas de forma transitoria y fuertemente regulada a nivel transcripcional [100]. Además, existen mecanismos que aseguran la pérdida de expresión de *CD40L* tras la interacción CD40-CD40L: procesos de endocitosis y degradación en lisosomas, procesos proteolíticos y descenso de los niveles de mensajero de *CD40L*. Esta expresión finamente regulada es muy relevante debido al importante papel de CD40L en la activación de la respuesta inmune humoral y celular, que, como ya se ha señalado en la introducción, afecta a la formación de centros germinales, a la activación y escape de la apoptosis de las células B, y, muy notablemente, a la proliferación de estos tipos de células y a los mecanismos responsables del cambio de isotipo [97, 101]

Esta fina regulación génica es, sin ninguna duda, un considerable obstáculo inicial ante la perspectiva del desarrollo de protocolos de terapia génica en pacientes con X-HIGM1. No obstante, no es el único. En efecto, el hecho de que las mutaciones en *CD40L* no afecten a la supervivencia de los linfocitos T supondría que las células rescatadas en los pacientes (expresando el gen *CD40L* funcional) no tendrían ventaja selectiva sobre las no transducidas. Hay que recordar que la ventaja selectiva de las células reconstituidas ha sido de gran importancia en el éxito de los ensayos de terapia génica llevados a cabo hasta el momento en la inmunodeficiencia combinada severa. Por tanto, estos obstáculos dibujan las dos características que ha de tener cualquier vector terapéutico para X-HIGM1: (1) una elevada eficiencia de transferencia génica y (2) una expresión de *CD40L* finamente regulada.

Los mecanismos reguladores de *CD40L* han supuesto, de hecho, el principal obstáculo para el desarrollo de un protocolo de terapia génica en esta enfermedad. Así, ya se ha puesto de manifiesto por trabajos previos que la expresión ectópica y/o desregulada de *CD40L* producía fenómenos de transformación celular, que daban lugar a un síndrome linfoproliferativo [81, 84]. En el caso de Brown *et al.* [81] la expresión constitutiva de *CD40L* en los timocitos en desarrollo condujo a transformación neoplásica. Los autores de este trabajo barajaron la hipótesis de que el origen de esta transformación podría ser

una interacción aberrante entre timocitos $CD40L^+$ y timocitos $TCR\alpha\beta^+CD40^+$ (generada como consecuencia de fallos en los mecanismos apoptóticos de eliminación de los timocitos “defectuosos”). Por otro lado, el grupo de Vezzoni [84] observó que la expresión ectópica de *CD40L* generada por un promotor constitutivo era letal, mientras que la sobreexpresión de *CD40L* a través del LTR del retrovirus de linfocitos T humanos (HTLVI) en células T fue tolerada, pero forzó a la proliferación de células B (por la interacción CD40-CD40L) conduciendo al desarrollo de linfoproliferaciones atípicas.

Con la finalidad de conseguir vectores altamente eficientes y al mismo tiempo reducir/eliminar la posibilidad de transformación tumoral, en la presente tesis se han diseñado y construido vectores lentivirales en los que la expresión *CD40L* está dirigida por promotores humanos hematopoyético-específicos. En una de las construcciones (W-CD40L) se utilizó un fragmento de 500pb del promotor proximal del gen *Was*. Dicho fragmento fue elegido porque previamente se había demostrado en nuestro laboratorio que es capaz de expresar el transgen de forma moderada y hematopoyética-específica [57, 64]. Como aproximación alternativa, formulamos la hipótesis de que una forma lógica para conseguir un sistema lentiviral lo más seguro posible sería el uso del promotor de *CD40L*, para lo cual se seleccionó el fragmento de 1,2 Kb descrito por Schubert *et al.* [128]. Como control de expresión constitutiva se utilizó el vector S-CD40L, en el que la expresión de *CD40L* está dirigida de manera constitutiva por el LTR del virus SFFV (*spleen focus-forming virus*).

En este trabajo demostramos que el vector W-CD40L mantiene la especificidad para la expresión de *CD40L* en el tejido hematopoyético, tal y como se había demostrado previamente para *Was* y *eGFP* [57, 64]. Sin embargo, la expresión dirigida por el promotor de *Was* es ubicua en todas las estirpes pertenecientes al linaje hematopoyético [214], mientras que la expresión de *CD40L* debería ser estrictamente dependiente de activación y restringida a linfocitos T $CD4^+$ [98, 99]. A pesar de estas consideraciones, el promotor de *Was* podría ser una alternativa a los promotores constitutivos de los vectores retrovirales [81, 84], debido a que no sólo restringe la expresión de *CD40L* a células hematopoyéticas, sino que los niveles de expresión alcanzados a través del

promotor de *Was* en las distintas líneas celulares hematopoyéticas estudiadas es, al menos, diez veces menor respecto a la expresión de *CD40L* obtenida a través del vector constitutivo S-CD40L, lo que supone una evidente ventaja a la hora de reducir potenciales efectos genotóxicos. Otra de las ventajas del vector lentiviral W-CD40L es la eficiencia de transducción frente a sistemas que, si ciertamente logran una expresión más fisiológica del transgen, no son aún lo suficientemente eficientes [82, 83]. Sin embargo, será de gran interés determinar si los niveles de expresión alcanzados a través del vector W-CD40L son lo suficientemente moderados como para no producir transformación celular.

Ante este posible riesgo de transformación celular, el vector *pCD40L-CD40L* supone la solución con más posibilidades de éxito dado que dirigiría la expresión mediante el propio promotor del gen *CD40L*. En cualquier caso, antes de abordar la construcción del vector *pCD40L-CD40L* decidimos analizar el patrón de expresión génica dirigida por el fragmento del promotor seleccionado (1,2 K b) cuando se introduce en un entorno lentiviral. Para ello se construyó el vector *pCD40L-GFP* que nos permitía seguir fácilmente (mediante análisis de fluorescencia) la fuerza del promotor de *CD40L* en diferentes tipos celulares y condiciones. Los resultados mostraron que el fragmento del promotor de *CD40L* escogido sigue el patrón de expresión fisiológico de *CD40L*. Es decir, restringe su expresión a células hematopoyéticas en las que se detectan, al menos, niveles bajos de la proteína CD40L (Jurkat y K562) (Figura 11). Además, es importante destacar que este promotor mantiene su carácter inducible por activación en células T (Jurkat) (Figura 12).

A pesar de todo, hemos de tener en cuenta que los resultados obtenidos en líneas celulares son sólo indicativos de lo que podría ocurrir en células primarias. Por este motivo se comprobó si el carácter inducible del vector *pCD40L-GFP* se mantenía en linfocitos T primarios, células en las que nuestro vector debería expresarse de manera restringida en el caso de un futuro ensayo de terapia génica. Al igual que sucedía en las células Jurkat, el vector *pCD40L-GFP* era inducible en los linfocitos T primarios (Figura 14). Por lo tanto, estos datos sugieren claramente que el promotor de *CD40L* en un entorno lentiviral sigue el patrón de expresión del promotor de *CD40L* endógeno en células T primarias, a pesar de

que los niveles de inducción de *eGFP*, en las células transducidas, eran inferiores a los alcanzados en células T normales sometidas al mismo tipo de estimulación.

Finalmente, pudimos demostrar que el vector terapéutico *pCD40L-CD40L* mantiene el patrón de expresión observado para el vector *pCD40L-GFP*. Lo más relevante fue la demostración de que el vector terapéutico sólo expresaba *CD40L* en células T activadas (Figura 17). Es de destacar que la restricción alcanzada por el promotor de *CD40L* en un contexto homólogo (vector *pCD40L-CD40L*) es mucho más efectiva que la aparentemente lograda cuando dirige la expresión de un gen heterólogo (*pCD40L-GFP*). Este dato es consistente con los resultados obtenidos previamente [59] con los vectores lentivirales dirigidos por el promotor de *Was*, que restringe de manera mucho más estricta la expresión de la propia proteína que GFP. No obstante, los sistemas de detección que hemos empleado en nuestro estudio para detectar *CD40L* o *eGFP* son diferentes, lo cual introduce un elemento que debe ser considerado a la hora de interpretar correctamente la capacidad del promotor de *CD40L* en un entorno lentiviral para expresar de manera restringida *CD40L* en células T activadas.

En nuestra opinión, estos datos avalan claramente que hemos conseguido desarrollar un vector lentiviral terapéutico capaz de expresar la proteína *CD40L* de forma fisiológica. Sin embargo, a pesar de que nuestros vectores consiguen expresión inducible del transgen (tanto el *pCD40L-GFP* como *pCD40L-CD40L*), las diferencias de expresión entre las células activadas y las no activadas no llegan a ser tan evidentes como lo que se observa para *CD40L* endógeno en células T primarias normales (Ver Figuras 14 y 17). Esto podría indicar que el fragmento del promotor seleccionado, a pesar de conseguir expresión específica en células T, no está optimizado en cuanto a los niveles de expresión tras la activación. De hecho, recientemente se han descrito dos nuevos elementos involucrados en la regulación de la transcripción de *CD40L*: uno estaría situado a 1.5 Kb 5' del gen *CD40L* y otro en dirección 3'. El *enhancer* descrito en 3' actuaría aumentando la transcripción de *CD40L* de forma independiente a la orientación, y restringida al linaje de células T $CD4^+$, no actuando en células B ni monocitos [132]. El *enhancer* en 5' favorecería la unión de factores de transcripción involucrados en activación de células T (NFAT1 y GATA-3) [133]. Sería por tanto interesante

incluir ambos elementos en la segunda generación de vectores lentivirales terapéuticos para X-HIGM1.

La capacidad funcional del producto expresado por el transgen, y por tanto su capacidad para inducir el rescate funcional de las células de pacientes, fue corroborado cuando fue capaz de sostener la proliferación de las células B primarias. En efecto, estos análisis de proliferación de células B nos permitieron concluir que la proteína expresada en las células transducidas con nuestros vectores es funcional y capaz de inducir el rescate fenotípico de las células B *in vitro*. En los ensayos de proliferación celular observamos, también, que las células Jurkat no transducidas inducen una moderada proliferación celular. Como ya se ha señalado en los Resultados, a pesar de que no hemos detectado expresión de *CD40L* en estas células Jurkat mediante citometría de flujo con el anticuerpo monoclonal 24-31, sí que hemos detectado ARN mensajero en estas mismas células. No debe, por tanto, excluirse la posibilidad de que estas células Jurkat usadas como modelo en nuestro estudio expresen bajas cantidades de *CD40L* indetectables por el anticuerpo monoclonal 24-31 que tal vez fueran detectables por otro anticuerpo dirigido frente a un epítipo diferente.

Los niveles de expresión obtenidos por el promotor de *CD40L* en nuestros vectores lentivirales, *pCD40L-GFP* y *pCD40L-CD40L*, son reducidos en comparación con los niveles detectados en células T primarias. Es fundamental determinar en el futuro si estos niveles, a pesar de ser inferiores a los fisiológicos, son suficientes para producir el cambio de isotipo y proliferación de las células B. En esta dirección cabe destacar los estudios del grupo del Dr. Crystal [82] en los que lograron la corrección parcial del fenotipo de ratones *knock-out* para *CD40L*, a pesar de que sólo lograron modificar el 10% del mARN total. Por tanto, los niveles de expresión de *CD40L* inducidos tras activación en nuestro sistema podrían ser suficientes para la corrección parcial o total del fenotipo de las células B. Estos bajos niveles de expresión, si son capaces de conseguir el rescate funcional de las células deficientes, supondrían un efecto beneficioso añadido, al reducir los efectos potencialmente indeseados relacionados con genotoxicidad o con problemas de tolerancia inmunológica debido a la expresión de una neoproteína de superficie.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, los problemas de transformación observados inicialmente por el grupo del Dr. Brenner [81] han acrecentado el interés por desarrollar protocolos de terapia génica para X-HIGM1 orientados a conseguir una expresión fisiológica de *CD40L*, como ha sido el caso, antes mencionado, del grupo del Dr. Crystal [82]. Sin embargo, y a pesar de que estas estrategias han conseguido una expresión fisiológica de *CD40L*, no han logrado una eficiencia adecuada de transducción en los progenitores hematopoyéticos. Así, la baja eficacia del *trans-splicing* en células HSCs [82] supone una gran restricción en su aplicación a otras IPs. Del mismo modo, la utilización de un cromosoma artificial humano (HAC) conteniendo un fragmento del ADN genómico de *CD40L* logró demostrar una expresión de *CD40L* fisiológica en células Jurkat, pero no fue capaz de demostrarlo en linfocitos T primarios ni en HSCs [83]. En cualquier caso, aunque se consiga incrementar la eficiencia en cualquiera de los sistemas mencionados (*trans-splicing* y HAC), quedaría todavía por demostrar que en estas condiciones de eficiencia, estas nuevas metodologías son más seguras que los vectores lentivirales.

En resumen, durante el curso de esta tesis se han desarrollado dos posibles vectores terapéuticos para X-HIGM1 (W-CD40L y *pCD40L-CD40L*) que permiten una eficiente transferencia del transgen, al tiempo que generan niveles de expresión de *CD40L*, en un caso de forma limitada al linaje hematopoyético (W-CD40L) y en el otro a células T activadas (*pCD40L-CD40L*). Asimismo, en ambos casos, la expresión de *CD40L* producida es inferior a la obtenida por vectores de expresión constitutiva (S-CD40L), lo cual será fundamental para reducir los efectos nocivos de la expresión ubicua y ectópica de la proteína.

Como trabajo futuro hemos de considerar la mejora de nuestro vector terapéutico *pCD40L-CD40L* fundamentalmente en dos aspectos: (1) el carácter inducible del sistema y la mejora de los niveles de expresión del transgen y (2) el aislamiento del vector para eliminar posibles efectos genotóxicos. Para ello se pretende incluir en el vector *pCD40L-CD40L* los nuevos elementos involucrados en regulación de *CD40L* descritos previamente [132, 133] así como los aisladores HS4 [164].

CONCLUSIONES

- 1- El vector lentiviral W-CD40L, dirigido por un fragmento de 500pb del promotor proximal de *Was*, expresa *CD40L* de manera restringida en el tejido hematopoyético.
- 2- Los vectores lentivirales dirigidos por el promotor de *CD40L* expresan el transgen siguiendo el patrón de expresión de *CD40L* endógeno. La expresión es inducible por activación celular.
- 3- Tanto el vector W-CD40L como el *pCD40L-CD40L* expresan niveles moderados de proteína, característica fundamental para reducir posibles efectos deletéreos debido a la expresión ectópica.
- 4- Los niveles de expresión conseguidos por el vector *pCD40L-CD40L* son suficientes para inducir proliferación de células B primarias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gatti RA, M.H., Allen HD, Hong R, Good RA., *Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency*. Lancet., 1968 **2(7583)**: p. 1366-9.
2. Garcia, J.M., et al., *Update on the treatment of primary immunodeficiencies*. Allergol Immunopathol (Madr), 2007. **35(5)**: p. 184-92.
3. Filipovich, A., *Hematopoietic cell transplantation for correction of primary immunodeficiencies*. Bone Marrow Transplant, 2008. **42 Suppl 1**: p. S49-S52.
4. Laffort, C., et al., *Severe cutaneous papillomavirus disease after haemopoietic stem-cell transplantation in patients with severe combined immune deficiency caused by common gamma cytokine receptor subunit or JAK-3 deficiency*. Lancet, 2004. **363(9426)**: p. 2051-4.
5. Rao, K., et al., *Improved survival after unrelated donor bone marrow transplantation in children with primary immunodeficiency using a reduced-intensity conditioning regimen*. Blood, 2005. **105(2)**: p. 879-85.
6. Del Giudice, I., et al., *Allogeneic stem cell transplant from HLA-identical sibling for chronic granulomatous disease and review of the literature*. Ann Hematol, 2003. **82(3)**: p. 189-92.
7. Dror, Y., et al., *Immune reconstitution in severe combined immunodeficiency disease after lectin-treated, T-cell-depleted haplocompatible bone marrow transplantation*. Blood, 1993. **81(8)**: p. 2021-30.
8. Bertrand, Y., et al., *Influence of severe combined immunodeficiency phenotype on the outcome of HLA non-identical, T-cell-depleted bone marrow transplantation: a retrospective European survey from the European group for bone marrow transplantation and the european society for immunodeficiency*. J Pediatr, 1999. **134(6)**: p. 740-8.
9. Buckley RH, S.S., Schiff RI, Markert L, Williams LW, Roberts JL, Myers LA, Ward FE., *Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency*. N Engl J Med., 1999. **340(7)**: p. 508-16.
10. Filipovich, A.H., et al., *Impact of donor type on outcome of bone marrow transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the International Bone Marrow Transplant Registry and the National Marrow Donor Program*. Blood, 2001. **97(6)**: p. 1598-603.
11. Dvorak CC, C.M., *Hematopoietic stem cell transplantation for primary immunodeficiency disease*. Bone Marrow Transplant., 2008. **41(2)**: p. 119-26.
12. Hill, L.E. and P.L. Mollison, *Hypogammaglobulinaemia in the United Kingdom. 13. Conclusions*. Spec Rep Ser Med Res Counc (G B), 1971. **310**: p. 124-7.
13. Haeney, M., *Intravenous immune globulin in primary immunodeficiency*. Clin Exp Immunol, 1994. **97 Suppl 1**: p. 11-5.
14. *IUIS/WHO notice. Appropriate uses of human immunoglobulin in clinical practice*. Clin Exp Immunol, 1983. **52(2)**: p. 417-22.

15. Chapel, H.M., *Consensus on diagnosis and management of primary antibody deficiencies. Consensus Panel for the Diagnosis and Management of Primary Antibody Deficiencies.* Bmj, 1994. **308**(6928): p. 581-5.
16. Burks, A.W., H.A. Sampson, and R.H. Buckley, *Anaphylactic reactions after gamma globulin administration in patients with hypogammaglobulinemia. Detection of IgE antibodies to IgA.* N Engl J Med, 1986. **314**(9): p. 560-4.
17. Bjorkander, J., et al., *Immunoglobulin prophylaxis in patients with antibody deficiency syndromes and anti-IgA antibodies.* J Clin Immunol, 1987. **7**(1): p. 8-15.
18. Gardulf, A., L. Hammarstrom, and C.I. Smith, *Home treatment of hypogammaglobulinaemia with subcutaneous gammaglobulin by rapid infusion.* Lancet, 1991. **338**(8760): p. 162-6.
19. Levine, F. and T. Friedmann, *Gene therapy techniques.* Curr Opin Biotechnol, 1991. **2**(6): p. 840-4.
20. Friedmann, T. and R. Roblin, *Gene therapy for human genetic disease?* Science, 1972. **175**(25): p. 949-55.
21. Shimotohno, K. and H.M. Temin, *Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus.* Cell, 1981. **26**(1 Pt 1): p. 67-77.
22. Boucher, R.C., *Current status of CF gene therapy.* Trends Genet, 1996. **12**(3): p. 81-4.
23. Hall, S.J., S.H. Chen, and S.L. Woo, *The promise and reality of cancer gene therapy.* Am J Hum Genet, 1997. **61**(4): p. 785-9.
24. Stoff-Khalili MA, D.P., Curiel DT., *Gene therapy for carcinoma of the breast.* Cancer Gene Ther. , 2006 **13**(7): p. 633-47.
25. Brower, V., *Cancer gene therapy steadily advances.* J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(18): p. 1276-8.
26. Irie A, K.H., Ohkawa T, Bouffard DY, Suzuki T, Curcio LD, Holm PS, Sassani A, Scanlon KJ., *Anti-oncogene ribozymes for cancer gene therapy.* Adv Pharmacol. , 1997. **40**: p. 207-57.
27. Huang PS, H.D., *Oncogene products as therapeutic targets for cancer.* Curr Opin Oncol., 1997 **9**(1): p. 94-100.
28. Harris, C.C., *Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies.* J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(20): p. 1442-55.
29. Swisher, S.G. and J.A. Roth, *Clinical update of Ad-p53 gene therapy for lung cancer.* Surg Oncol Clin N Am, 2002. **11**(3): p. 521-35.
30. Shinoura N, H.H., *Gene therapy using an adenovirus vector for apoptosis-related genes is a highly effective therapeutic modality for killing glioma cells.* Curr Gene Ther., 2003. **3**(2): p. 147-53.
31. Eberle, J., et al., *Apoptosis pathways and oncolytic adenoviral vectors: promising targets and tools to overcome therapy resistance of malignant melanoma.* Exp Dermatol, 2008. **17**(1): p. 1-11.
32. Pandha, H.S., et al., *Genetic prodrug activation therapy for breast cancer: A phase I clinical trial of erbB-2-directed suicide gene expression.* J Clin Oncol, 1999. **17**(7): p. 2180-9.

33. Vassaux, G. and N.R. Lemoine, *Gene therapy for carcinoma of the breast: Genetic toxins*. Breast Cancer Res, 2000. **2**(1): p. 22-7.
34. Takahashi S, A.K., Ito Y, Hatake K, Nakane M, Kobayashi T, Minowa S, Shibata H, Mitsuhashi J, Tsukahara S, Ishikawa E, Suzuki R, Tsuruo T, Sugimoto Y., *Pilot study of MDR1 gene transfer into hematopoietic stem cells and chemoprotection in metastatic breast cancer patients*. Cancer Sci, 2007. **98**(10): p. 1609-16.
35. Mitsuhashi, J., et al., *Retroviral integration site analysis and the fate of transduced clones in an MDR1 gene therapy protocol targeting metastatic breast cancer*. Hum Gene Ther, 2007. **18**(10): p. 895-906.
36. Panczyk, M., A. Salagacka, and M. Mirowski, [*MDR1 (ABCB1) gene encoding glycoprotein P (P-gp), a member of ABC transporter superfamily: consequences for therapy and progression of neoplastic diseases*]. Postepy Biochem, 2007. **53**(4): p. 361-73.
37. Parmiani, G., et al., *Cytokine-based gene therapy of human tumors. An overview*. Folia Biol (Praha), 1996. **42**(6): p. 305-9.
38. Mazzolini, G., et al., *Intratumoral injection of dendritic cells engineered to secrete interleukin-12 by recombinant adenovirus in patients with metastatic gastrointestinal carcinomas*. J Clin Oncol, 2005. **23**(5): p. 999-1010.
39. Arbuthnot, P.B., et al., *In vitro and in vivo hepatoma cell-specific expression of a gene transferred with an adenoviral vector*. Hum Gene Ther, 1996. **7**(13): p. 1503-14.
40. Lee, C.H., et al., *Prostate-specific antigen promoter driven gene therapy targeting DNA polymerase-alpha and topoisomerase II alpha in prostate cancer*. Anticancer Res, 1996. **16**(4A): p. 1805-11.
41. Larochelle, A., et al., *Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy*. Nat Med, 1996. **2**(12): p. 1329-37.
42. Mikkola, H.K. and S.H. Orkin, *The journey of developing hematopoietic stem cells*. Development, 2006. **133**(19): p. 3733-44.
43. Cavazzana-Calvo, M., et al., *Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease*. Science, 2000. **288**(5466): p. 669-72.
44. Cavazzana-Calvo, M., et al., *Gene therapy for severe combined immunodeficiency*. Annu Rev Med, 2005. **56**: p. 585-602.
45. Gaspar HB, P.K., Howe S, King D, Gilmour KC, Sinclair J, Brouns G, Schmidt M, Von Kalle C, Barington T, Jakobsen MA, Christensen HO, Al Ghonaium A, White HN, Smith JL, Levinsky RJ, Ali RR, Kinnon C, Thrasher AJ, *Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector*. Lancet., 2004 **364**(9452): p. 2181-7.
46. Fischer, A. and M. Cavazzana-Calvo, *Gene therapy of inherited diseases*. Lancet, 2008. **371**(9629): p. 2044-7.
47. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 3132-42.

48. Aiuti, A., et al., *Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning*. Science, 2002. **296**(5577): p. 2410-3.
49. Gaspar HB, B.E., Parsley K, Gilmour KC, King D, Sinclair J, Zhang F, Giannakopoulos A, Adams S, Fairbanks LD, Gaspar J, Henderson L, Xu-Bayford JH, Davies EG, Veys PA, Kinnon C, Thrasher AJ., *Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning*. Mol Ther, 2006. **14**(4)(Oct): p. 505-13.
50. Aiuti, A., et al., *Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2233-40.
51. RA., S., *Modern management of chronic granulomatous disease*. Br J Haematol., 2008 **140**(3)(Feb): p. 255-66.
52. Malech, H.L., et al., *Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(22): p. 12133-8.
53. Ott MG, S.M., Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kühlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG, Lüthi U, Hassan M, Thrasher AJ, Hoelzer D, von Kalle C, Seger R, Grez M, *Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVII, PRDM16 or SETBP1*. Nat Med. , 2006 **12**(4)(Apr): p. 401-9.
54. Wada, T., et al., *Retrovirus-mediated WASP gene transfer corrects Wiskott-Aldrich syndrome T-cell dysfunction*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(9): p. 1039-46.
55. Strom TS, G.W., Kelly PF, Cunningham JM, Nienhuis AW, *Functional correction of T cells derived from patients with the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) by transduction with an oncoretroviral vector encoding the WAS protein*. Gene Ther., 2003. **10**(9): p. 803-9.
56. Dupre, L., et al., *Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients leads to functional correction*. Mol Ther, 2004. **10**(5): p. 903-15.
57. Martin, F., et al., *Lentiviral vectors transcriptionally targeted to hematopoietic cells by WASP gene proximal promoter sequences*. Gene Ther, 2005. **12**(8): p. 715-23.
58. Charrier S, D.L., Scaramuzza S, Jeanson-Leh L, Blundell MP, Danos O, Cattaneo F, Aiuti A, Eckenberg R, Thrasher AJ, Roncarolo MG, Galy A., *Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients*. Gene Ther. , 2007 **14**(5): p. 415-28.
59. Toscano MG, F.C., Benabdellah K, Cobo M, Blundell M, Thrasher AJ, García-Olivares E, Molina IJ, Martin F., *Hematopoietic-specific lentiviral vectors circumvent cellular toxicity due to ectopic expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein*. Hum Gene Ther, 2008. **19**(2)(Feb): p. 179-97.
60. Klein C, N.D., Liu CH, Mizoguchi A, Bhan AK, Miki H, Takenawa T, Rosen FS, Alt FW, Mulligan RC, Snapper SB., *Gene therapy for Wiskott-*

- Aldrich syndrome: rescue of T-cell signaling and amelioration of colitis upon transplantation of retrovirally transduced hematopoietic stem cells in mice.* Blood. , 2003 **101(6)**(Mar 15): p.:2159-66.
61. Strom TS, T.S., Andreansky S, Liu H, Doherty PC, Srivastava DK, Cunningham JM, Nienhuis AW, *Defects in T-cell-mediated immunity to influenza virus in murine Wiskott-Aldrich syndrome are corrected by oncoretroviral vector-mediated gene transfer into repopulating hematopoietic cells.* Blood. , 2003 **102(9)**(Nov 1): p. 3108-16.
 62. Charrier, S., et al., *A lentiviral vector encoding the human Wiskott-Aldrich syndrome protein corrects immune and cytoskeletal defects in WASP knockout mice.* Gene Ther, 2005. **12(7)**: p. 597-606.
 63. Dupré L, M.F., Scaramuzza S, Trifari S, Hernández RJ, Aiuti A, Naldini L, Roncarolo MG., *Efficacy of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome using a WAS promoter/cDNA-containing lentiviral vector and nonlethal irradiation.* Hum Gene Ther. , 2006 **17(3)**: p. 303-13.
 64. Frecha, C., et al., *Improved lentiviral vectors for Wiskott-Aldrich syndrome gene therapy mimic endogenous expression profiles throughout haematopoiesis.* Gene Ther, 2008. **15(12)**: p. 930-41.
 65. Khan, W.N., et al., *Defective B cell development and function in Btk-deficient mice.* Immunity, 1995. **3(3)**: p. 283-99.
 66. Kerner, J.D., et al., *Impaired expansion of mouse B cell progenitors lacking Btk.* Immunity, 1995. **3(3)**: p. 301-12.
 67. Ellmeier, W., et al., *Severe B cell deficiency in mice lacking the tec kinase family members Tec and Btk.* J Exp Med, 2000. **192(11)**: p. 1611-24.
 68. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency.* N Engl J Med, 2003. **348(3)**: p. 255-6.
 69. Howe, S.J., et al., *Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients.* J Clin Invest, 2008. **118(9)**: p. 3143-50.
 70. Thornhill, S.I., et al., *Self-inactivating gammaretroviral vectors for gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency.* Mol Ther, 2008. **16(3)**: p. 590-8.
 71. Zhang, F., et al., *Lentiviral vectors containing an enhancer-less ubiquitously acting chromatin opening element (UCOE) provide highly reproducible and stable transgene expression in hematopoietic cells.* Blood, 2007. **110(5)**: p. 1448-57.
 72. Mortellaro A, H.R., Guerrini MM, Carlucci F, Tabucchi A, Ponzoni M, Sanvito F, Doglioni C, Di Serio C, Biasco L, Follenzi A, Naldini L, Bordignon C, Roncarolo MG, Aiuti A, *Ex vivo gene therapy with lentiviral vectors rescues adenosine deaminase (ADA)-deficient mice and corrects their immune and metabolic defects.* Blood. , 2006 **108(9)**(Nov 1): p. 2979-88.
 73. Carbonaro DA, J.X., Petersen D, Wang X, Dorey F, Kil KS, Aldrich M, Blackburn MR, Kellems RE, Kohn DB., *In vivo transduction by intravenous injection of a lentiviral vector expressing human ADA into neonatal ADA gene knockout mice: a novel form of enzyme replacement therapy for ADA deficiency.* Mol Ther. , 2006. **13(6)**(Jun): p. 1110-20.

74. Roesler, J., et al., *Third-generation, self-inactivating gp91(phox) lentivector corrects the oxidase defect in NOD/SCID mouse-repopulating peripheral blood-mobilized CD34+ cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease*. *Blood*, 2002. **100**(13): p. 4381-90.
75. Naumann, N., et al., *Simian immunodeficiency virus lentivector corrects human X-linked chronic granulomatous disease in the NOD/SCID mouse xenograft*. *Gene Ther*, 2007. **14**(21): p. 1513-24.
76. Yu PW, T.R., Kato RM, Astrakhan A, Humblet-Baron S, Kipp K, Chae K, Ellmeier W, Witte ON, Rawlings DJ, *Sustained correction of B-cell development and function in a murine model of X-linked agammaglobulinemia (XLA) using retroviral-mediated gene transfer*. *Blood*. , 2004 **104**(5)(Sep 1): p. 1281-90.
77. Lutzko, C., et al., *Lentivirus vectors incorporating the immunoglobulin heavy chain enhancer and matrix attachment regions provide position-independent expression in B lymphocytes*. *J Virol*, 2003. **77**(13): p. 7341-51.
78. Moreau, T., et al., *Restriction of transgene expression to the B-lymphoid progeny of human lentivirally transduced CD34+ cells*. *Mol Ther*, 2004. **10**(1): p. 45-56.
79. Werner M, K.J., Baum C, Brocker T., *B-cell-specific transgene expression using a self-inactivating retroviral vector with human CD19 promoter and viral post-transcriptional regulatory element*. *Gene Ther*. , 2004 **11**(12)(Jun): p. 992-1000.
80. Laurie, K.L., et al., *Cell-specific and efficient expression in mouse and human B cells by a novel hybrid immunoglobulin promoter in a lentiviral vector*. *Gene Ther*, 2007. **14**(23): p. 1623-31.
81. Brown, M.P., et al., *Thymic lymphoproliferative disease after successful correction of CD40 ligand deficiency by gene transfer in mice*. *Nat Med*, 1998. **4**(11): p. 1253-60.
82. Tahara, M., et al., *Trans-splicing repair of CD40 ligand deficiency results in naturally regulated correction of a mouse model of hyper-IgM X-linked immunodeficiency*. *Nat Med*, 2004. **10**(8): p. 835-41.
83. Yamada, H., et al., *Introduction of a CD40L genomic fragment via a human artificial chromosome vector permits cell-type-specific gene expression and induces immunoglobulin secretion*. *J Hum Genet*, 2008. **53**(5): p. 447-53.
84. Sacco, M.G., et al., *Lymphoid abnormalities in CD40 ligand transgenic mice suggest the need for tight regulation in gene therapy approaches to hyper immunoglobulin M (IgM) syndrome*. *Cancer Gene Ther*, 2000. **7**(10): p. 1299-306.
85. Baum, C., et al., *Retrovirus vectors: toward the plentivirus?* *Mol Ther*, 2006. **13**(6): p. 1050-63.
86. Kay MA, G.J., Naldini L., *Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics*. *Nat Med.*, 2001 **7**(1)(Jan): p. 33-40.
87. Anson, D., *The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral*

- vector-mediated gene delivery*. Genet Vaccines Ther. , 2004. **2(1)**(Aug 13): p. 9.
88. Bradford, G.B., et al., *Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment*. Exp Hematol, 1997. **25(5)**: p. 445-53.
 89. Hematti P, S.S., Agricola BA, Metzger ME, Donahue RE, Dunbar CE., *Retroviral transduction efficiency of G-CSF+SCF-mobilized peripheral blood CD34+ cells is superior to G-CSF or G-CSF+Flt3-L-mobilized cells in nonhuman primates*. Blood. , 2003. **101(6)**(Mar 15): p. 2199-205.
 90. Lapidot, T. and I. Petit, *Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells*. Exp Hematol, 2002. **30(9)**: p. 973-81.
 91. Baum C, D.J., Li Z, Fehse B, Meyer J, Williams DA, von Kalle C., *Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells*. Blood, 2003. **101(6)**(Mar 15): p. 2099-114.
 92. Modlich, U., et al., *Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity*. Blood, 2006. **108(8)**: p. 2545-53.
 93. Fuleihan, R.L., *The X-linked hyperimmunoglobulin M syndrome*. Semin Hematol, 1998. **35(4)**: p. 321-31.
 94. Fuleihan, R., et al., *Localization of the genetic defect in X-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM (HIGMX-1) to the CD40 ligand gene*. Trans Assoc Am Physicians, 1993. **106**: p. 91-5.
 95. DiSanto, J.P., et al., *CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM*. Nature, 1993. **361(6412)**: p. 541-3.
 96. Allen, R.C., et al., *CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome*. Science, 1993. **259(5097)**: p. 990-3.
 97. Aruffo, A., et al., *The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome*. Cell, 1993. **72(2)**: p. 291-300.
 98. Spriggs, M.K., et al., *Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion*. J Exp Med, 1992. **176(6)**: p. 1543-50.
 99. Hollenbaugh D, G.L., Kullas CD, Chalupny NJ, Braesch-Andersen S, Noelle RJ, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A., *The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity*. EMBO J. , 1992. **12**: p. 4313-21.
 100. van Kooten C, B.J., *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol. , 2000. **67(1)**: p. 2-17.
 101. Durie FH, F.T., Masters SR, Laman JD, Noelle RJ., *The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity*. Immunol Today, 1994. **15(9)**(Sep): p. 406-11.
 102. Crow, M.K. and K.A. Kirou, *Regulation of CD40 ligand expression in systemic lupus erythematosus*. Curr Opin Rheumatol, 2001. **13(5)**: p. 361-9.

103. Nakamura, M., et al., *Autoantibody to CD40 ligand in systemic lupus erythematosus: association with thrombocytopenia but not thromboembolism*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(2): p. 150-6.
104. Cron, R., *CD154 transcriptional regulation in primary human CD4 T cells*. Immunol Res., 2003. **27**(2-3): p. 185-202.
105. Seyama, K., et al., *Mutations of the CD40 ligand gene and its effect on CD40 ligand expression in patients with X-linked hyper IgM syndrome*. Blood, 1998. **92**(7): p. 2421-34.
106. Notarangelo, L.D., et al., *CD40L base: a database of CD40L gene mutations causing X-linked hyper-IgM syndrome*. Immunol Today, 1996. **17**(11): p. 511-6.
107. Hayward AR, L.J., Facchetti F, Notarangelo L, Ochs HD, Etzioni A, Bonnefoy JY, Cosyns M, Weinberg A., *Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver, and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM*. J Immunol., 1997 **158**(2):: p. 977-83.
108. Notarangelo LD, D.M., Ugazio AG., *Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM)*. Immunodeficiency Rev., 1992. **3**(2): p. 101-21.
109. Levy J, E.-B.T., Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordigoni P, Resnick I, Fasth A, Baer M, Gomez L, Sanders EA, Tabone MD, Plantaz D, Etzioni A, Monafó V, Abinun M, Hammarstrom L, Abrahamsen T, Jones A, Finn A, Klemola T, DeVries E, Sanal O, Peitsch MC, Notarangelo LD., *Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome*. J Pediatr., 1997. **131**(1 Pt 1)(Jul): p. 47-54.
110. Minegishi, Y., et al., *Mutations in activation-induced cytidine deaminase in patients with hyper IgM syndrome*. Clin Immunol, 2000. **97**(3): p. 203-10.
111. Revy, P., et al., *Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2)*. Cell, 2000. **102**(5): p. 565-75.
112. Ferrari, S., et al., *Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12614-9.
113. Jain, A., et al., *Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohidrotic ectodermal dysplasia*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 223-8.
114. Zonana J, E.M., Schneider LC, Orlow SJ, Moss C, Golabi M, Shapira SK, Farndon PA, Wara DW, Emmal SA, Ferguson BM., *A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO)*. Am J Hum Genet, 2000 **67**(6)(Dec): p. 1555-62.
115. Villa, A., et al., *Organization of the human CD40L gene: implications for molecular defects in X chromosome-linked hyper-IgM syndrome and prenatal diagnosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 2110-4.
116. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 111-35.
117. Mach F, S.U., Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P., *Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40*

- ligand signaling in atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **4;94(5)**: p. 1931-6.
118. Henn V, S.J., Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczek RA., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. Nature., 1998. **5;391(6667)**: p. 591-4.
 119. Lederman, S., Yellin,MJ., Inghirami,J., Lee,J.,Knowles, DM., and Chess,L., *Molecular interactions mediating T-B lymphocyte collaboration in human lymphoid follicles. Roles of T cell-B-cell-activating molecule (5c8 antigen) and CD40 in contact-dependent help*. The Journal of Immunology, 1992. **149(12)**: p. 3817-3826.
 120. Graf, D., et al., *Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells*. Eur J Immunol, 1992. **22(12)**: p. 3191-4.
 121. Farrah T, S.C., *Emerging cytokine family*. Nature, 1992. **358**: p. 26.
 122. Jones EY, S.D., Walker NP., *Structure of tumour necrosis factor*. Nature, 1989. **16;338(6212)**:: p. 225-8.
 123. Eck, M.a.S., *SR The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding*. J. Biol. Chem., 1989 **264(29)**: p. 17595-17605.
 124. Karpusas M, H.Y., Wang JH, Thompson J, Lederman S, Chess L, Thomas D., *2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand*. Structure. , 1995. **15;3(10)**: p. 1031-9.
 125. Hsu YM, L.J., Su L, Ehrenfels B, Garber E, Thomas D., *Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes*. J Biol Chem, 1997. **272(2)**(Jan 10): p. 911-5.
 126. Graf D, M.S., Korthäuer U, van Kooten C, Weise C, Kroczek RA., *A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation*. Eur J Immunol., 1995. **6(25)**: p. 1749-54.
 127. Pietravalle F, L.-H.S., Blasey H, Aubry JP, Elson G, Edgerton MD, Bonnefoy JY, Gauchat JF., *Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes*. J Biol Chem. , 1996 **271(11)**(Mar 15): p. 5965-7.
 128. Schubert LA, K.G., Cron RQ, Lewis DB, Aruffo A, Hollenbaugh D., *The human gp39 promoter. Two distinct nuclear factors of activated T cell protein-binding elements contribute independently to transcriptional activation*. J Biol Chem. , 1995. **270(50)**(Dec 15): p. 29624-7.
 129. Lobo FM, X.S., Lee C, Fuleihan RL., *Transcriptional activity of the distal CD40 ligand promoter*. Biochem Biophys Res Commun., 2000 **279(1)**(Dec 9): p. 245-50.
 130. Rao, A., *NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes*. Immunol Today. , 1994 **15(6)**: p. 274-81.
 131. Rao, A., C. Luo, and P.G. Hogan, *Transcription factors of the NFAT family: regulation and function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 707-47.
 132. Schubert LA, C.R., Cleary AM, Brunner M, Song A, Lu LS, Jullien P, Krensky AM, Lewis DB., *A T cell-specific enhancer of the human CD40 ligand gene*. J Biol Chem. , 2002. **277(9)** (Mar 1): p. 7386-95.

133. Brunner M, Z.M., Genin A, Ho IC, Cron RQ., *A T-cell-specific CD154 transcriptional enhancer located just upstream of the promoter*. *Genes Immun*, 2008. **9** (7)(Oct): p. 640-9.
134. Agarwal, S., O. Avni, and A. Rao, *Cell-type-restricted binding of the transcription factor NFAT to a distal IL-4 enhancer in vivo*. *Immunity*, 2000. **12**(6): p. 643-52.
135. Li, S. and Z. Ma, *Nonviral gene therapy*. *Curr Gene Ther*, 2001. **1**(2): p. 201-26.
136. Wolff, J.A., et al., *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo*. *Science*, 1990. **247**(4949 Pt 1): p. 1465-8.
137. Coster, H.G., *A quantitative analysis of the voltage-current relationships of fixed charge membranes and the associated property of "punch-through"*. *Biophys J*, 1965. **5**(5): p. 669-86.
138. Klein, T.M., et al., *Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment*. *Biotechnology (N Y)*, 1992. **10**(3): p. 286-91.
139. Lasic, D.D., *Doxorubicin in sterically stabilized liposomes*. *Nature*, 1996. **380**(6574): p. 561-2.
140. Felgner, J.H., et al., *Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(4): p. 2550-61.
141. Walther, W. and U. Stein, *Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases*. *Drugs*, 2000. **60**(2): p. 249-71.
142. Chang, A.H. and M. Sadelain, *The genetic engineering of hematopoietic stem cells: the rise of lentiviral vectors, the conundrum of the ltr, and the promise of lineage-restricted vectors*. *Mol Ther*, 2007. **15**(3): p. 445-56.
143. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. *Science*, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
144. Poeschla, E., et al., *Identification of a human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) encapsidation determinant and transduction of nondividing human cells by HIV-2-based lentivirus vectors*. *J Virol*, 1998. **72**(8): p. 6527-36.
145. Olsen, J.C., *Gene transfer vectors derived from equine infectious anemia virus*. *Gene Ther*, 1998. **5**(11): p. 1481-7.
146. Mangeot PE, N.D., Dubois B, Winter AJ, Leissner P, Mehtali M, Kaiserlian D, Cosset FL, Darlix JL, *Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells*. *J Virol* , 2000 **74**(18): p. 8307-15.
147. Poeschla, E.M., F. Wong-Staal, and D.J. Looney, *Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors*. *Nat Med*, 1998. **4**(3): p. 354-7.
148. Berkowitz, R., et al., *Construction and molecular analysis of gene transfer systems derived from bovine immunodeficiency virus*. *J Virol*, 2001. **75**(7): p. 3371-82.
149. Naldini, L., et al., *Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(21): p. 11382-8.

150. Zufferey, R., et al., *Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(9): p. 871-5.
151. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
152. Miyoshi, H., et al., *Development of a self-inactivating lentivirus vector*. J Virol, 1998. **72**(10): p. 8150-7.
153. Delenda, C., *Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression*. J Gene Med, 2004. **6 Suppl 1**: p. S125-38.
154. Müller HP, V.H., *DNA bending creates favored sites for retroviral integration: an explanation for preferred insertion sites in nucleosomes*. EMBO J., 1994. **13**(19)(Oct 3): p. 4704-14.
155. Schröder AR, S.P., Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F., *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots*. Cell. , 2002. **110**(4)(Aug 23): p. 521-9.
156. Zufferey, R., et al., *Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9873-80.
157. Hino, S., et al., *Sea urchin insulator protects lentiviral vector from silencing by maintaining active chromatin structure*. Gene Ther, 2004. **11**(10): p. 819-28.
158. West, A.G., M. Gaszner, and G. Felsenfeld, *Insulators: many functions, many mechanisms*. Genes Dev, 2002. **16**(3): p. 271-88.
159. Pikaart MJ, R.-T.F., Felsenfeld G., *Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators*. Genes Dev, 1998 **12**(18)(Sep 15): p. 2852-62.
160. Chung JH, W.M., Felsenfeld G., *A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in Drosophila*. Cell. , 1993 **74**(3)(Aug 13): p. 505-14.
161. Chung, J.H., A.C. Bell, and G. Felsenfeld, *Characterization of the chicken beta-globin insulator*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(2): p. 575-80.
162. Litt MD, S.M., Gaszner M, Allis CD, Felsenfeld G., *Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus*. Science, 2001 **293**(5539)(Sep 28): p. 2453-5.
163. Recillas-Targa, F., et al., *Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(10): p. 6883-8.
164. Yusufzai TM, F.G., *The 5'-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2004. **101**(23): p. 8620-4.
165. Ramezani A, H.T., Hawley RG., *Combinatorial incorporation of enhancer-blocking components of the chicken beta-globin 5'HS4 and human T-cell receptor alpha/delta BEAD-1 insulators in self-inactivating retroviral vectors reduces their genotoxic potential*. Stem Cells, 2008 **26**(12)(Dec): p. 3257-66.
166. Ramezani, A., T.S. Hawley, and R.G. Hawley, *Performance- and safety-enhanced lentiviral vectors containing the human interferon-beta scaffold*

- attachment region and the chicken beta-globin insulator. *Blood*, 2003. **101**(12): p. 4717-24.
167. Robert-Richard, E., et al., *Murine retroviral but not human cellular promoters induce in vivo erythroid-specific deregulation that can be partially prevented by insulators*. *Mol Ther*, 2007. **15**(1): p. 173-82.
 168. Emery, D.W., et al., *Development of virus vectors for gene therapy of beta chain hemoglobinopathies: flanking with a chromatin insulator reduces gamma-globin gene silencing in vivo*. *Blood*, 2002. **100**(6): p. 2012-9.
 169. Emery, D.W., et al., *A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(16): p. 9150-5.
 170. Pannell D, E.J., *Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors*. *Rev Med Virol.*, 2001 **11**(4)(Jul-Aug): p. 205-17.
 171. Evans-Galea, M.V., et al., *Suppression of clonal dominance in cultured human lymphoid cells by addition of the cHS4 insulator to a lentiviral vector*. *Mol Ther*, 2007. **15**(4): p. 801-9.
 172. Puthenveetil, G., et al., *Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector*. *Blood*, 2004. **104**(12): p. 3445-53.
 173. Zaiss, A.K., S. Son, and L.J. Chang, *RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy*. *J Virol*, 2002. **76**(14): p. 7209-19.
 174. Schambach, A., et al., *Improving transcriptional termination of self-inactivating gamma-retroviral and lentiviral vectors*. *Mol Ther*, 2007. **15**(6): p. 1167-73.
 175. Furger, A., J. Monks, and N.J. Proudfoot, *The retroviruses human immunodeficiency virus type 1 and Moloney murine leukemia virus adopt radically different strategies to regulate promoter-proximal polyadenylation*. *J Virol*, 2001. **75**(23): p. 11735-46.
 176. Vassilopoulos, G., P.R. Wang, and D.W. Russell, *Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion*. *Nature*, 2003. **422**(6934): p. 901-4.
 177. Lagasse E, C.H., Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M., *Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo*. *Nat Med.*, 2000 **6**(11)(Nov): p. 1229-34.
 178. Camargo FD, G.R., Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA., *Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates*. *Nat Med.* , 2003. **9**(12)(Dec): p. 1520-7.
 179. Krause, D.S., et al., *Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell*. *Cell*, 2001. **105**(3): p. 369-77.
 180. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(4): p. 323-8.
 181. Almeida-Porada, G., et al., *Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep*. *Blood*, 2004. **104**(8): p. 2582-90.
 182. Jang YY, C.M., Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ., *Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion*. *Nat Cell Biol.*, 2004. **6**(6)(Jun): p. 532-9.

183. Marodon, G., et al., *Specific transgene expression in human and mouse CD4+ cells using lentiviral vectors with regulatory sequences from the CD4 gene*. Blood, 2003. **101**(9): p. 3416-23.
184. Zychlinski, D., et al., *Physiological Promoters Reduce the Genotoxic Risk of Integrating Gene Vectors*. Mol Ther, 2008.
185. Hatada, S., et al., *Gene correction in hematopoietic progenitor cells by homologous recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13807-11.
186. Balague, C., et al., *Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector*. Blood, 2000. **95**(3): p. 820-8.
187. Cathomen, T. and J.K. Joung, *Zinc-finger nucleases: the next generation emerges*. Mol Ther, 2008. **16**(7): p. 1200-7.
188. Paques, F. and P. Duchateau, *Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy*. Curr Gene Ther, 2007. **7**(1): p. 49-66.
189. Bibikova, M., et al., *Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases*. Science, 2003. **300**(5620): p. 764.
190. Ashworth, J., et al., *Computational redesign of endonuclease DNA binding and cleavage specificity*. Nature, 2006. **441**(7093): p. 656-9.
191. Miller, J.C., et al., *An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(7): p. 778-85.
192. Maeder, M.L., et al., *Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification*. Mol Cell, 2008. **31**(2): p. 294-301.
193. Urnov FD, M.J., Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC., *Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases*. Nature. , 2005 **435**(7042): p. 646-51.
194. Szczepek, M., et al., *Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(7): p. 786-93.
195. Moehle EA, R.J., Lee YL, Jouvenot Y, DeKolver RC, Gregory PD, Urnov FD, Holmes MC, *Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases*. Proc Natl Acad Sci U S A. , 2007 **104**(9): p. 3055-60.
196. Lombardo A, G.P., Beausejour CM, Colleoni S, Lee YL, Kim KA, Ando D, Urnov FD, Galli C, Gregory PD, Holmes MC, Naldini L., *Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery*. Nat Biotechnol., 2007 . **25**(11): p. 1298-306.
197. Perez EE, W.J., Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, Wang N, Lee G, Bartsevich VV, Lee YL, Guschin DY, Rupniewski I, Waite AJ, Carpenito C, Carroll RG, Orange JS, Urnov FD, Rebar EJ, Ando D, Gregory PD, Riley JL, Holmes MC, June CH, *Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases*. Nat Biotechnol. , 2008 **26**(7): p. 808-16.
198. Schiedlmeier, B., et al., *High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound in vivo competitive growth advantage on human cord blood*

- CD34+ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation.* Blood, 2003. **101**(5): p. 1759-68.
199. Cosset FL, M.F., Takeuchi Y, Weiss RA, Collins MK, Russell SJ., *Retroviral retargeting by envelopes expressing an N-terminal binding domain.* J Virol. , 1995 **69**(10)(Oct): p. 6314-22.
 200. Martin, F., et al., *Retroviral vector targeting to melanoma cells by single-chain antibody incorporation in envelope.* Hum Gene Ther, 1998. **9**(5): p. 737-46.
 201. Martin, F., et al., *Retrovirus targeting by tropism restriction to melanoma cells.* J Virol, 1999. **73**(8): p. 6923-9.
 202. Molina, I.J., et al., *T cell lines characterize events in the pathogenesis of the Wiskott-Aldrich syndrome.* J Exp Med, 1992. **176**(3): p. 867-74.
 203. Biesinger, B., et al., *Stable growth transformation of human T lymphocytes by herpesvirus saimiri.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 3116-9.
 204. Meidl, E., et al., *Immortalization of human T cells by Herpesvirus saimiri.* Immunol Today, 1995. **16**(2): p. 55-8.
 205. Meidl, E. and R. Hohlfeld, *T cell transformation with Herpesvirus saimiri: a tool for neuroimmunological research.* J Neuroimmunol, 2000. **103**(1): p. 1-7.
 206. Daubenberger, C.A., et al., *Herpesvirus saimiri transformed T cells and peripheral blood mononuclear cells restimulate identical antigen-specific human T cell clones.* J Immunol Methods, 2001. **254**(1-2): p. 99-108.
 207. Pacheco-Castro, A., et al., *Herpesvirus saimiri immortalization of alpha beta and gamma delta human T-lineage cells derived from CD34+ intrathymic precursors in vitro.* Int Immunol, 1996. **8**(11): p. 1797-805.
 208. Gallego, M.D., et al., *Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation.* Blood, 1997. **90**(8): p. 3089-97.
 209. Toscano MG, F.C., Ortega C, Santamaría M, Martín F, Molina IJ, *Efficient lentiviral transduction of Herpesvirus saimiri immortalized T cells as a model for gene therapy in primary immunodeficiencies.* Gene Ther. , 2004. **11**(12):: p. 956-61.
 210. Renshaw, B.R., et al., *Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice.* J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1889-900.
 211. Hadzic, N., et al., *Correction of the hyper-IgM syndrome after liver and bone marrow transplantation.* N Engl J Med, 2000. **342**(5): p. 320-4.
 212. Thomas, C., et al., *Brief report: correction of X-linked hyper-IgM syndrome by allogeneic bone marrow transplantation.* N Engl J Med, 1995. **333**(7): p. 426-9.
 213. Winkelstein, J.A., et al., *The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients.* Medicine (Baltimore), 2003. **82**(6): p. 373-84.
 214. Stewart, D.M., et al., *Studies of the expression of the Wiskott-Aldrich syndrome protein.* J Clin Invest, 1996. **97**(11): p. 2627-34.

**PUBLICACIONES y
COMUNICACIONES A CONGRESOS**

ARTÍCULOS ENVIADOS

“*Safer Vectors For Gene Therapy Of Primary Immunodeficiencies*”. **Romero Z**, Toscano MG, Unciti JD, Molina IJ, Martín F. *Current Gene Therapy* 2009 (Invitation. Sent the 28th January).

ARTÍCULOS EN PREPARACIÓN

“*Regulated Lentiviral Vectors for Gene Therapy of CD40L Deficiency*”. **Romero Z**, Martín F & Molina IJ. (In preparation).

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Comunicación Poster “*Lentiviral vector development for X-linked hyper IgM síndrome (XHIGM-1) for gene therapy*”. **Romero Z**, Unciti JD, Cobo M, Martín F, Molina I. XVIth Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) (Brujas, Bélgica). Noviembre-2008. Resumen publicado en *Human Gene Therapy* 2008;19:1132.

Comunicación Oral “*Desarrollo de vectores lentivirales transcripcionalmente regulados para la terapia génica del Síndrome de Hiper IgM ligado al cromosoma X (XHIM1)*”. **Romero Z**, Unciti JD, Carranza D, Cobo M, Martín F, Molina IJ. XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) (Palma de Mallorca). Mayo-2008. Resumen publicado en *Inmunología* 2008; 27 suppl, pag 99.

Comunicación Póster “*Expresión de NKG2 en linfocitos deciduales de primer trimestre en embarazo normal y en aborto espontáneo*”. Unciti JD, Tirado I, **Romero Z**, Molina IJ, García Olivares E. XXXI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) (Córdoba). Mayo-2008. Resumen publicado en *Inmunología* 2005; 24 suppl, pag 180.