

## Virus adeno-asociado y su uso en virotecnología

Arturo Liñan-Torres\*, Roberto C. García-Torres y Laura A. Palomares

*Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ave. Universidad 2001 Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos, 62210, México*

\*Autor para correspondencia: arturo.linan@ibt.unam.mx

### Resumen

Actualmente, existen siete terapias génicas aprobadas para su uso en humanos que se basan en virus adeno-asociado (VAA). Este virus ha adquirido un rol importante en la virotecnología aplicada en salud, la cual se define como toda aplicación tecnológica que use al menos un componente de origen viral. Se han descrito más de 100 serotipos de VAA, y de estos, el serotipo 2 ha sido el mejor caracterizado. Este virus destaca en virotecnología como vector viral y/o andamio viral, debido a que no es patógeno para humanos, transduce diversos tipos celulares, las proteínas que conforman su cápside son poco inmunogénicas (baja probabilidad de rechazo), es estable en un intervalo amplio de pH y temperatura, es de construcción recombinante simple, otorga polivalencia (60 proteínas estructurales forman la cápside) cuando se despliegan moléculas en su superficie, y aumenta la estabilidad estructural e inmunogenicidad de las moléculas desplegadas. En esta revisión se presenta información actualizada sobre la biología de VAA y su uso en virotecnología.

**Palabras Claves:** *virotecnología, virus adeno-asociado, vector viral, andamio viral*

### Abstract

Currently, seven gene therapies approved for use in humans are based on adeno-associated virus (AAV). This virus has acquired an important role in virotechnology applied to health, defined as any technological application that uses at least one component of viral origin. More than 100 AAV serotypes have been described; of these, serotype 2 has been the best characterized. This virus stands out in virotechnology as a viral vector and/or viral scaffold, because it is not pathogenic for humans, it transduces various cell types, proteins that make up the capsid are poorly immunogenic (low probability of rejection), it is stable over a wide range of pH and temperature, its recombinant construction is simple, it provides polyvalence (60 structural proteins make up the capsid) when molecules are displayed on its surface, and increases the structural stability and immunogenicity of displayed molecules. In this review, updated information on the biology of AAV and its use in virotechnology is presented.

**Key Words:** *virotechnology, adeno-associated virus, viral vector, viral scaffold*

## Introducción

Los virus son conocidos por causar enfermedades, pero ellos también pueden ser materiales para el desarrollo de tecnologías que pueden ser aplicadas en diversas áreas (Wen & Steinmetz, 2016; Reguera *et al.*, 2023). A la tecnología basada en virus también se le puede denominar virotecnología o biotecnología viral. Estos términos no son ampliamente utilizados en la comunidad científica, y actualmente, no se le atribuye la introducción (acuñar) de virotecnología o biotecnología viral a alguien en particular. En México, la Dra. Laura A. Palomares del Instituto de Biotecnología (IBt) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) usa y difunde con frecuencia el término virotecnología. Asimismo, el M. en C. Arturo Liñan del IBt-UNAM difunde este término en Perú. Podemos definir a virotecnología como “toda aplicación tecnológica que use al menos un componente de origen viral”. La virotecnología se relaciona con la nanotecnología, la cual se centra en el desarrollo de nanomateriales. Según la FDA, un nanomaterial se define como aquel generado mediante ingeniería (manipulación deliberada, fabricación o selección) que tiene al menos una dimensión en el intervalo de tamaño de 1 a 100 nm (Lizarazo-Salcedo *et al.*, 2018).

Algunas ventajas de los virus empleados en virotecnología, en comparación con los materiales sintéticos usados a la misma escala nano, incluyen la disposición espacial altamente precisa de sus subunidades en una amplia gama de formas y tamaños, muchas vías disponibles para una modificación fácil y reproducible, en su mayoría se pueden autoensamblar, suelen ser más seguros al administrarse a humanos debido a que son biodegradables y no biopersistentes (Wen & Steinmetz, 2016; Lizarazo-Salcedo *et al.*, 2018).

Entre las aplicaciones o desarrollos más destacados de la virotecnología se encuentra la terapia génica, el desarrollo de vacunas, sistemas de expresión recombinante mediada por vectores virales y el desarrollo de sistemas

de despliegues (andamio viral) (Wen & Steinmetz, 2016; Cuevas-Juárez *et al.*, 2023). Otros desarrollos del área de la virotecnología incluyen a los nanobiorreactores, nanomotores, nanocatalizadores, uso en imagenología en salud, nanoconductores, entre otros (Plascencia-Villa *et al.*, 2009; Wen & Steinmetz, 2016; Tejeda-Rodríguez *et al.*, 2019; McNeale *et al.*, 2023).

Algunos de los virus más empleados en virotecnología son bacteriófagos, baculovirus, lentivirus, virus adeno-asociado (VAA), adenovirus, retrovirus, virus vaccinia Ankara modificado, virus del moteado clorótico del caupí y virus del mosaico del tabaco (Wen & Steinmetz, 2016; Travieso *et al.*, 2022).

En el área de la terapia génica, VAA es el vector viral o herramienta virotecnológica más empleada (Zhao *et al.*, 2022). De igual manera, este virus ha sido empleado para el despliegue de péptidos o proteínas con diversos fines (Cuevas-Juárez *et al.*, 2023). En este artículo se describe el uso de VAA en la virotecnología.

## Virus adeno-asociado

VAA pertenece a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus* (Mena-Enriquez *et al.*, 2012). VAA presenta replicación defectuosa, ya que requiere de la co-infección con virus “auxiliares” para llevar a cabo su ciclo de replicación; por ello se considera un virus con riesgo de bioseguridad bajo a nulo. Es un virus sin envoltura, posee un diámetro de ~18 a 26 nm y está compuesto por tres proteínas estructurales, VP1, VP2 y VP3 en proporciones 1:1:10, respectivamente. La cápside está formada por 60 monómeros de VPs. Su genoma es de ADN de cadena sencilla, tiene una longitud de ~ 4.7 kb y codifica para 10 proteínas, las cuales son Rep40, Rep52, Rep68, Rep78, VP1, VP2, VP3, proteína accesoria asociada a membrana (MAAP, por sus siglas en inglés), proteína activadora del ensamblaje (AAP, por sus siglas en inglés), y proteína X, (Dubielzig *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2020; Asaad *et al.*, 2023). La longitud y peso molecular de las proteínas se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Longitud y peso molecular de las proteínas de virus adeno-asociado.**

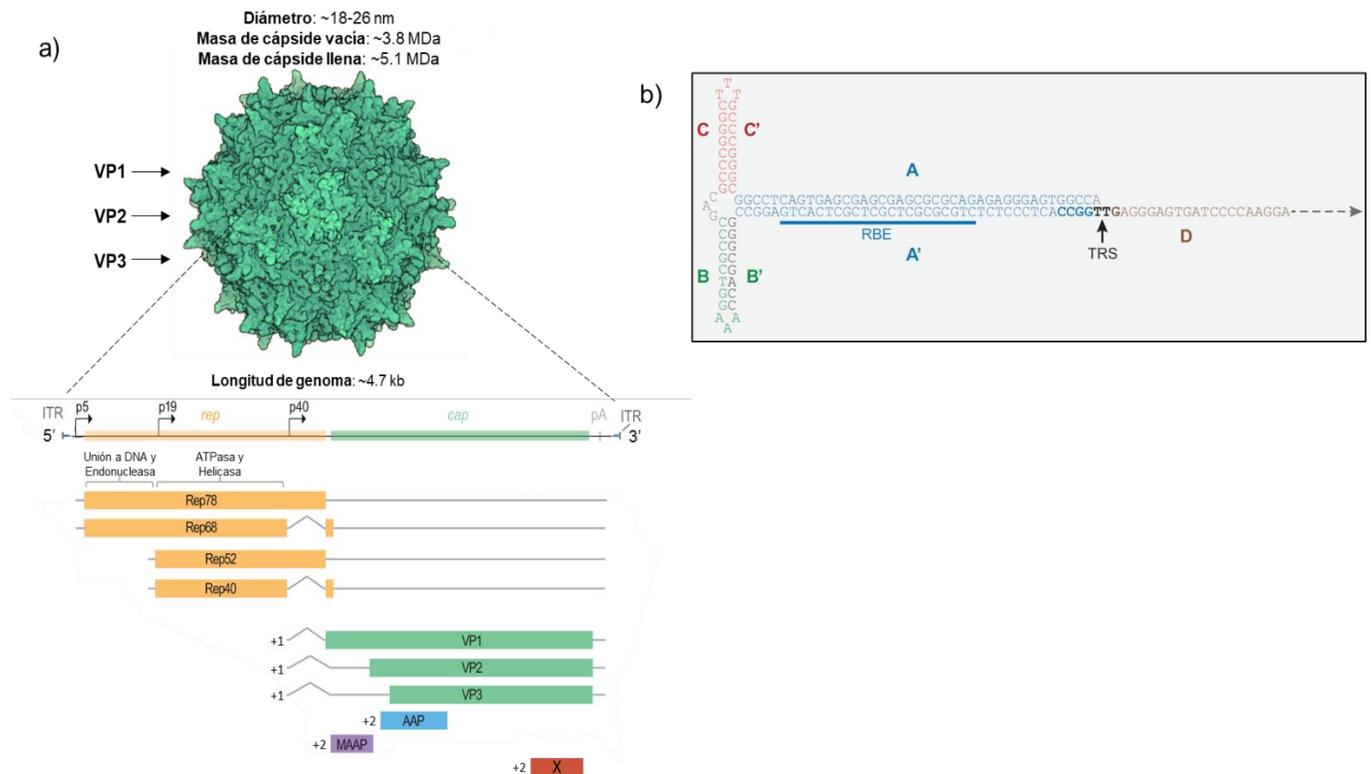
Proteína	Longitud (aa)	Peso molecular (kDa)
Rep78	621	78
Rep68	536	68
Rep52	397	52
Rep40	312	40
VP1	735	87
VP2	598	72
VP3	533	62
MAAP	119	13*
AAP	204	23*
X	155	18*

\*Los pesos de MAAP, AAP y X fueron calculados con la herramienta ProtParam de ExPASy ([web.expasy.org/protparam/](http://web.expasy.org/protparam/)).

### Organización y expresión del genoma

El genoma (Figura 1) está flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 145 b que forman horquillas dando origen a una estructura en forma de T. Las ITR contienen el origen de replicación y un auto-iniciador,

son necesarias para la regulación de la transcripción y proporcionan la señal para el empaquetamiento viral (Xiao *et al.*, 1998). Además, las secuencias ITR pueden mediar la integración de VAA en secuencias diana dentro del genoma del huésped o plásmidos (Berns, 2020).



**Figura 1. Virus adeno-asociado. a) Estructura, genoma y proteínas de Virus adeno-asociado. b) Estructura del ITR del extremo 5'. Los datos de la masa de la cápside corresponden al serotipo 8 de VAA (VAA-8) y fueron tomados de Pierson *et al.* (2016). RBE y TRS constituyen el origen de replicación de VAA. Abreviaturas: RBE, elemento de unión a Rep; TRS, sitio de resolución terminal (Modificado de Maurer & Weitzman, 2020).**

El genoma de VAA consta de dos genes denominados *rep* y *cap*, y de los promotores p5, p19 y p40 que se encuentran en las posiciones 287, 872 y 1853 del genoma, respectivamente (Berns, 2007). Las proteínas Rep se encuentran bajo el mismo marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés), las VPs bajo otro ORF y las proteínas restantes bajo un tercer ORF (Elmore *et al.*, 2021).

Las proteínas Rep78 y Rep68 se expresan bajo el promotor p5, pero difieren entre sí en el extremo C-terminal. El transcrito que codifica para Rep68 pasa por un proceso de empalme. Como consecuencia, en la proteína Rep68 no están incluidos los 92 aminoácidos (aa) del extremo C-terminal de Rep78, pero sí, 7 aa que no están en Rep78. Las proteínas Rep52 y Rep40 se expresan bajo el promotor p19. Los procesos de transcripción y traducción correspondientes a estas Rep son como los descritos para las Rep de mayor peso molecular (Chiorini *et al.*, 1996; Berns, 2007).

La transcripción del gen *cap* es regulada por un solo promotor, p40. Mediante empalme alternativo se generan dos ARNm, a partir del ARNm más grande se produce VP1, y a partir del segundo ARNm se producen VP2 y VP3. Las VPs se encuentran codificadas bajo el mismo marco de lectura (+1). El gen *cap* también codifica para las proteínas MAAP, AAP y X, pero éstas están codificadas en el siguiente marco de lectura (+2) con respecto a las VPs (ORF anidado). A diferencia del codón de inicio estándar (AUG), VP2 inicia con el codón ACG, mientras que MAAP y AAP inician con CUG (Maurer & Weitzman, 2020; Asaad *et al.*, 2023).

### **Función de las proteínas**

Rep52 y Rep40 poseen actividad helicasa y ATPasa, interactúan con el ADN de cadena sencilla y las cápsides preformadas para llevar a cabo el empaquetamiento mediante la introducción de ADN viral de cadena sencilla a través del poro formado por el eje de simetría de orden cinco. Rep78 y Rep68 promueven el rescate del genoma viral integrado en el genoma del huésped, son

indispensables para la replicación del ADN viral, poseen actividad endonucleasa, helicasa y ATPasa, presentan funciones de unión al ADN e integración sitio específico en el locus AAVS1 del cromosoma humano 19 (específicamente 19q13.4) (fase de latencia). Las VPs luego de ser sintetizadas en el citoplasma son transportadas al núcleo para su autoensamblaje apoyado por AAP, según se requiera (dependiente del serotipo de VAA). AAP previene la degradación de VPs al brindarles estabilidad (Aponte-Ubillus *et al.*, 2018; Maurer *et al.*, 2018; Maurer & Weitzman, 2020; Asaad *et al.*, 2023). Las tres VPs contribuyen a la estructura de la cápside y al tropismo viral. Luego de que el virión de VAA ingresa a una célula, este escapa del endosoma que lo contiene debido a que el pH disminuye dentro de la vesícula, lo que permite que el dominio oculto de fosfolipasa A2 (PLA2, por sus siglas en inglés) en el extremo N-terminal único de VP1 sea expuesto y degrade la membrana del endosoma. Por otra parte, VP3 es la proteína estructural más abundante en la cápside de VAA y se ha reportado que VP3 es suficiente para formar cápsides (Maurer *et al.*, 2018). Se ha reportado que MAAP afecta la estabilidad de las VPs y favorece la degradación de la cápside, su ausencia conduce al incremento de expresión de proteínas Rep y AAP; además, es un factor de salida del virus durante su ciclo de replicación, y participa en el empaquetamiento y producción de viriones. Se ha reportado que la proteína X participa en el ciclo de replicación en queratinocitos, las células blanco naturales del serotipo 2 de VAA (Asaad *et al.*, 2023).

### **Serotipos**

Se han reportado más de 100 serotipos de VAA; de los cuales 12, han sido mejor caracterizados (VAA-1 a VAA-12) y se han descrito sus receptores, tropismos específicos por distintos tipos celulares o tejidos (tabla 2) (Daya & Berns, 2008). Las posiciones en el genoma, tamaños o longitudes en este artículo con respecto a VAA son referidas al serotipo 2, el más estudiado hasta ahora, a menos que se especifique lo contrario (NCBI Reference Sequence: NC\_001401.2).

# Artículos

**Tabla 2.** Receptores y tropismo tisular de los serotipos de virus adeno-asociado (Adaptado de Nonnenmacher & Weber, 2012; Pupo et al., 2022; Issa et al., 2023).

Serotipo	Receptor primario (glicano)	Receptor secundario (co-receptor)	Tropismo tisular
VAA-1	Ácido siálico ligado a N	AAVR, GPR108, TM9SF2	ME <sup>m,c,pnh,h</sup> , SNC <sup>m,c,pnh</sup> , pulmón <sup>m,pnh,h</sup> , retina <sup>m,r</sup> , páncreas <sup>m</sup> , corazón <sup>m,p</sup> , hígado <sup>m,pnh</sup> , MLEV <sup>r,h</sup>
VAA-2	HSPG	AAVR, GPR108, TM9SF2, LamR, integrina αVβ5, integrina α5β1, FGFR1, CD9, HGFR	ME <sup>m,c,h</sup> , SNC <sup>m,c,pnh,h</sup> , hígado <sup>m,c,pnh,h</sup> , riñón <sup>m</sup> , retina <sup>m,c,pnh,h</sup> , pulmón <sup>pnh,h</sup> , articulación <sup>h</sup> , cartilago en estado de artritis <sup>m</sup> , MLEV <sup>co</sup>
VAA-3	HSPG	AAVR, GPR108, LamR, FGFR1, HGFR	Hígado <sup>pnh,h</sup> , ME <sup>m</sup> , SNC <sup>pnh</sup> , CCIC <sup>m</sup>
VAA-4	Ácido siálico ligado a O	GPR108	SNC <sup>m,c,pnh</sup> , retina <sup>m,c</sup> , pulmón <sup>m,pnh</sup> , riñón <sup>m</sup> , corazón <sup>m</sup>
VAA-5	Ácido siálico ligado a N	AAVR, PDGFR, TM9SF2	ME <sup>m</sup> , SNC <sup>m,c,pnh,r</sup> , pulmón <sup>m</sup> , retina <sup>m</sup> , hígado <sup>pnh,h,m</sup> , MLEV <sup>m</sup>
VAA-6	Ácido siálico ligado a N, HSPG	AAVR, GPR108, TM9SF2, EGFR	ME <sup>m,c</sup> , corazón <sup>m,o,p,c</sup> , pulmón <sup>c,m,pnh</sup> , EVR <sup>m,c,p</sup> , hígado <sup>c,m</sup> , SNC <sup>pnh</sup> , retina <sup>r</sup>
VAA-7	Desconocido	GPR108, TM9SF2	ME <sup>m</sup> , retina <sup>m</sup> , SNC <sup>m,pnh</sup> , hígado <sup>m,h</sup> , corazón <sup>m</sup> , MLEV <sup>m,h</sup>
VAA-8	Desconocido	AAVR, GPR108, TM9SF2, LamR	Hígado <sup>m,c,pnh,h</sup> , ME <sup>m,c</sup> , SNC <sup>m,c,pnh</sup> , retina <sup>m,c,p</sup> , páncreas <sup>m</sup> , corazón <sup>m,c,p</sup> , riñón <sup>m</sup> , tejido adiposo <sup>m</sup>
VAA-9	Galactosa ligada a N	AAVR, GPR108, TM9SF2, LamR	Hígado <sup>m</sup> , corazón <sup>m,p,c,pnh</sup> , ME <sup>m,c,pnh,h</sup> , pulmón <sup>m</sup> , páncreas <sup>m</sup> , SNC <sup>m,c,pnh,r</sup> , retina <sup>m,pnh</sup> , testículos <sup>m</sup> , riñón <sup>m</sup> , EVR <sup>m</sup>
VAA-10	Desconocido	Desconocido	Corazón <sup>m</sup> , pulmón <sup>m</sup> , SNC <sup>m</sup> , páncreas <sup>m</sup> , hígado <sup>m,pnh</sup> , riñón <sup>m,pnh</sup> , útero <sup>m</sup> , intestino <sup>pnh,m</sup> , ganglio linfático <sup>pnh</sup> , glándulas suprarrenales <sup>pnh</sup> , retina <sup>m</sup>
VAA-11	Desconocido	Desconocido	ME <sup>m</sup> , riñón <sup>m,pnh</sup> , SNC <sup>pnh,m</sup> , hígado <sup>pnh</sup> , bazo <sup>m</sup> , pulmón <sup>m</sup> , corazón <sup>m</sup> , estómago <sup>m</sup> , intestino <sup>pnh,m</sup> , ganglio linfático <sup>pnh</sup> , glándulas suprarrenales <sup>pnh</sup>
VAA-12	Desconocido	Desconocido	ME <sup>m</sup> , glándulas salivales <sup>m</sup> , EVR <sup>m</sup>

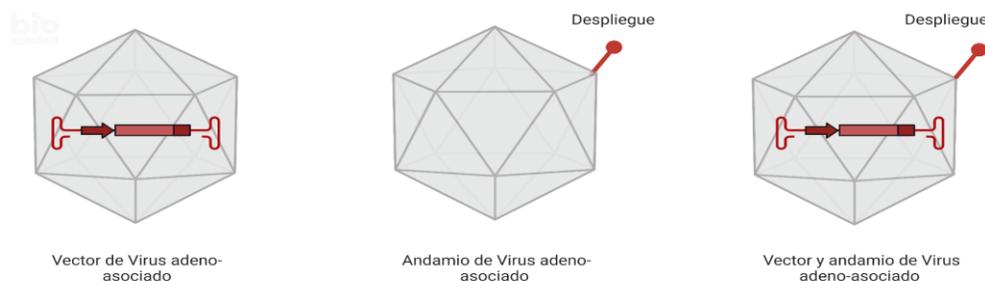
Abreviaturas: N, nitrógeno; HSPG, proteoglicano de heparán sulfato; O, oxígeno; AAVR, receptor de VAA; GPR108, receptor 108 acoplado a proteína G; TM9SF2, Miembro 2 de la superfamilia transmembrana 9; LamR, receptor de laminina; FGFR1, receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos; HGFR (c-MET), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; PDGFR, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; ME, músculo esquelético; SNC, sistema nervioso central; CCIC, células ciliadas internas de la cóclea; MLEV, músculo liso y endotelio vasculares; EVR, epitelio de las vías respiratorias.

Abreviaturas de superíndices: h, humano; c, canino; p, porcino; m, murino; pnh, primate no humano; r, rata; o, oveja; co, conejo; f, felino.

## Virus adeno-asociado en virotecnología

Como se mencionó antes, VAA es uno de los virus más empleados en virotecnología, esto es debido a sus características genómicas,

inmunológicas y estructurales (Travieso *et al.*, 2022). Podemos dividir a esta herramienta virotecnológica con base en su función de vector viral, andamio viral, y vector y andamio viral al mismo tiempo (Figura 2).



**Figura 2.** Vector, andamio, y vector y andamio de virus adeno-asociado. Con respecto al genoma, los extremos en forma de T representan los ITR. La flecha color vino indica un promotor seguido de un transgén de interés en color rojo, y luego, se muestra la cola poli A en color vino. Con respecto a la función de andamio viral, el apéndice en tono rojo indica el despliegue de uno de los 60 posibles despliegues si se considera un despliegue por cada monómero en la cápside de VAA (Generado por Biorender, <https://app.biorender.com/>).

## **Vector de virus adeno-asociado**

A medida que avanza el campo de la terapia génica mediada por vectores de VAA (vVAA), se requiere una mayor caracterización sobre este tipo de vectores, incluyendo mejores procesos de producción, conocer la inmunogenicidad intrínseca, entre otros.

### *Producción*

Para la replicación y producción natural de VAA, se requiere de la co-infección celular con adenovirus o virus de herpes simple (Sierra-Delgado *et al.*, 2019). Para la producción de un vVAA, es decir un virus recombinante, se requieren tres componentes principales (Mena-Enriquez *et al.*, 2012; Aponte-Ubillus *et al.*, 2018):

1. El genoma del vVAA que contiene el transgén de interés, elementos reguladores (promotor y cola poli A) y los ITR.
2. Los genes *rep* y *cap* de VAA silvestre.
3. Un plásmido auxiliar que contenga genes E2A, E4, y ARN VA de adenovirus si es que la producción se realiza mediante transfección en células de mamífero como HeLa y HEK-293 o del uso de baculovirus para la entrega del genoma del vVAA, y de los genes *rep* y *cap* si se usa el sistema de producción en células de insecto.

Existen variantes en el sistema de producción en células de mamífero y de insecto, y otros sistemas propuestos en levaduras y otros tipos de células (Aponte-Ubillus *et al.*, 2018).

Regularmente, un vVAA se define por tres componentes:

1. La cápside o envoltura proteica que encapsida la carga genética, define el tropismo tisular o celular y la inmunogenicidad hacia el vector.
2. El transgén de interés, que cuando se expresa en células, sirve para conferir un efecto deseado.
3. El "casete regulador", los elementos potenciadores/promotores/auxiliares combinados que controlan la expresión somática estable o transitoria del transgén como un episoma o como un integrante cromosómico.

## *Inmunogenicidad contra vectores de VAA*

Los diferentes serotipos de VAA están presentes en nuestro ambiente, lo que significa que tanto los seres humanos como los animales podrían haber estado expuestos previamente a algunos serotipos de estos virus y esto puede haber inducido una respuesta inmune tanto a nivel celular como humoral (Jungmann *et al.*, 2017; Mingozi & Buning, 2015). Desde una perspectiva inmunológica, la estructura de la cápside del vVAA es muy similar a la del virión que se encuentra en la naturaleza. Cuando se administra este vector, se activa la respuesta inmune contra las proteínas de la cápside del virus, ya sea en pacientes que han estado expuestos previamente (memoria inmunológica) a VAA o en aquellos que no han tenido esa exposición (Daya & Berns, 2008; Mingozi & Buning, 2015). Esta respuesta inmune contra la cápside puede impedir que el vVAA entregue el material genético a las células dadas, lo que representa una de las principales barreras tanto para el tratamiento inicial como para la re-administración del vector (Mingozi & High, 2011). A pesar de la similitud entre la cápside de los vVAA y los VAA presentes en la naturaleza, la administración del vector difiere de la infección natural en tres aspectos: se introduce un mayor número de partículas virales en el cuerpo, la ruta de administración es diferente (la exposición natural a VAA generalmente ocurre por inhalación) y, por último, el vVAA no se replica activamente debido a la falta de elementos auxiliares, lo que disminuye la respuesta inmune que se genera (Calcedo & Wilson, 2013). El efecto de la inmunogenicidad preexistente se puede superar al usar serotipos con menos prevalencia de inmunogenicidad en humanos, la búsqueda de nuevos serotipos o la generación de vVAA con cápsides mutantes que eviten esa respuesta inmune preexistente (Issa *et al.*, 2023).

## *Comparación y ventajas de usar VAA con respecto a otros sistemas de vectores*

A lo largo de los años se han utilizado diferentes tipos de vectores en biotecnología en salud. Estos se pueden clasificar en: vectores no virales y vectores virales (tabla 3).

# Artículos

**Tabla 3.** Vectores no virales y virales (adaptado de Flores et al., 2006).

Vector no viral		Vector viral
Físicos	Químicos	
Biobalística	Fosfato cálcico	Retrovirus
Electroporación	Liposomas	Adenovirus
Microinyección	Receptores	Virus adeno-asociado
		Virus de herpes simple

En general, los vectores virales presentan mayor eficacia de transferencia en comparación a los vectores no virales, y la posibilidad, en algunos casos, de integrar el transgén de interés en el genoma de la célula huésped (Fominaya et al., 2007).

Con respecto a los vectores virales más usados, en la tabla 4 se muestran sus ventajas y desventajas.

**Tabla 4.** Principales vectores virales (adaptado de Rozalén et al., 2003).

Vector	Ventajas	Desventajas
Virus adeno-asociado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transducen células en reposo o replicación</li> <li>• Posible integración específica (mayor duración de la expresión génica)</li> <li>• La expresión del gen (episoma) puede persistir varios años</li> <li>• Baja inmunogenicidad hacia la cápside</li> <li>• Títulos altos</li> <li>• No son patógenos en humanos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poca longitud del transgen</li> <li>• Dificiles de producir en gran cantidad</li> <li>• No parecen transducir a todo tipo de células <i>in vivo</i></li> <li>• Posible mutación insercional</li> </ul>
Adenovirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transducen células en reposo o replicación</li> <li>• Episomales</li> <li>• Estables <i>in vivo</i></li> <li>• Títulos altos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induce potente respuesta inmune e inflamatoria</li> <li>• Direccionalidad difícil</li> <li>• Difícil manejo</li> </ul>
Retrovirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Integración estable (mayor duración de la expresión génica)</li> <li>• Fácil manejo</li> <li>• No provocan respuesta inmune</li> <li>• Transducción eficiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bajo título</li> <li>• Posible mutación insercional</li> <li>• Extinción del transgen <i>in vivo</i></li> <li>• Requieren proliferación celular</li> </ul>
Virus de herpes simple	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transducen células en reposo</li> <li>• Episomales</li> <li>• Adecuados para el sistema nervioso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patogenicidad</li> <li>• Difícil manejo</li> </ul>

La elección del vector viral depende del uso y la eficiencia de la expresión del transgén, también se considera que su producción sea fácil, segura y estable.

### *Aplicaciones de vectores de VAA en terapia génica*

En la actualidad, se cuenta con la aprobación de terapias génica para humanos basadas en vVAA. A la fecha, hay siete productos basados vVAA (tabla 5).

# Artículos

**Tabla 5.** Terapias génicas aprobadas que emplean vectores de virus adeno-asociado (modificado de Mitra et al., 2023).

Vector	Producto (nombre comercial)	Desarrollado por	Fecha de aprobación	Indicación
VAA-1	Glybera <sup>§</sup>	UniQure Biopharma	2012	Deficiencia de lipoproteína lipasa (LPLD)
VAA-2	Luxturna	Spark Therapeutics	2017	Distrofia de retina
VAA-9	Zolgensma	Novartis	2019	Atrofia muscular en la columna
VAA-5	Hemgenix	CSL Behring	2022	Hemofilia B
VAA-5	Roctavian	Biomarin	2022	Hemofilia A
VAA-2	Upstaza	PTC Therapeutics	2022	Deficiencia de L-Aminoácido aromático descarboxilasa (AADC)
VAA-rh74*	Elevidys	Sarepta Therapeutics	2023	Distrofia muscular de Duchenne

\*Serotipo aislado de mono Rhesus, <sup>§</sup>Retirado del mercado

## Aplicaciones de vectores de VAA en vacunología

Actualmente, no hay vacunas aprobadas para su uso en humanos que se basen en un vVAA, sin embargo, hay desarrollos propuestos contra enfermedades infecciosas como las inducidas por virus del herpes simple, coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV), virus dengue, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus del papiloma humano (VPH) (Liñan-Torres, 2021).

## Andamio de virus adeno-asociado

La cápside de VAA ha sido empleada para el despliegue de péptidos y proteínas con la finalidad de estudiar la biología de VAA, modificación del tropismo de vectores virales y el desarrollo de candidatos vacunales (Rojas-Gómez, 2009; Büning & Srivastava, 2019).

## Producción

La producción de un andamio de VAA (aVAA) depende de lo que se requiere desplegar. Para el despliegue de un péptido o proteína se puede emplear ingeniería genética o bioconjugación (Becker et al., 2022). La

generación de un aVAA requiere solo del gen *cap* de VAA, el cual al expresarse en un sistema recombinante (células de insecto, células de mamífero, entre otros) puede formar una partícula pseudoviral (VLP, por sus siglas en inglés). Una VLP es un complejo autoensamblado de proteínas estructurales virales sin contener un material genético (Charlton et al., 2019).

La producción de un aVAA mediante ingeniería genética puede realizarse mediante la fusión de la secuencia correspondiente a un péptido o a una proteína al N-terminal de VP2, o mediante la inserción de la secuencia de un péptido pequeño en sitios específicos en la región común entre las tres VPs (tabla 6) (Büning & Srivastava, 2019). Para la producción de un aVAA mediante bioconjugación se suele obtener la VLP de VAA sin modificaciones genéticas y posteriormente mediante un *linker* se une un péptido o una proteína a la superficie de la VLP a través de las cadenas laterales de sus aa expuestos (Zhang et al., 2016; Muik et al., 2017; Lam et al., 2021). Al igual que para los vVAA, pueden existir otros sistemas de producción para los aVAA.

# Artículos

**Tabla 6.** Sitios específicos de inserción genética en las VPs de los serotipos mejor caracterizados de virus adeno-asociado (tomado de Büning & Srivastava, 2019; Börner et al., 2020).

Serotipo	Sitios de inserción (Referentes a VP1)
VAA-1	588, 590
VAA-2	453, 520, 584, 585, 587, 588
VAA-3	586, 588
VAA-4	584, 586
VAA-5	575, 577
VAA-6	585, 588, 590
VAA-7	589
VAA-8	585, 590
VAA-9	588, 589
VAA-12	592, 594

### Comparación y ventajas de usar VAA con respecto a otros sistemas de andamios

En general, los andamios basados en proteínas como los aVAA se degradan rápido, sus productos de degradación no suelen ser tóxicos y su producción suele ser rentable. En contraste, por lo general, los andamios basados en polímeros sintéticos o basados en metales poseen una tasa de degradación baja, sus productos de degradación pueden inducir inflamación o necrosis y pueden resultar costosos para su ingreso en la industria farmacéutica. El andamio viral al ser producto del autoensamblaje (VLP) resulta en una estructura perfectamente definida, estable y homogénea (Martínez-Flores, 2020; Klimek & Ginalska, 2020). Los andamios sintéticos se diseñan imitando la distribución homogénea de despliegues en las partículas virales (Villanueva-Flores et al., 2020).

En comparación a otros andamios virales, los aVAA se destacan por ser de construcción simple, y ser estables en un intervalo amplio de pH y de temperatura. Además, se debe destacar la posibilidad de despliegue en cada monómero de la cápside (polivalencia) y la

confirmación de brindar estabilidad estructural de péptidos pequeños, así como también, incrementar la inmunogenicidad de péptidos vacunales (Liñan-Torres, 2021; Cuevas-Juárez et al., 2023).

### Aplicaciones de andamios de VAA

Actualmente, algunos productos que usan andamios virales cuentan con aprobación para su administración en humanos. Un ejemplo de estos productos son las vacunas RTS,S (Mosquirix) y R21 contra la malaria, las cuales emplean andamios de virus de la hepatitis B (Dattoo et al., 2021; Naddaf, 2023). También existen vacunas aprobadas para su uso en humanos contra la hepatitis A que emplean andamios virales, también llamados virosomas basados en virus de la influenza (Bovier, 2008). Hasta ahora no existen desarrollos aprobados para su administración en humanos que se basen en aVAA; sin embargo, en la literatura se describen algunas propuestas con referencia a candidatos vacunales (tabla 7).

**Tabla 7.** Candidatos vacunales basados en el uso de virus adeno-asociado como andamio (adaptado de Liñan-Torres, 2021; Cuevas-Juárez et al., 2023).

Serotipo	Péptido desplegado correspondiente a	Enfermedad
VAA-2	Proteína L2	Papiloma humano
VAA-2	Ovoalbúmina	Alergia
VAA-2	Proteína L2	Papiloma humano
VAA-2	HER-2	Cáncer de mama
VAA-2	Proteína E	Dengue y Zika
VAA-8	Proteína E	Dengue y Zika

Abreviatura: HER-2, receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. Todos los candidatos mostrados se construyeron mediante la inserción de péptidos entre las VPs.

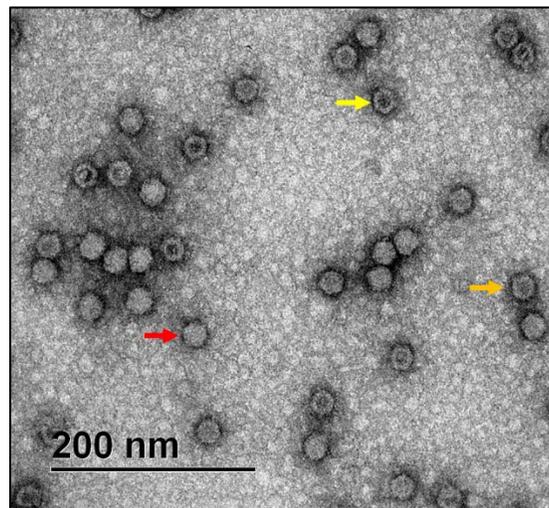
## ***Función dual: vector y andamio de virus adeno-asociado***

La función dual de vector y andamio viral se puede considerar en vacunas aprobadas para administración en humanos contra los virus dengue y del Ébola. Por ejemplo, el diseño de una de las vacunas contra dengue, Dengvaxia, está basado en virus de la fiebre amarilla, pero con el reemplazo, a nivel estructural (cápside) y genómico, de sus proteínas prM y E por las correspondientes de virus dengue. El diseño de la segunda vacuna aprobada contra dengue, Qdenga, es similar al descrito para Dengvaxia (Thomas, 2023). Por otro lado, la vacuna contra virus del Ébola, ERVEBO, se basa en virus de la estomatitis vesicular, pero con el reemplazo, a nivel estructural y genómico, de su glicoproteína de superficie (Malik *et al.*, 2023). Estas vacunas contra dengue y Ébola también se pueden denominar de tipo virus vivo atenuado, vector viral o pseudotipado (Emanuel *et al.*, 2018).

En el caso de VAA, no existe ningún producto aprobado para su aplicación en humanos que presente esta función dual. Por otra parte, se puede considerar esta función dual en muchas de las propuestas de vVAA que se les inserta o acopla algún péptido o proteína en la superficie para modificar su tropismo (Büning & Srivastava, 2019). Una propuesta que no se enfoca en la modificación del tropismo de VAA es la desarrollada por Rybniker *et al.* (2012),

ellos proponen un candidato a vacuna contra *Mycobacterium tuberculosis* basado en el despliegue del antígeno Ag85A en la superficie de la cápside de VAA-2 mediante fusión genética al N-terminal de VP2 y la encapsidación de un genoma que codifica para el mismo antígeno Ag85A. Otra propuesta es la que se desarrolla en el protocolo de tesis de licenciatura de Roberto C. García reconocido con el “Premio Sergio Sánchez Esquivel 2023” por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB, 2023). Roberto está evaluando la función de vector viral de andamios de VAA-2 y VAA-8 que despliegan un péptido inmunogénico correspondiente a los virus dengue y Zika en la superficie; a diferencia de Rybniker *et al.* (2012), este péptido está insertado en la tres VPs. En la figura 3, se muestran estructuras de VAA-8 que poseen un genoma que codifica para la proteína fluorescente verde mejorada (eGFP, por sus siglas en inglés) y despliegan el péptido inmunogénico. Algo para tener en cuenta es caracterizar si la función de andamio (fusión genética o conjugación) afecta la función de vector viral.

El proceso producción y las ventajas de la función dual de vector y andamio viral de VAA son los mismos que se describen en las secciones de vVAA y aVAA.



**Figura 3.** Virus adeno-asociado del serotipo 8 que despliega un péptido de 24 aa y contiene un genoma que codifica para eGFP. Se muestra una micrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa y a un aumento de 31500X. El péptido corresponde a un inmunógeno de los virus dengue y Zika, y secuencias linker. La flecha roja señala un andamio viral con genoma encapsidado, la flecha naranja señala un andamio viral parcialmente lleno (encapsida un genoma parcial) y la flecha amarilla señala un andamio viral vacío (no hay genoma encapsidado) (Imagen propia).

## Conclusión

VAA es una de las herramientas virotecnológicas más importantes que se emplean actualmente en el área de salud. En el mercado, ya existen terapias génicas aprobadas para su uso en humanos que se basan en VAA. Las características intrínsecas, el descubrimiento de nuevos serotipos y la posibilidad de alterar su tropismo brindan un sinfín de alternativas para la aplicación de este virus como vector y/o como andamio principalmente en las áreas de terapia génica y vacunología. En el futuro es probable que VAA también se aplique a otras áreas de investigación y desarrollo como nanobiorreactores, nanomotores, nanocatalizadores, uso en imagenología en salud, nanoconductores, entre otros.

## Agradecimientos

ALT es alumno del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y recibe beca del CONAHCYT. RCGT desarrolla su tesis de licenciatura en el IBT-UNAM y recibe beca por parte del proyecto PAPIIT UNAM IV200420. Se agradece la asistencia técnica de la M. C. Ana Ruth Pastor, del L. I. Jesús Omar Arriaga y de la B.A. Dip.Lib. A. L. A. Shirley Elizabeth Ainsworth del IBT-UNAM.

## Referencias

Aponte-Ubillus, J. J., Barajas, D., Peltier, J., Bardliving, C., Shamlou, P., & Gold, D. (2018). Molecular design for recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector production. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 1045-1054.

Asaad, W., Volos, P., Maksimov, D., Khavina, E., Deviatkin, A., Mityaeva, O., & Volchkov, P. (2023). AAV genome modification for efficient AAV production. *Heliyon*.

Becker, J., Fakhiri, J., & Grimm, D. (2022). Fantastic AAV gene therapy vectors and how to find them—random diversification, rational design and machine learning. *Pathogens*, 11(7), 756.

Berns, K. I. (2020). The unusual properties of the AAV inverted terminal repeat. *Human gene therapy*, 31(9-10), 518-523.

Berns, K.I. (2007). *Parvoviridae*. En Knipe, D.

M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., & Straus, S. E. (Eds.), *Fields Virology* (pp. 2437-2477). Lippincott Williams & Wilkins.

Börner, K., Kienle, E., Huang, L.-Y., Weinmann, J., Sacher, A., Bayer, P., Stüllein, C., Fakhiri, J., Zimmermann, L., Westhaus, A., Beneke, J., Beil, N., Wiedtke, E., Schmelas, C., Miltner, D., Rau, A., Erfle, H., Kräusslich, H.-G., Müller, M., Agbandje-McKenna, M., & Grimm, D. (2020). Pre-arrayed pan-AAV peptide display libraries for rapid single-round screening. *Molecular therapy*, 28(4), 1016-1032.

Bovier, P. A. (2008). Epaxal®: A virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection. *Expert review of vaccines*, 7(8), 1141-1150.

Büning, H., & Srivastava, A. (2019). Capsid modifications for targeting and improving the efficacy of AAV vectors. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 12, 248-265.

Calcedo, R., & Wilson, J. M. (2013). Humoral immune response to AAV. *Frontiers in immunology*, 4, 341.

Charlton Hume, H. K., Vidigal, J., Carrondo, M. J., Middelberg, A. P., Roldão, A., & Lua, L. H. (2019). Synthetic biology for bioengineering virus-like particle vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(4), 919-935.

Chiorini, J. A., Wiener, S. M., Yang, L., Smith, R. H., Safer, B., Kilcoin, N. P., Liu, Y., Urcelay, E., & Kotin, R. M. (1996). The roles of AAV Rep proteins in gene expression and targeted integration. *Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in Gene Therapy*, 25-33.

Cuevas-Juárez, E., Liñan-Torres, A., Hernández, C., Kopylov, M., Potter, C. S., Carragher, B., Ramírez, O. T. & Palomares, L. A. (2023). Mimotope discovery as a tool to design a vaccine against Zika and dengue viruses. *Biotechnology and Bioengineering*.

Dattoo, M. S., Natama, M. H., Somé, A., Traoré, O., Rouamba, T., Bellamy, D., Yameogo, P., Valia, D., Tegneri, M., Ouedraogo, F., Soma, R., Sawadogo, S., Sorgho, F., Derra, K., Rouamba, E., Orindi, B., Ramos Lopez, F., Flaxman, A., Cappuccini, F., Kailath, R., Elias, S.,

- Mukhopadhyay, E., Noe, A., Cairns, M., Lawrie, A., Roberts, R., Valéa, I., Sorgho, H., Williams, N., Glenn, G., Fries, L., Reimer, J., Ewer, K., J., Shaligram, U., Hill, A. V. S., & Tinto, H. (2021). Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 397(10287), 1809-1818.
- Daya, S., & Berns, K. I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical microbiology reviews*, 21(4), 583-593.
- Dubielzig, R., King, J. A., Weger, S., Kern, A., & Kleinschmidt, J. A. (1999). Adeno-associated virus type 2 protein interactions: formation of pre-encapsulation complexes. *Journal of virology*, 73(11), 8989-8998.
- Elmore, Z. C., Patrick Havlik, L., Oh, D. K., Anderson, L., Daaboul, G., Devlin, G. W., Vincent, H. A., & Asokan, A. (2021). The membrane associated accessory protein is an adeno-associated viral egress factor. *Nature communications*, 12(1), 6239.
- Emanuel, J., Callison, J., Dowd, K. A., Pierson, T. C., Feldmann, H., & Marzi, A. (2018). A VSV-based Zika virus vaccine protects mice from lethal challenge. *Scientific reports*, 8(1), 11043.
- Flores, F. M., Orozco, F. A. J., & Castrejón, H. V. (2006). Biología molecular de los vectores adenovirales. *Cirugía y Cirujanos*, 74(6), 483-493.
- Fominaya, J. M. (2007). Vectores de transferencia en terapia génica. Curso de Biotecnología Aplicada. Ed. Grupo SANED.
- Issa, S. S., Shaimardanova, A. A., Solovyeva, V. V., & Rizvanov, A. A. (2023). Various AAV Serotypes and Their Applications in Gene Therapy: An Overview. *Cells*, 12(5), 785.
- Jungmann, A., Müller, O., & Rapti, K. (2017). Cell-based measurement of neutralizing Antibodies against adeno-associated virus (AAV). *Cardiac Gene Therapy: Methods and Protocols*, 109-126.
- Klimek, K., & Ginalska, G. (2020). Proteins and peptides as important modifiers of the polymer scaffolds for tissue engineering applications—a review. *Polymers*, 12(4), 844.
- Lam, A. K., Frabutt, D., Li, L., & Xiao, W. (2021). Chemical modifications of the capsid or redirecting and improving the efficacy of adeno-associated virus vectors. *Human Gene Therapy*, 32(23-24), 1433-1438.
- Liñan-Torres, A. (2021). Desarrollo de un candidato a vacuna dual contra los virus dengue y Zika mediante la presentación de un mimótopo en la cápside de virus adeno-asociado del serotipo 8. Instituto de Biotecnología, Maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Lizarazo-Salcedo, C. G., González-Jiménez, E. E., Arias-Portela, C. Y., & Guarguati-Ariza, J. (2018). Nanomateriales: un acercamiento a lo básico. *Medicina y Seguridad del Trabajo*, 64(251), 109-118.
- Malik, S., Kishore, S., Nag, S., Dhasmana, A., Preetam, S., Mitra, O., León-Figueroa, D. A., Mohanty, A., Chattu, V. K., Assefi, M., Padhi, B. K., & Sah, R. (2023). Ebola Virus Disease Vaccines: Development, Current Perspectives & Challenges. *Vaccines*, 11(2), 268.
- Martínez-Flores, D. (2020). Desarrollo de nanopartículas genéticamente codificadas con actividad biológica selectiva. Instituto de Fisiología Celular, Maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Maurer, A. C., & Weitzman, M. D. (2020). Adeno-associated virus genome interactions important for vector production and transduction. *Human Gene Therapy*, 31(9-10), 499-511.
- Maurer, A. C., Pacouret, S., Diaz, A. K. C., Blake, J., Andres-Mateos, E., & Vandenberghe, L. H. (2018). The assembly-activating protein promotes stability and interactions between AAV's viral proteins to nucleate capsid assembly. *Cell reports*, 23(6), 1817-1830.
- McNeale, D., Esquirol, L., Okada, S., Strampel, S., Dashti, N., Rehm, B., Douglas, T., Vickers, C., & Sainsbury, F. (2023). Tunable In Vivo Colocalization of Enzymes within P22 Capsid-Based Nanoreactors. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(14), 17705-

17715.

Meier, A. F., Fraefel, C., & Seyffert, M. (2020). The interplay between adeno-associated virus and its helper viruses. *Viruses*, 12(6), 662.

Mena-Enriquez, M., Flores-Contreras, L., & Armendáriz-Borunda, J. (2012). Vectores virales adeno-asociados: métodos de producción, purificación y aplicaciones en terapia génica. *Revista de investigación clínica*, 64(5), 487-94.

Mingozzi, F., & Büning, H. (2015). Adeno-associated viral vectors at the frontier between tolerance and immunity. *Frontiers in immunology*, 6, 120.

Mingozzi, F., & High, K. A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nature reviews genetics*, 12(5), 341-355.

Mitra, A., Ahmed, M. A., Krishna, R., Sun, K., Gibbons, F. D., Campagne, O., Rayad, N., Roman, Y. M., Albusaysi, S., Burian, M., & Younis, I. R. (2023). Model-Informed Approaches and Innovative Clinical Trial Design for Adeno-Associated Viral Vector-Based Gene Therapy Product Development: A White Paper. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 114(3), 515-529.

Muik, A., Reul, J., Friedel, T., Muth, A., Hartmann, K. P., Schneider, I. C., Münch, R. C., & Buchholz, C. J. (2017). Covalent coupling of high-affinity ligands to the surface of viral vector particles by protein trans-splicing mediates cell type-specific gene transfer. *Biomaterials*, 144, 84-94.

Naddaf, M. (2023). Second malaria vaccine to win global approval is cheaper and easier to make. *Nature*.

Nonnenmacher, M., & Weber, T. (2012). Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene therapy*, 19(6), 649-658.

Plascencia-Villa, G., Saniger, J. M., Ascencio, J. A., Palomares, L. A., & Ramírez, O. T. (2009). Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals. *Biotechnology and*

*bioengineering*, 104(5), 871-881.

Pupo, A., Fernández, A., Low, S. H., François, A., Suárez-Amarán, L., & Samulski, R. J. (2022). AAV vectors: The Rubik's cube of human gene therapy. *Molecular Therapy*.

Reguera, D., de Pablo, P. J., Abrescia, N. G., Mateu, M. G., Hernández-Rojas, J., Castón, J. R., & San Martín, C. (2023). *Physical Virology in Spain*. *Biophysica*, 3(4), 598-619.

Rojas-Gómez, R. (2009). Estudio de la capacidad de unión y transporte de cápsides de virus adenoasociado tipo 2 en células de mamífero. Instituto de Biotecnología, Maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

Rozalén, J., Callejo, V. C., & Jordán, J. (2003). *Terapia génica. Vectores de expresión*. *Offarm: farmacia y sociedad*, 22(8), 102-108.

Rybniker, J., Nowag, A., Janicki, H., Demant, K., Hartmann, P., & Büning, H. (2012). Incorporation of antigens into viral capsids augments immunogenicity of adeno-associated virus vector-based vaccines. *Journal of virology*, 86(24), 13800-13804.

Sierra-Delgado, J. A., Bautista-Nino, P. K., Vargas-Castellanos, C. I., Serrano Diaz, N. C., & Rincon, M. Y. (2019). Respuesta inmune y terapia génica con vectores virales adenoasociados. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 79(6), 493-501.

Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB), 2023. (<https://smbb.mx/premios/premio-sergio-sanchez-esquivel/>)

Tejeda-Rodríguez, J. A., Nunez, A., Soto, F., García-Gradilla, V., Cadena-Nava, R., Wang, J., & Vazquez-Duhalt, R. (2019). Virus-Based Nanomotors for Cargo Delivery. *ChemNanoMat*, 5(2), 194-200.

Thomas, S. J. (2023). Is new dengue vaccine efficacy data a relief or cause for concern?. *npj Vaccines*, 8(1), 55.

Travieso, T., Li, J., Mahesh, S., Mello, J. D. F. R. E., & Blasi, M. (2022). The use of viral vectors in vaccine development. *npj Vaccines*, 7(1), 75.

# Artículos

Villanueva-Flores, F., Castro-Lugo, A., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2020). Understanding cellular interactions with nanomaterials: Towards a rational design of medical nanodevices. *Nanotechnology*, 31(13), 132002.

Wen, A. M., & Steinmetz, N. F. (2016). Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy. *Chemical Society Reviews*, 45(15), 4074-4126.

Xiao, X., Li, J., & Samulski, R. J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *Journal of virology*, 72(3), 2224-2232.

Zhang, C., Yao, T., Zheng, Y., Li, Z., Zhang, Q., Zhang, L., & Zhou, D. (2016). Development of next generation adeno-associated viral vectors capable of selective tropism and efficient gene delivery. *Biomaterials*, 80, 134-145.

Zhao, Z., Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2022). Viral vector-based gene therapies in the clinic. *Bioengineering & translational medicine*, 7(1), e10258.