

“Terapia Genica

Oswaldo L. Podhajcer, Ph.D.

Director, Laboratorio de Terapia Molecular y Celular

Instituto Leloir

CONICET

Somatic Gene Therapy

"Transfer of new genetic material to the cells of an individual with resulting therapeutic benefit to the individual"

R.A.Morgan and W.F. Anderson, 1993

Gene Therapy

To alter patient's DNA to fight or prevent a disease instead of controlling the symptoms

To supply cells with normal copies of missing or mutated genes

The aim is to treat inherited and complex diseases

Proteins in common use in autoimmune diseases – such as insulins, Interferons and TNF receptors and antibodies are:

A) expensive to produce

B) many have short half-lives (particularly the cytokines)

C) need to be systemically administered through frequent inefficient routes

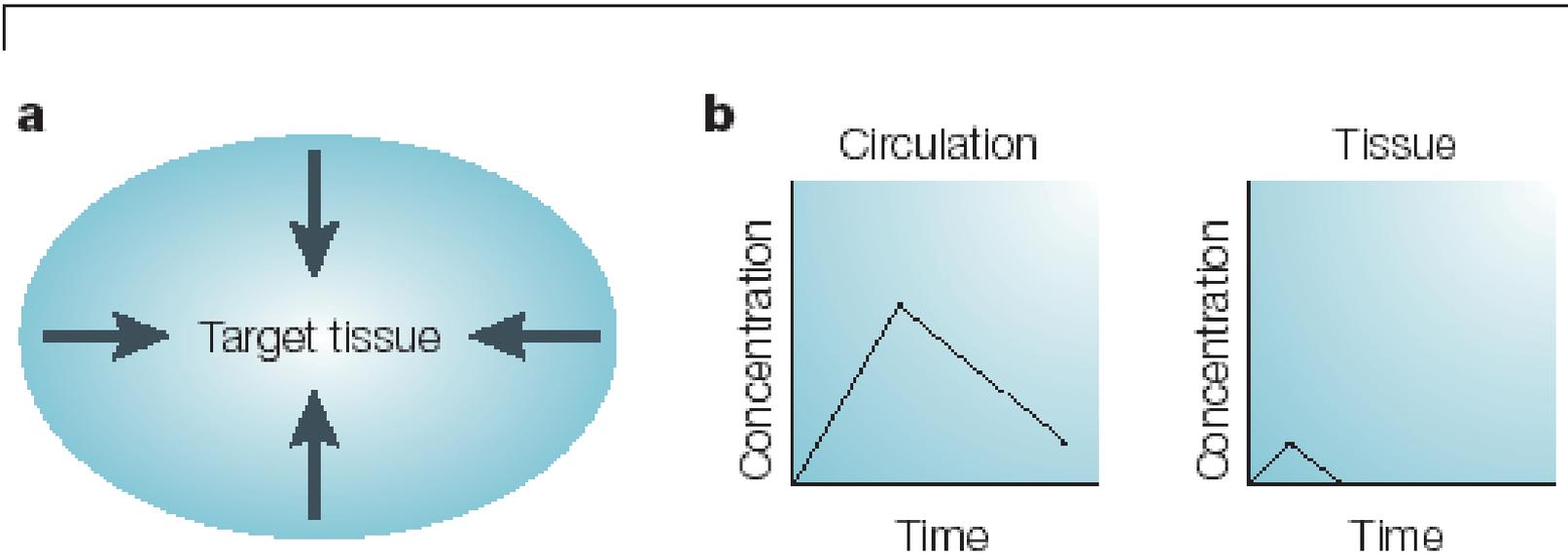
D) systemic administration might produce unacceptable side effects such as widespread immunosuppression

 **Gene Therapy can overcome many of these limitations**

**Pharmacological differences
between protein and gene
therapies.**

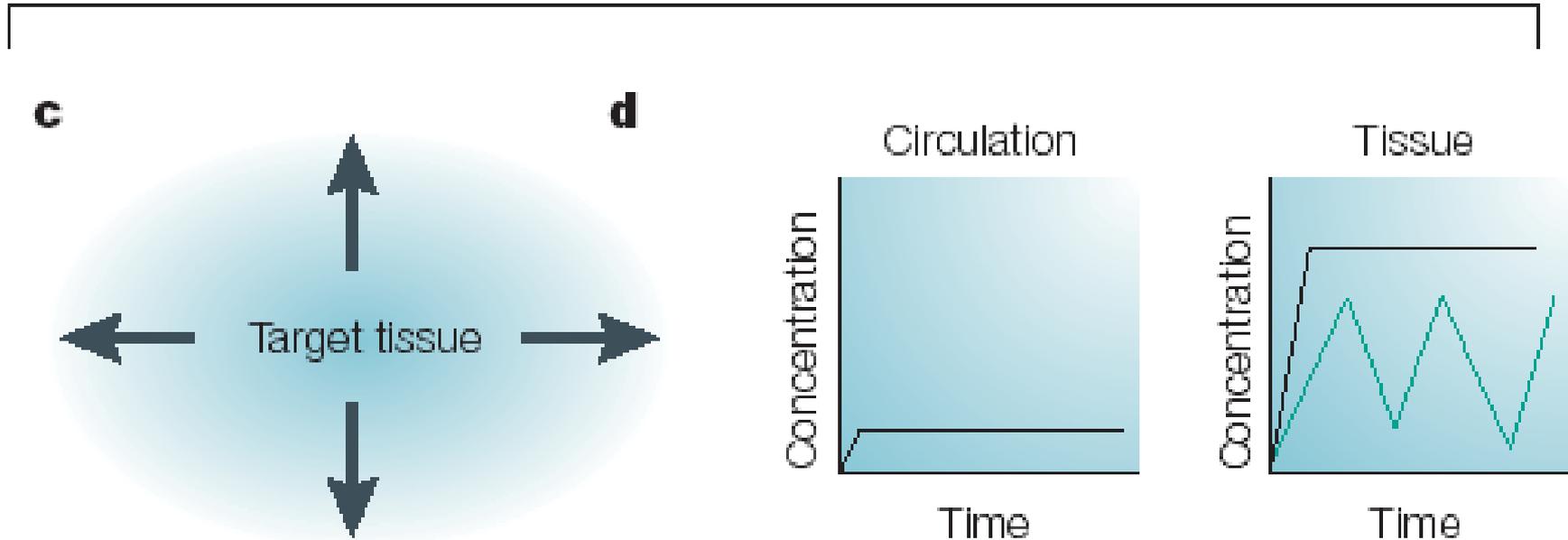
Pharmacological differences between protein and gene therapy

Protein therapy

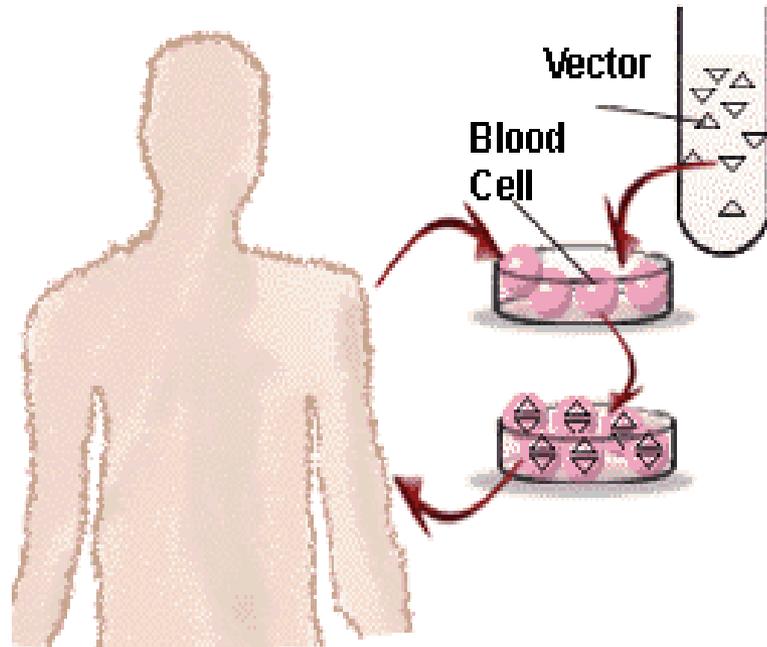


Pharmacological differences between protein and gene therapy

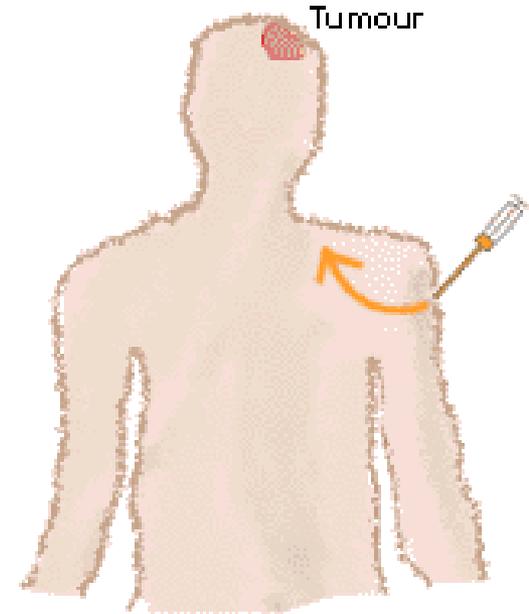
Gene therapy



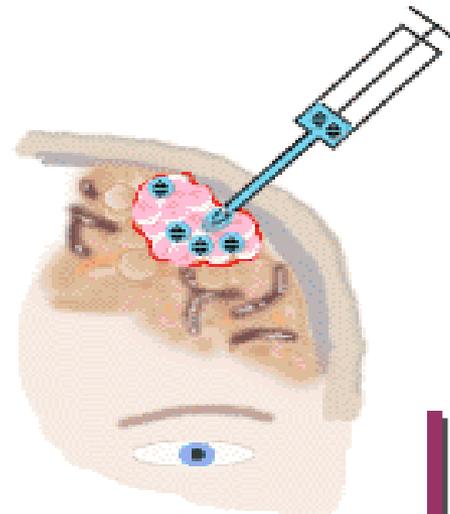
Strategies for gene transfer



Ex vivo

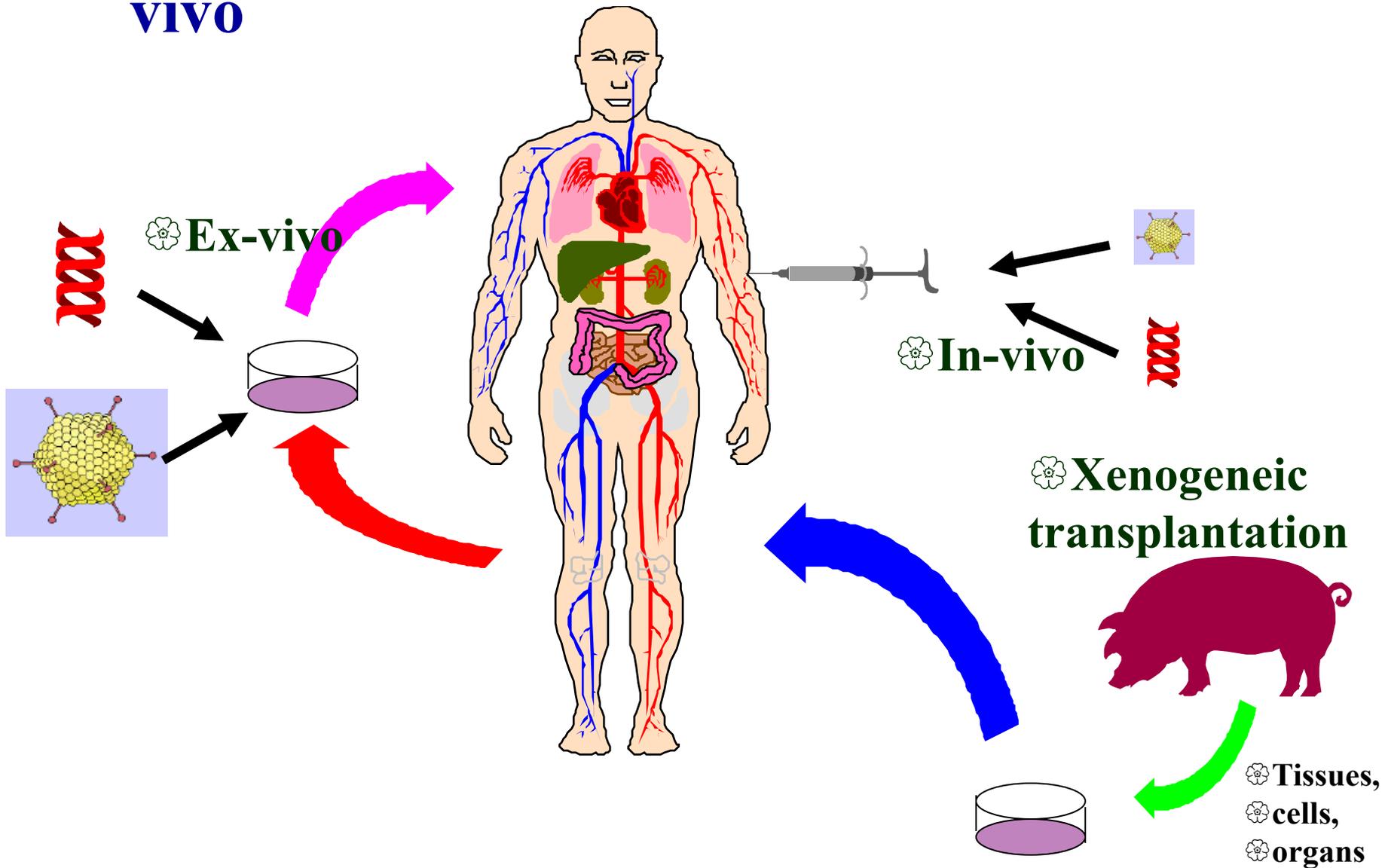


In vivo



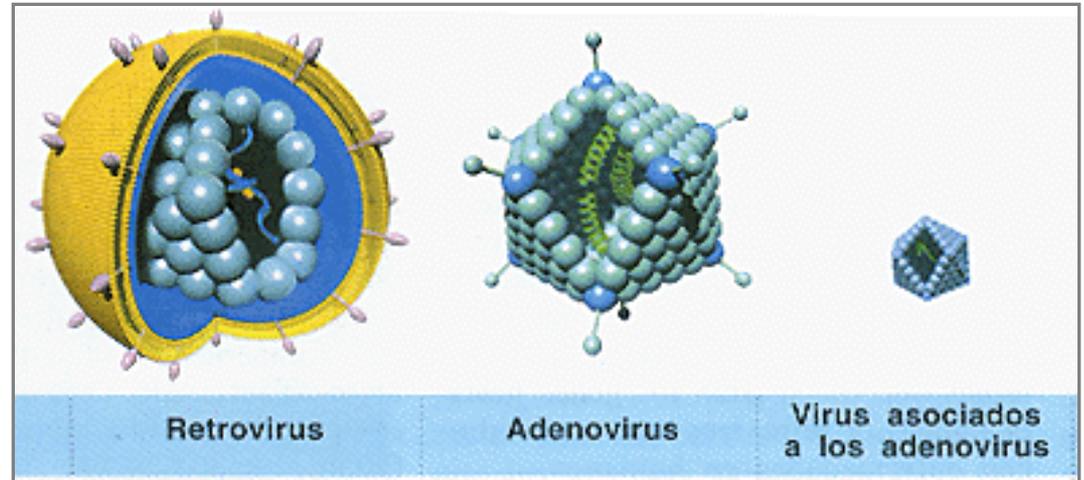
In situ

🌸 Somatic gene therapy: ex vivo vs in vivo



Vectores utilizados

Vectores virales



Vectores no virales



Vectores recombinantes

① Virales

- ❖ Adenovirus
- ❖ Retrovirus
- ❖ Virus Adenoasociado (AAV)
- ❖ Herpesvirus simplex (HSV)
- ❖ Lentivirus
- ❖ Alphavirus
- ❖ Virus híbridos o modificados

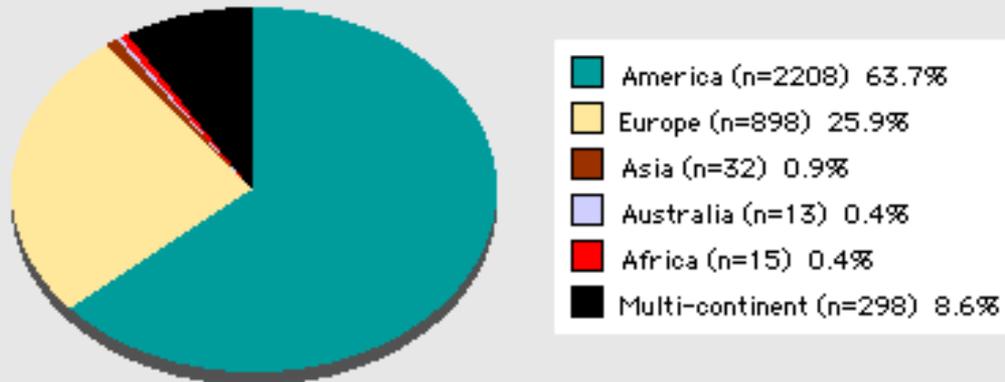
② No virales

- ❖ ADN (plásmidos)
- ❖ Liposomas
- ❖ Proteínas

③ Mixtos

- ❖ Virus + liposomas
- ❖ Virus + copolímeros

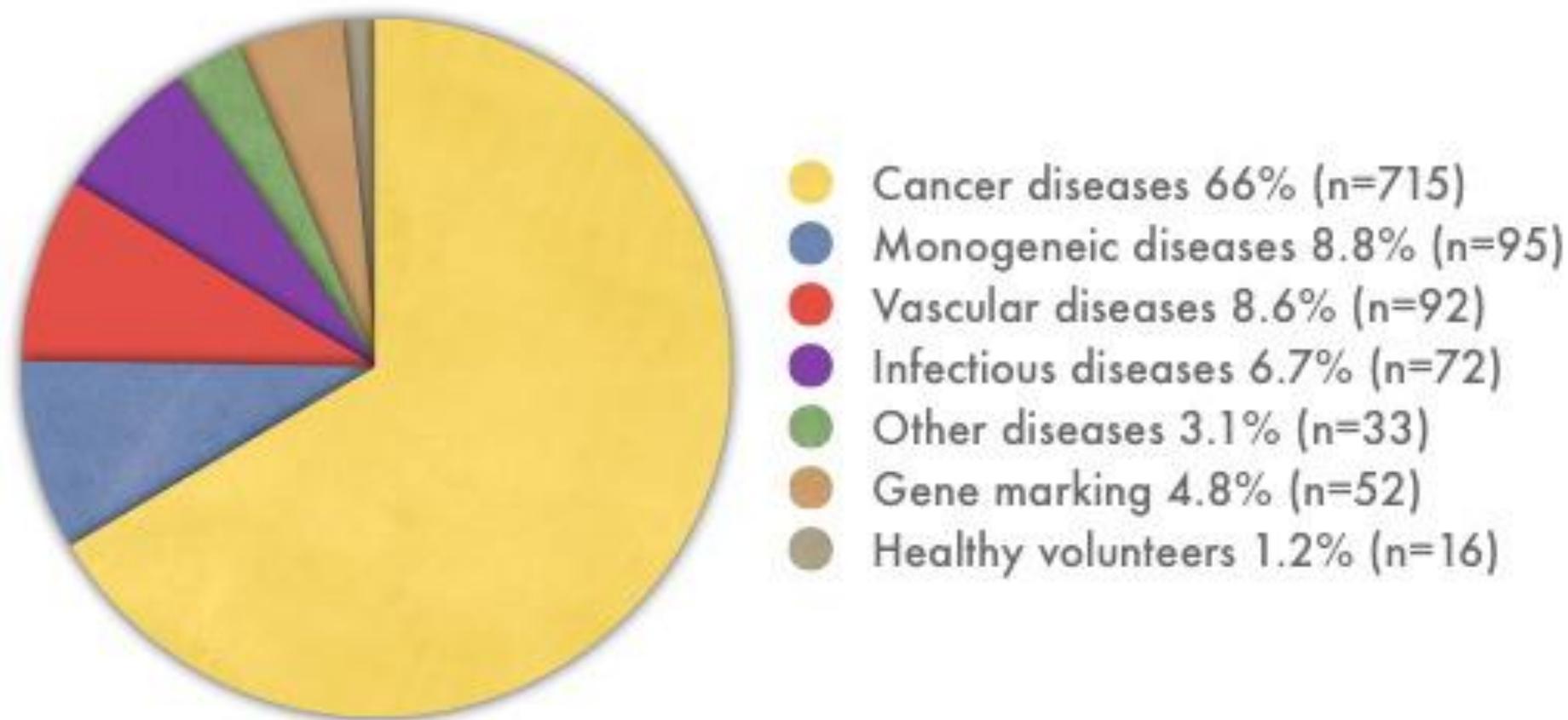
Pacientes por continente



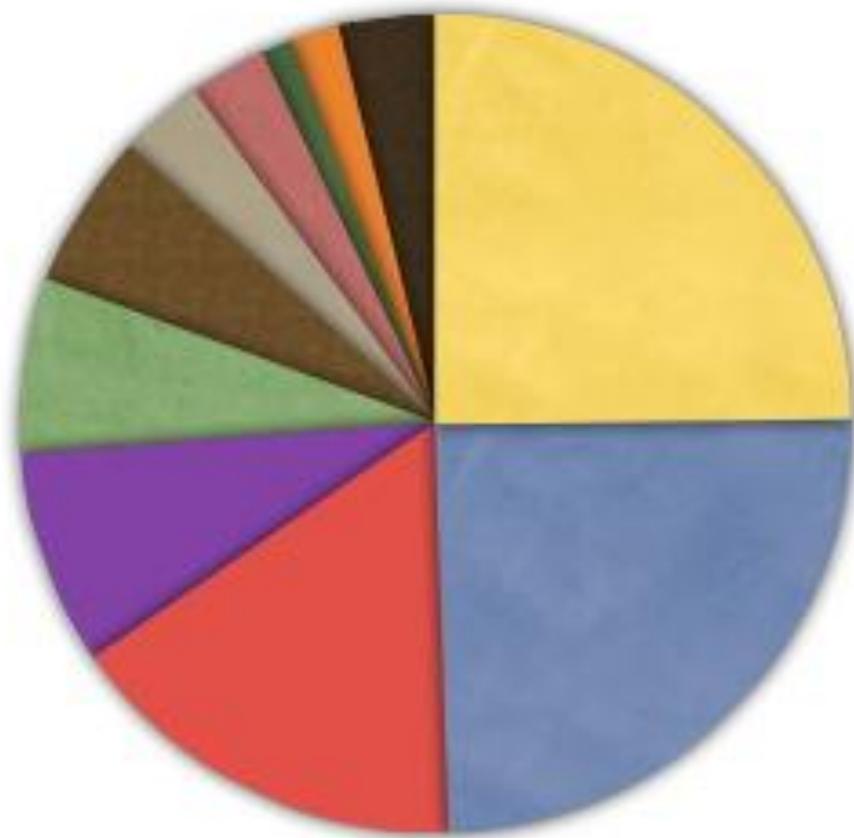
Continent	Protocols		Patients	
	Number	%	Number	%
America	480	80	2208	63.2
Europe	103	17.2	928	26.6
Asia	9	1.5	32	0.9
Australia	3	0.5	13	0.4
Africa	1	0.2	15	0.4
Multi-continent	4	0.7	298	8.5
Total	600	100	3494	100

Trial continents

Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials

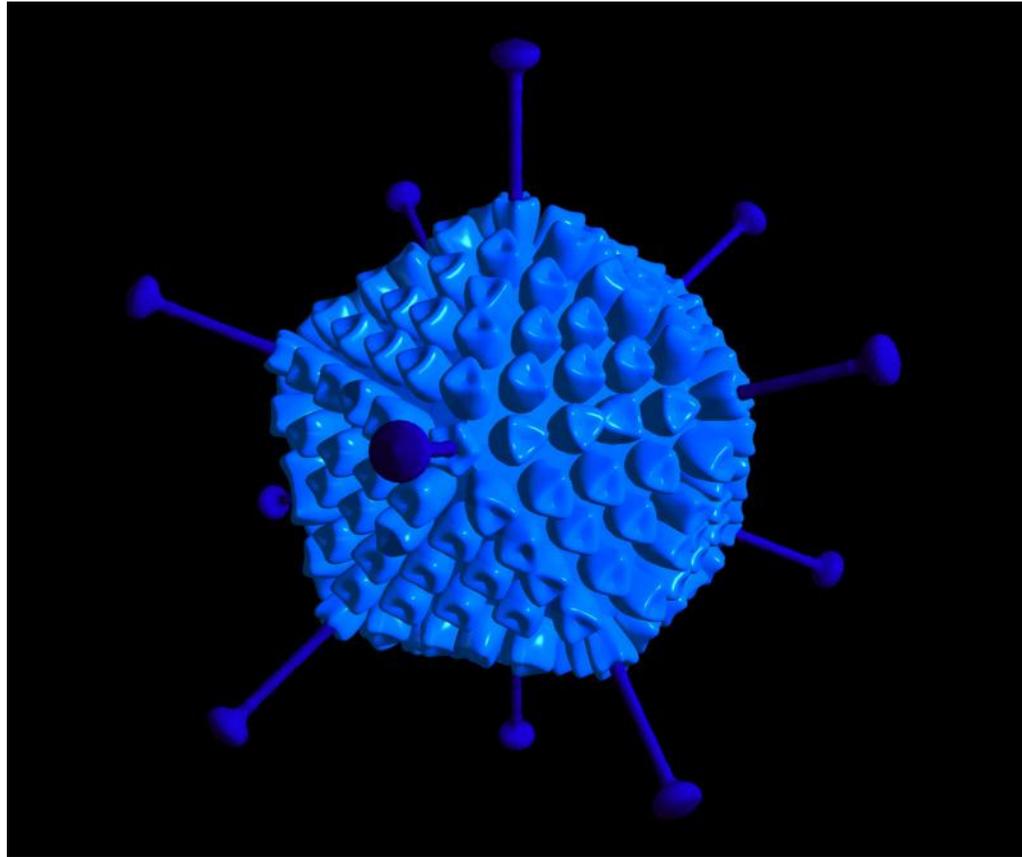


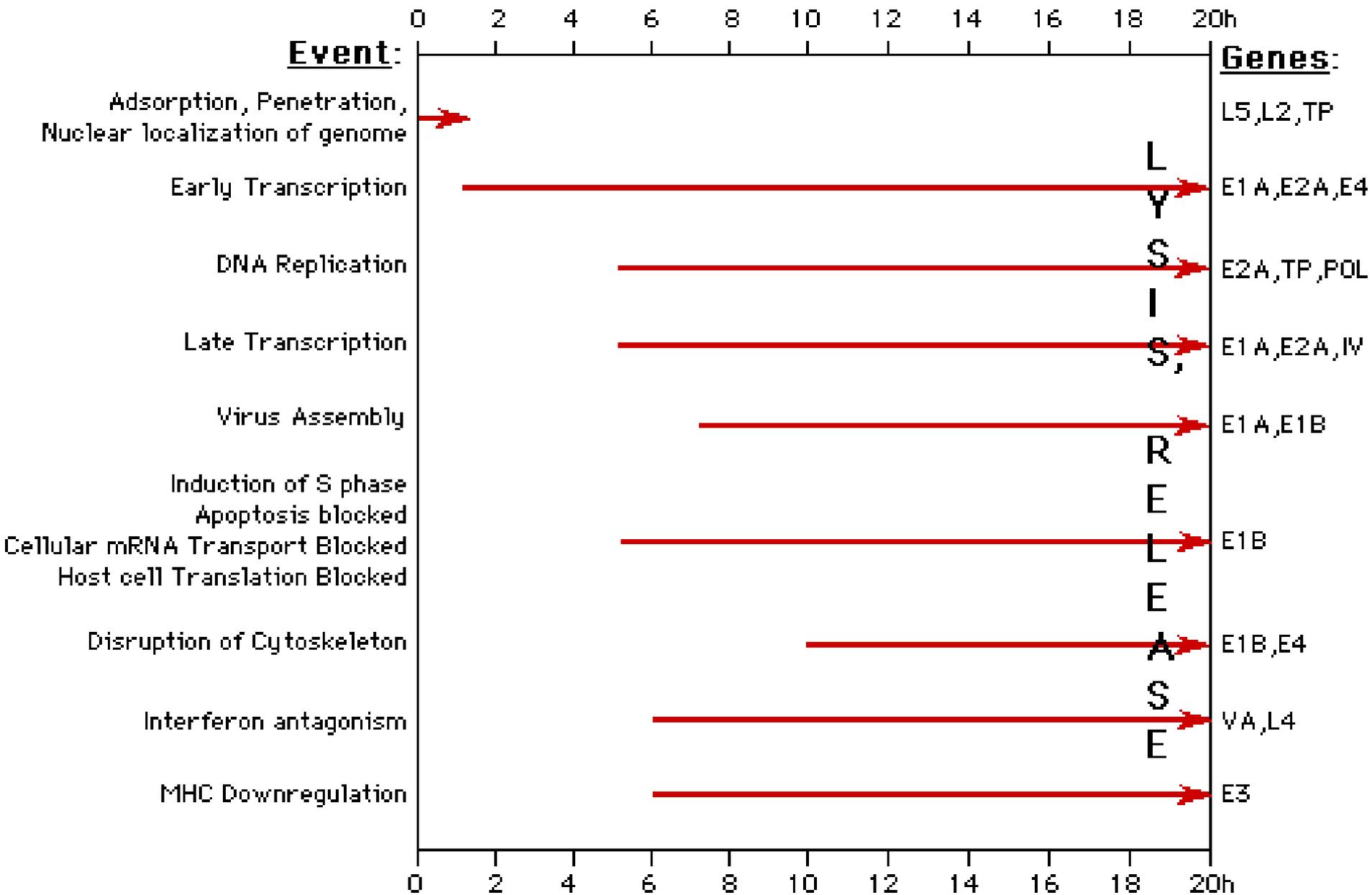
Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials



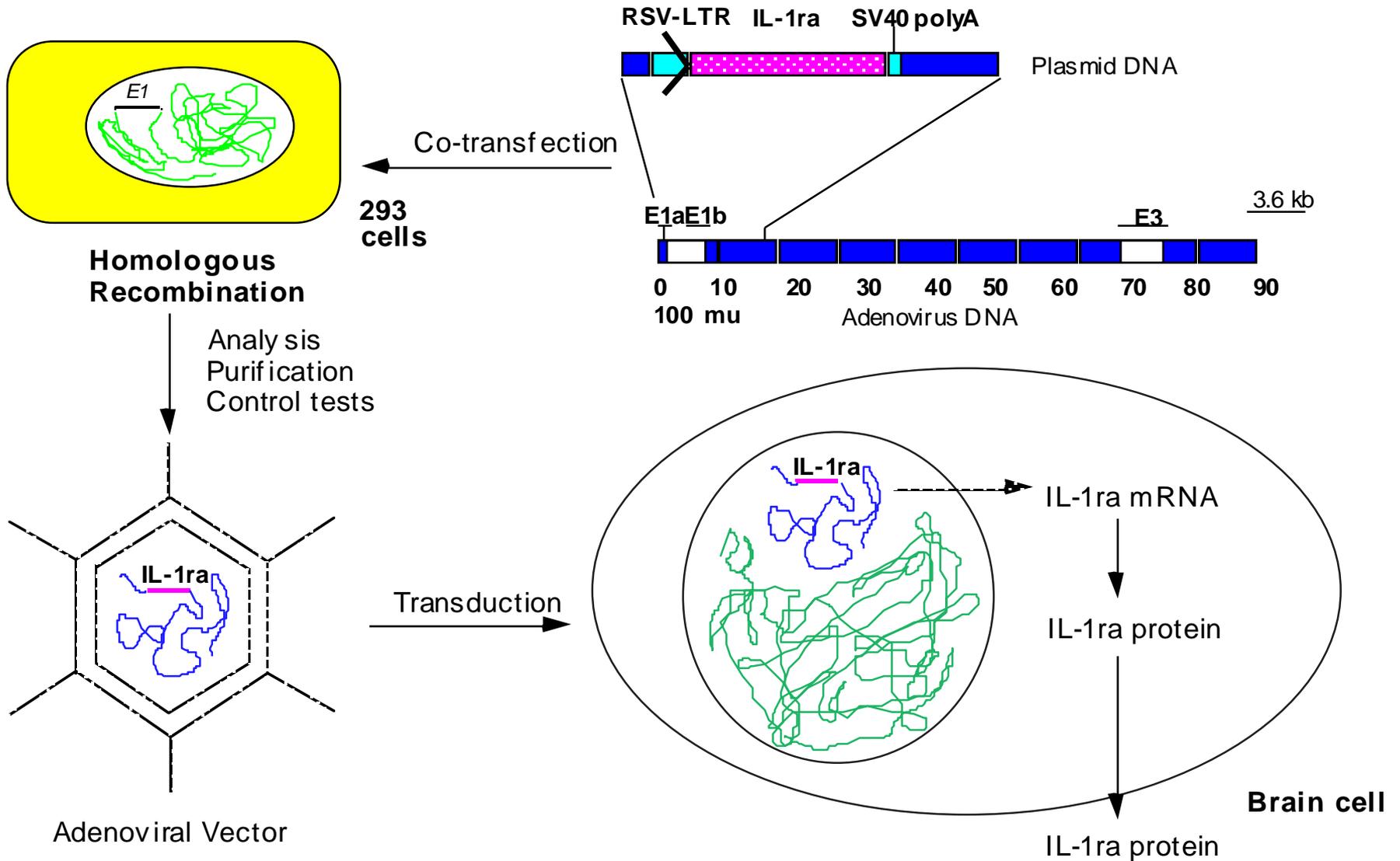
- Retrovirus 25% (n=272)
- Adenovirus 25% (n=271)
- Naked/Plasmid DNA 16% (n=174)
- Lipofection 8.6% (n=93)
- Pox virus 7.1% (n=76)
- Vaccinia virus 6.3% (n=67)
- Herpes simplex virus 3.3% (n=36)
- Adeno-associated virus 3.1% (n=33)
- RNA transfer 1.2% (n=13)
- Others 2.1% (n=21)
- N/C 3.9% (n=42)

Adenovirus

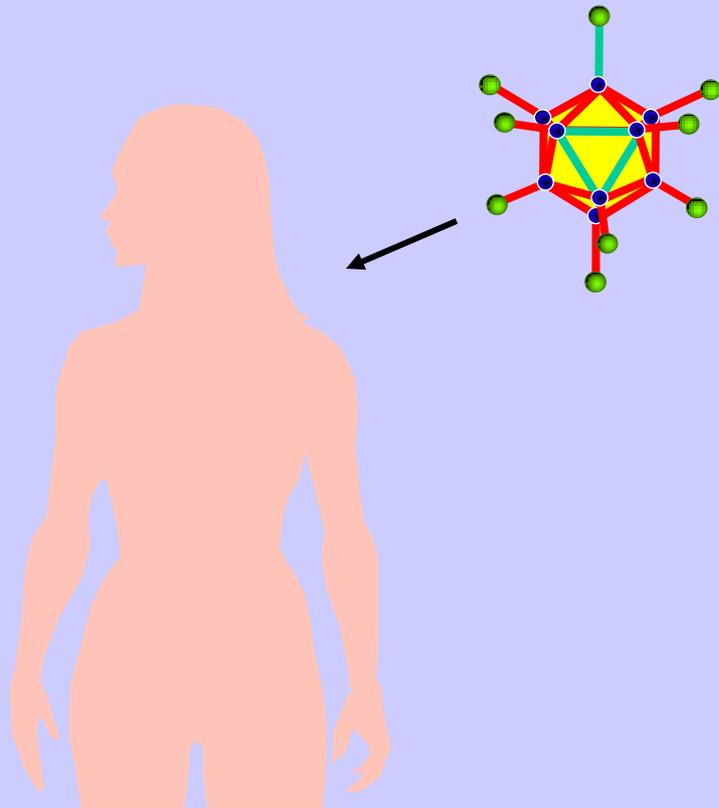




Replication-deficient adenoviral vectors for gene transfer in vivo



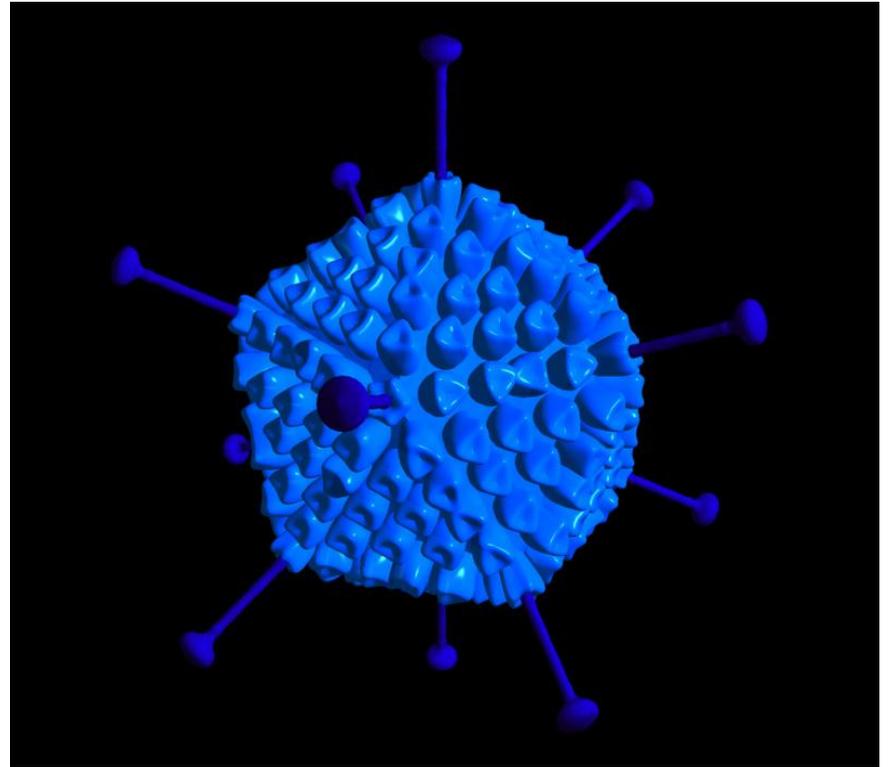
Terapia Genica en Cancer



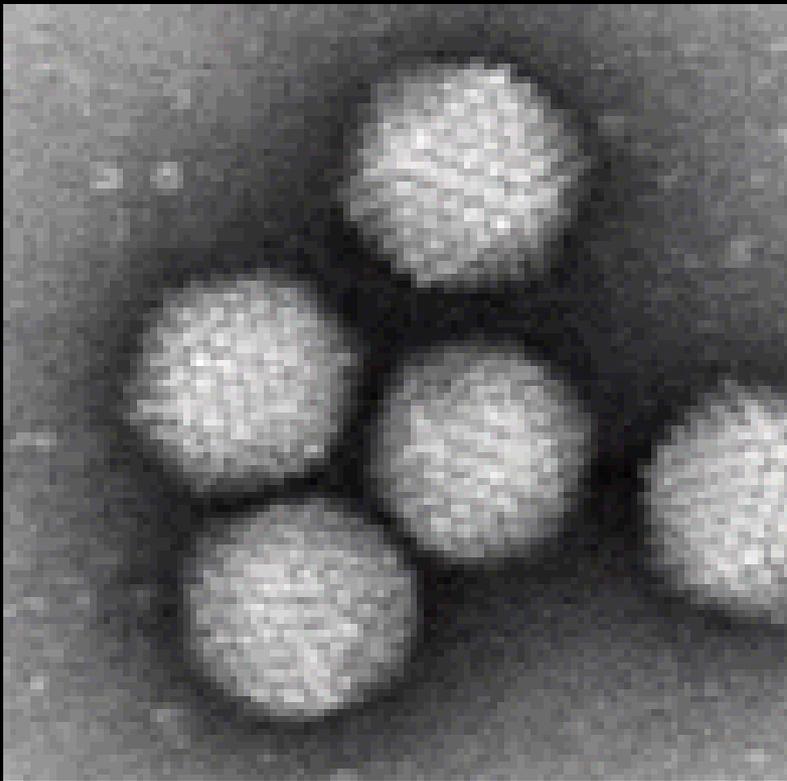
- Los ensayos clinicos con virus han demostrado un alto nivel de bioseguridad en pacientes
- Su eficacia es limitada esencialmente debido a la **poca eficacia terapeutica** de los vectores no replicativos usados inicialmente

Parametros a considerar en la mejora de un virus terapeutico

- Gene delivery
- Actividad del gen
- Bioseguridad

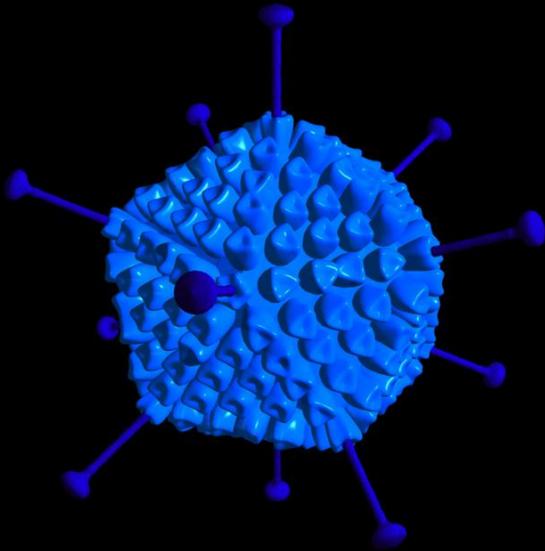


Ventajas del uso de adenovirus



- Estabilidad sistémica
- Métodos para su eficiente producción
- Infeccionan células que no están en división también
- Infeccionan diversos tipos celulares
- Altos niveles de expresión del transgén terapéutico
- Poseen espacio para incorporar genes de gran tamaño
- Su ciclo de replicación se conoce

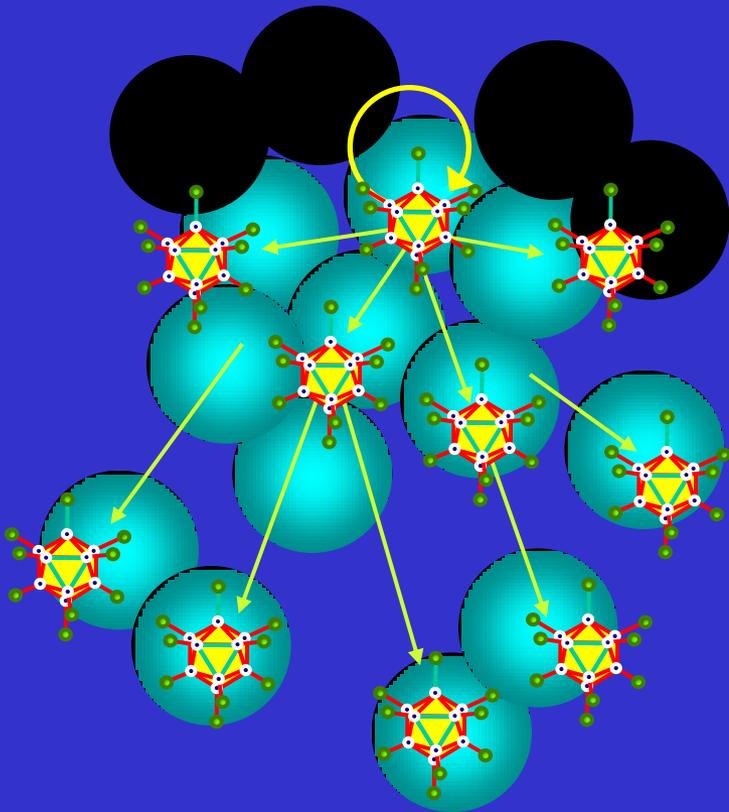
Adenovectores en terapia genica del cancer



Virus no replicativos: No generan más virus dentro de la célula y solo expresan un gen que genera un efecto antitumoral

Virus oncolíticos: se multiplican y eliminan primordialmente las células tumorales. Pueden llevar un gen terapeutico adicional

Adenovirus Oncolíticos de Replicación Condicional (CRAds) para la Terapia en Cancer



- *La replicación viral únicamente en el entorno tumoral es esencial para lograr un aumento de la eficacia*
- *La replicación viral permite sobreponerse a la eventual baja infección inicial*

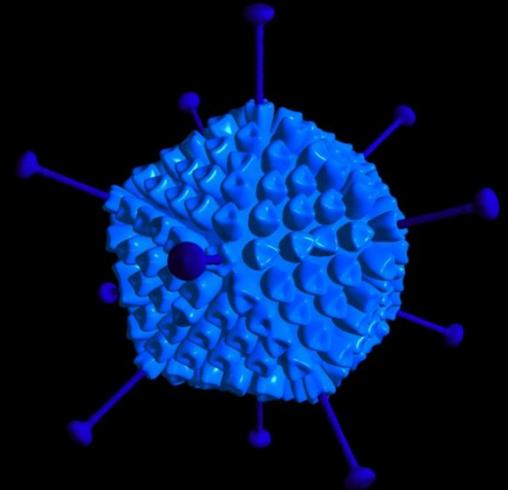
Porque adenovirus replicativo???

✓ En los 50s.....se aísla el adenovirus de las células adenoides (Rowe *et al.*, 1953).

✓ En los 50s..... primer clinical trial con Ad wt (Smith *et al.*, 1956), en donde se observa el efecto oncolítico de los adenovirus.



✓ Se abandona temporariamente

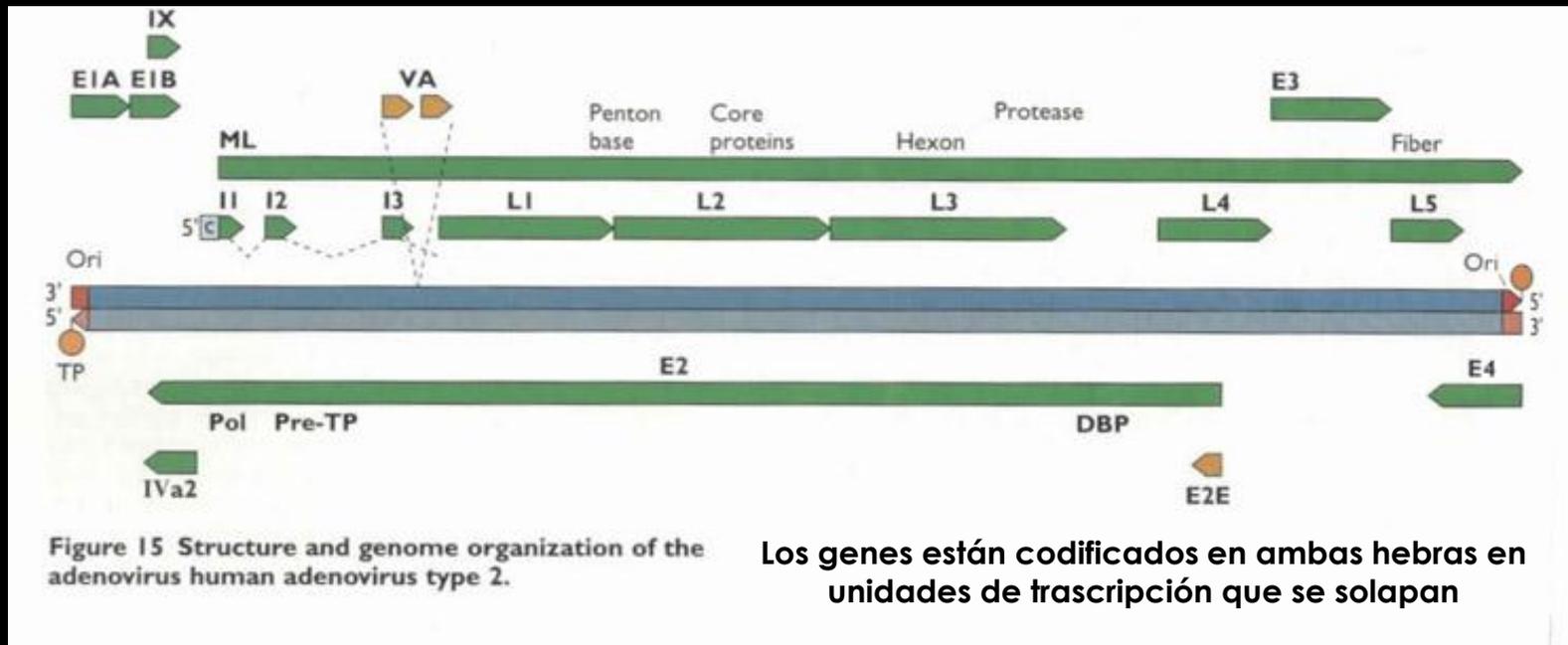


Organización del genoma viral y ciclo infectivo

El genoma viral es ADN lineal de doble cadena. 35-36 Kpb y esta contenido en una cápside proteica asociado a las proteínas V y VII.



Inverted Terminal Repeats



Los genes están codificados en ambas hebras en unidades de transcripción que se solapan

Clasificación de los adenovectores



✦ **Primera generación:** Se reemplaza el gen E1 por el **gen** a expresar.



Adenovirus no replicativo!!!!

Clasificación de los adenovectores



* **Primera generación:** Se reemplaza el gen E1 por el transgen a expresar.

* **Segunda generación:** Se reemplazan los genes E1, E2, E3 y E4.

* **Tercera generación:** Son los vectores que dependen de helpers

* **Vectores oncolíticos o CRAbs:** Se regula la replicación en la célula tumoral



Clasificación de los CRAds

CRAds

Tipo I: Presentan mutaciones o deleciones en sus genes tempranos

Tipo II: Utilizan promotores que se expresan en ambientes tumorales para dirigir la expresión de genes virales tempranos

Promotores tumor-específicos (TSP)



Ad-wt, promotor nativo de E1A



CRAd, promotor tumor-específico conduciendo a E1A

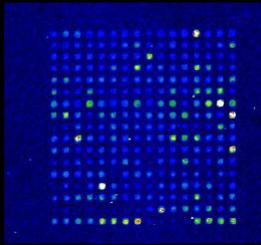
Criterios para seleccionar un TSP:

- ✓ Potencia
- ✓ Especificidad tisular
- ✓ Longitud
- ✓ Inactivo in hígado/activo en tumor

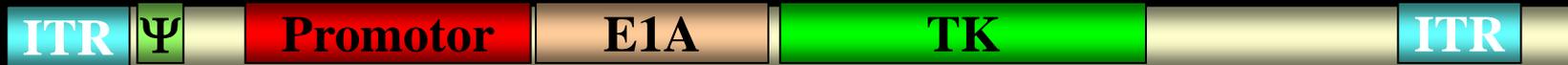
Clases de TSP:

- ✓ Asociados a tumor
- ✓ Tejido específicos
- ✓ Inducibles

Como seleccionamos un promotor especifico??

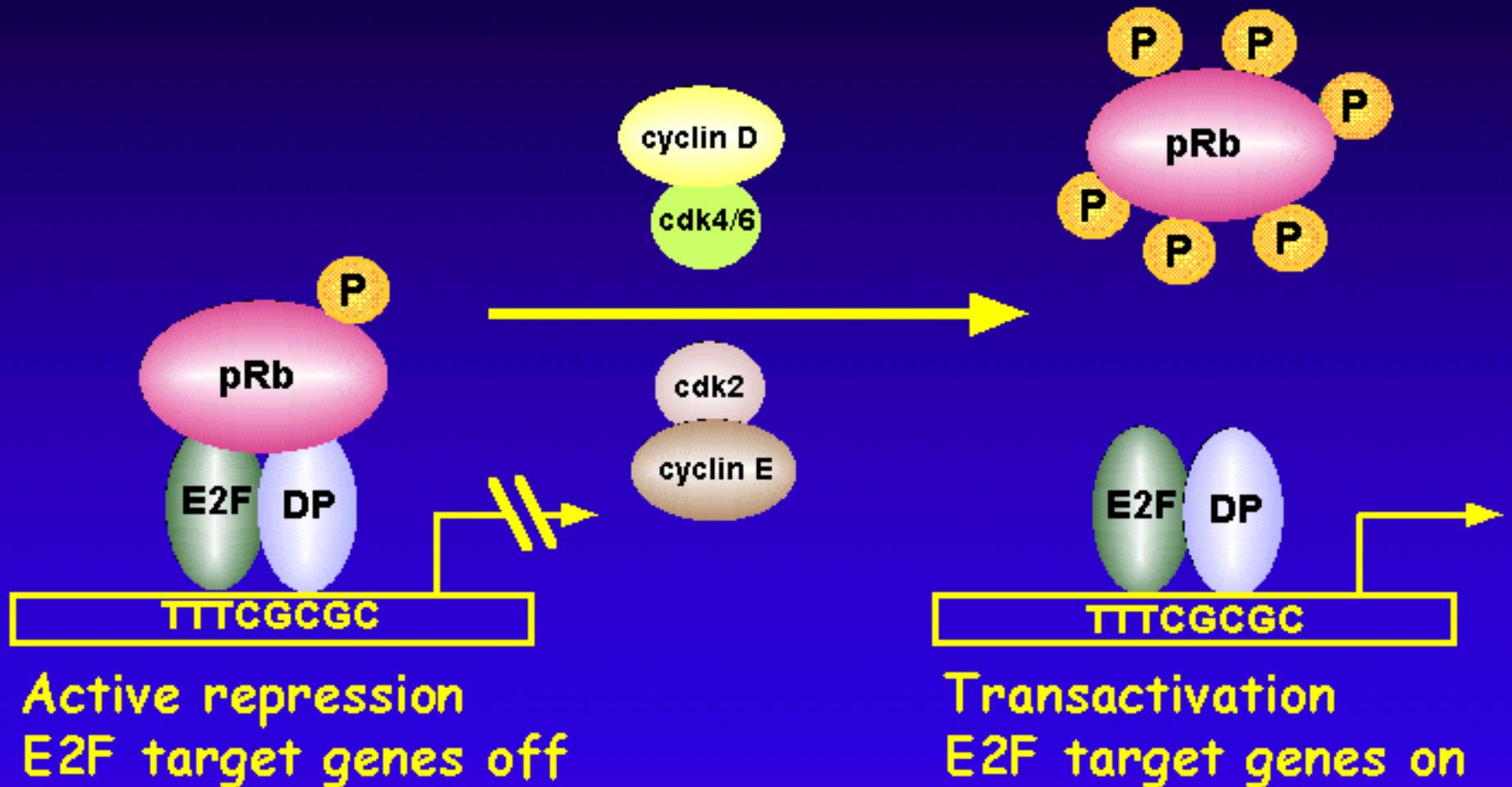


→ Sobre-expresión de un gen

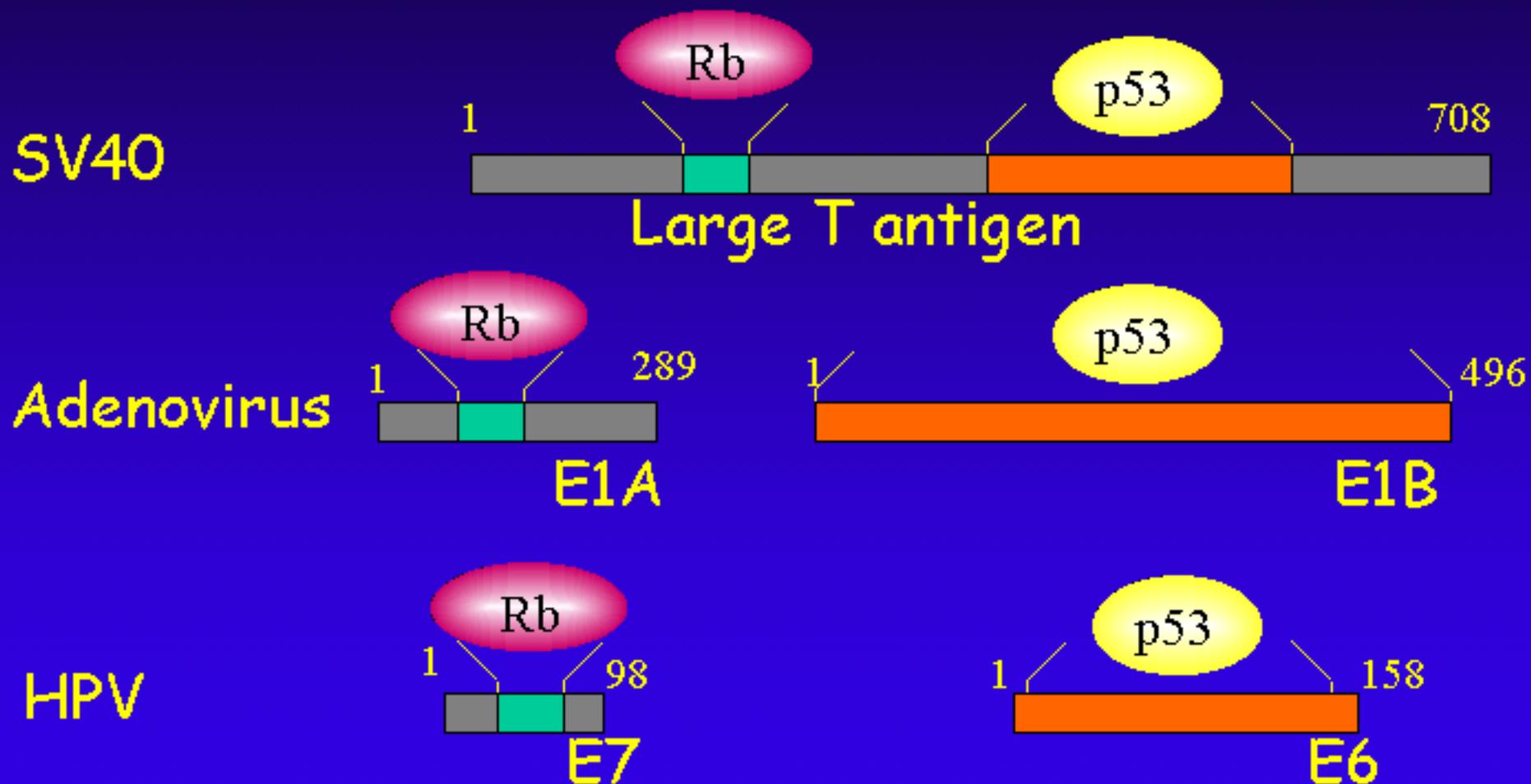


***Como mejorar la selectividad
de los CRAds. I***

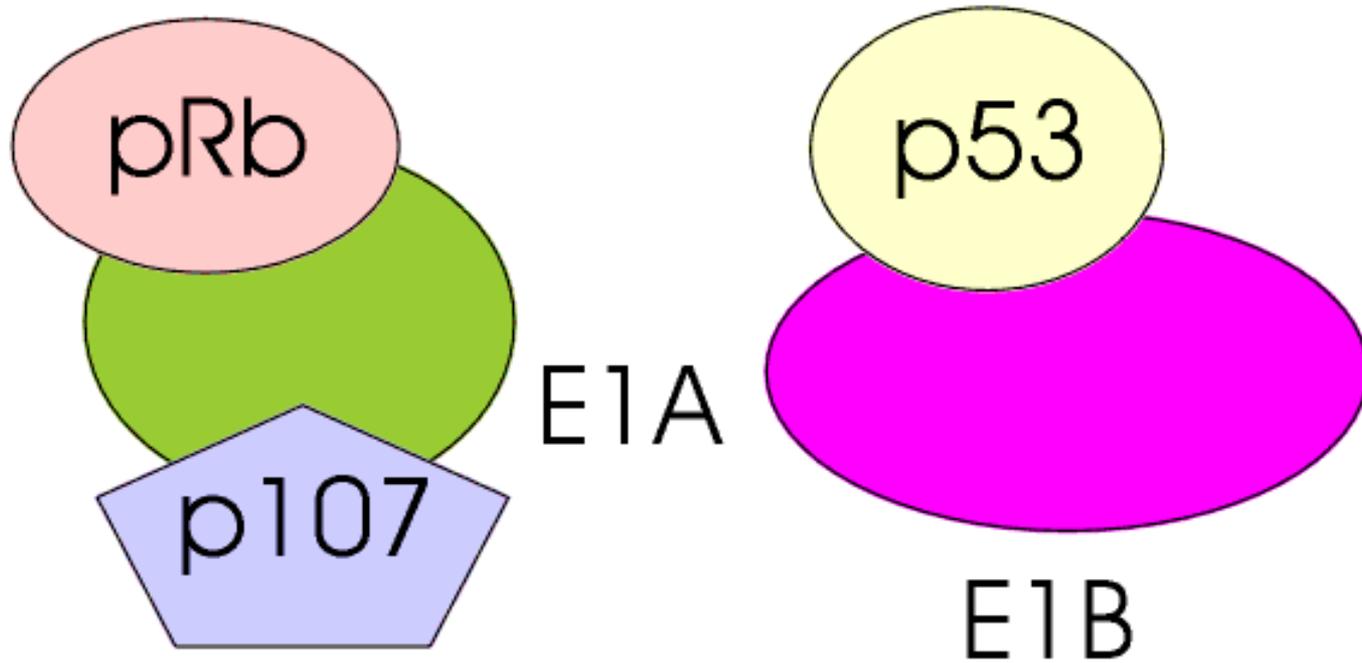
Regulation of E2F activity through pRb phosphorylation



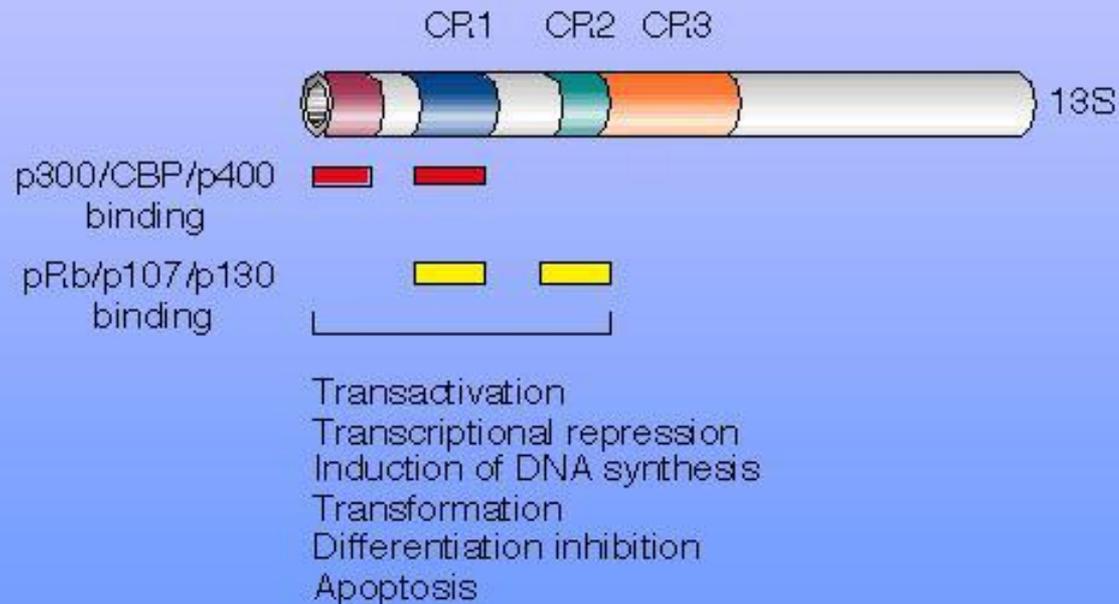
DNA tumor viruses bind multiple cellular proteins



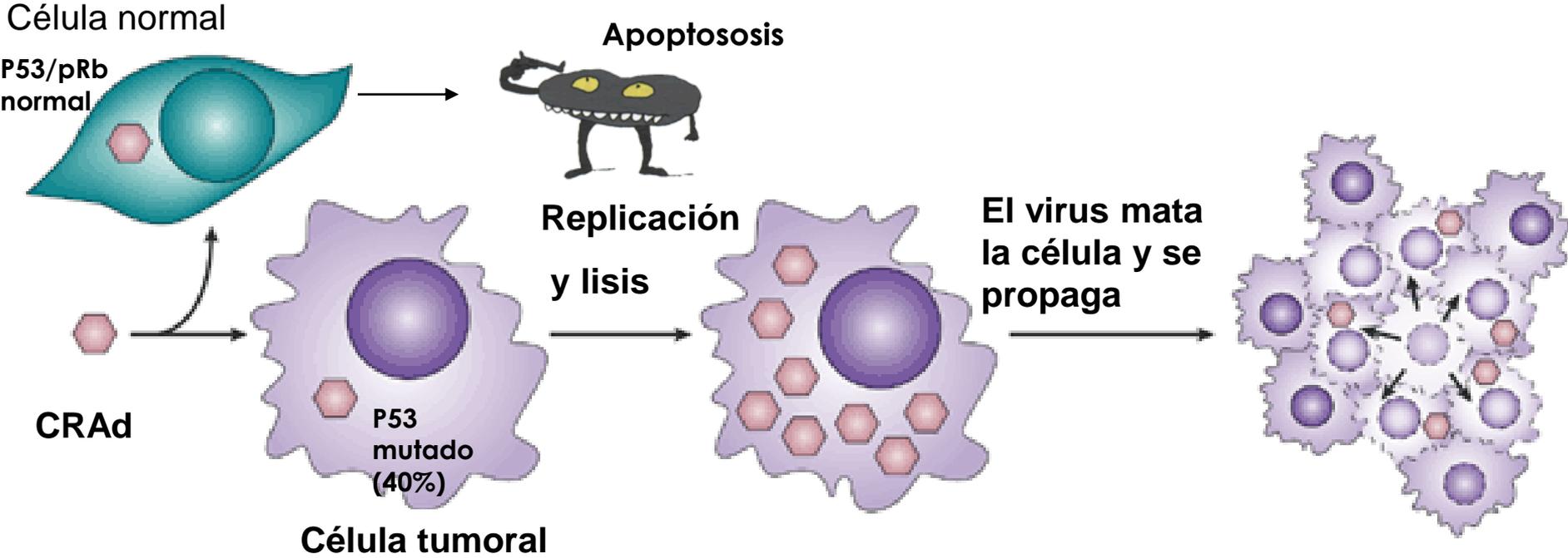
Interacción de E1 con Rb y p53



Adenovirus E1A protein

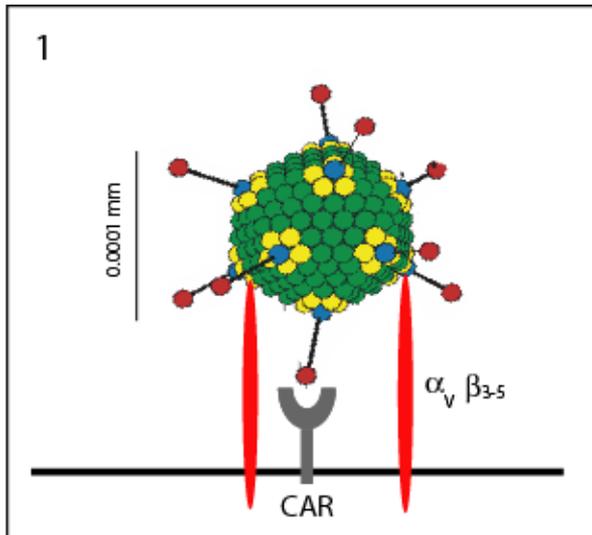
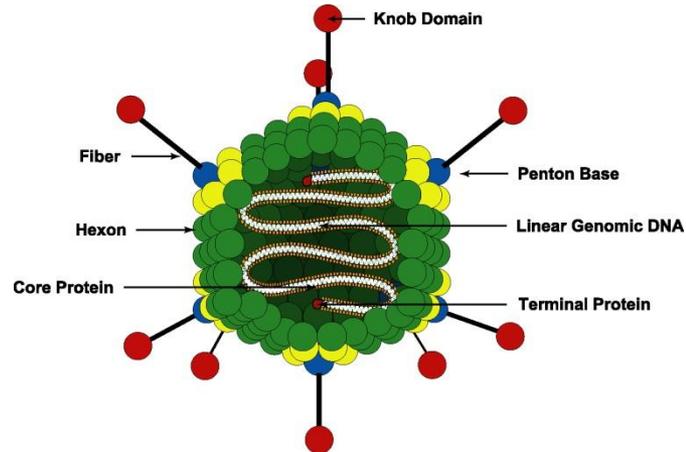


Si sumamos un TSP a E1A mutado tenemos.....

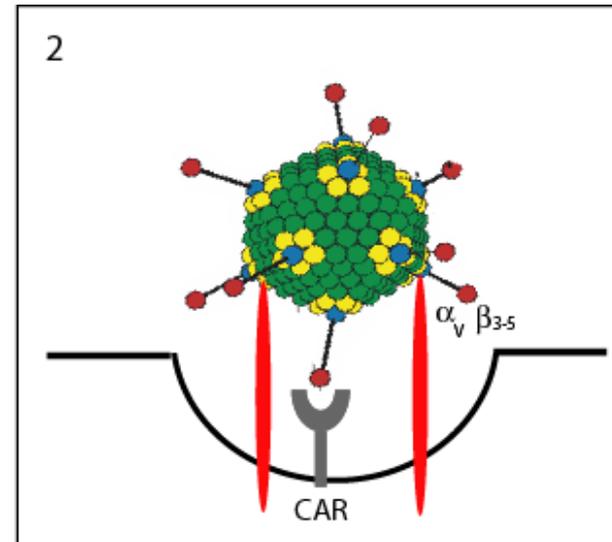


***Como mejorar la selectividad
de los CRAds. II***

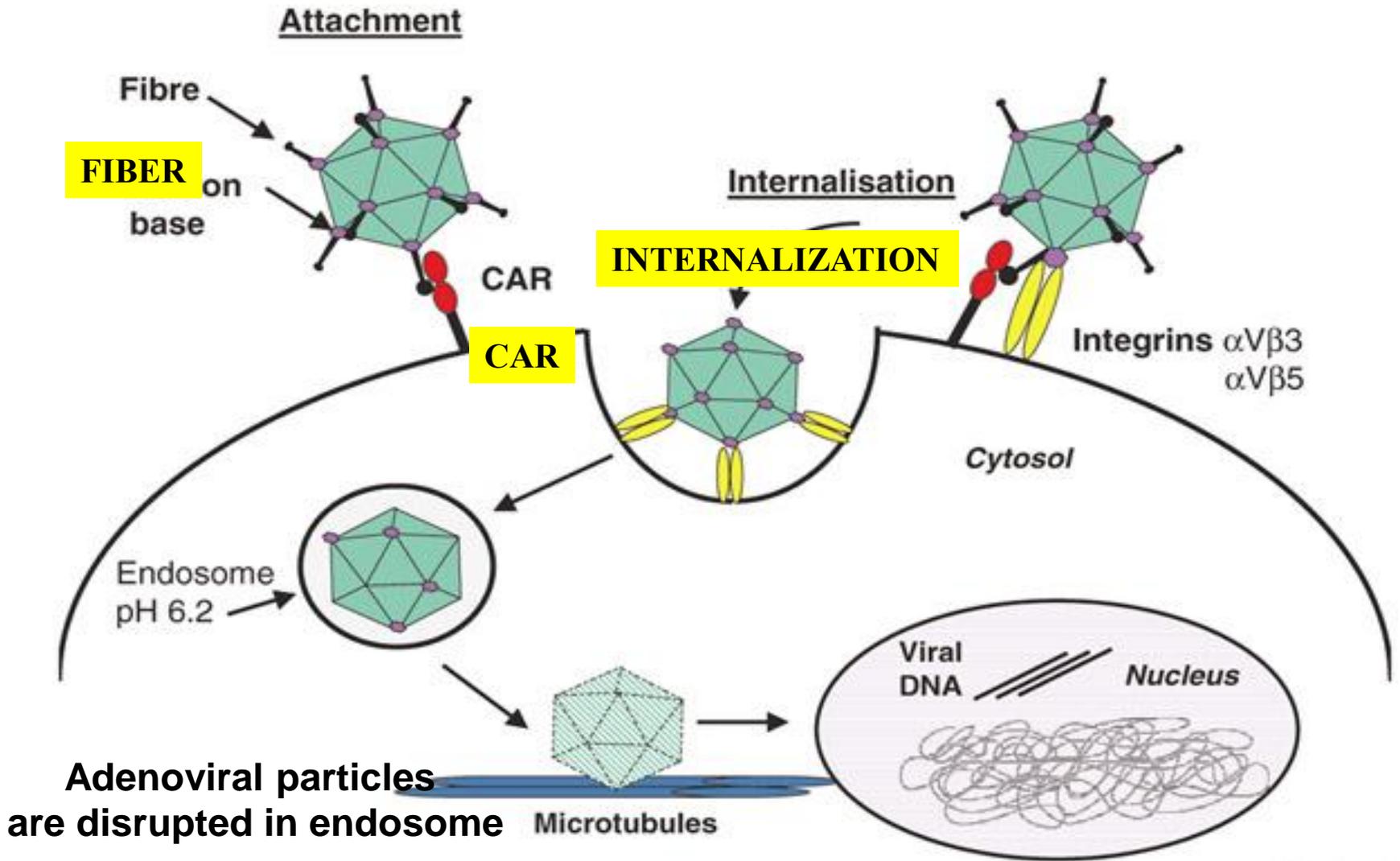
Como infecta un adenovirus



Primero interacciona el dominio Knob con el receptor de CAR



Segundo intervienen los dominios RGD del penton base y se unen a integrinas

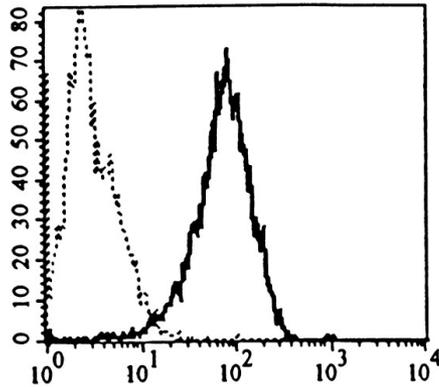


Arthritis Research

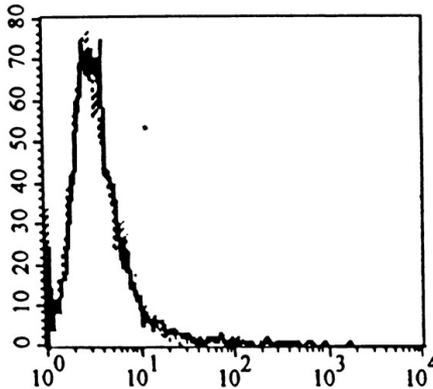
Esto ocurre tanto en células normales como tumorales

Los niveles del receptor CAR limitan la infectividad

Celulas 293:
CAR positiva



Celulas tumorales:
CAR negativa



- Se observaron niveles muy bajos de CAR en tumores humanos
- Esta seria la razon de la falta de efectividad observada
- Tampoco favoreceria la dispersion lateral

¿Qué tenemos que mejorar en los CRAAds?

Selectividad y eficacia

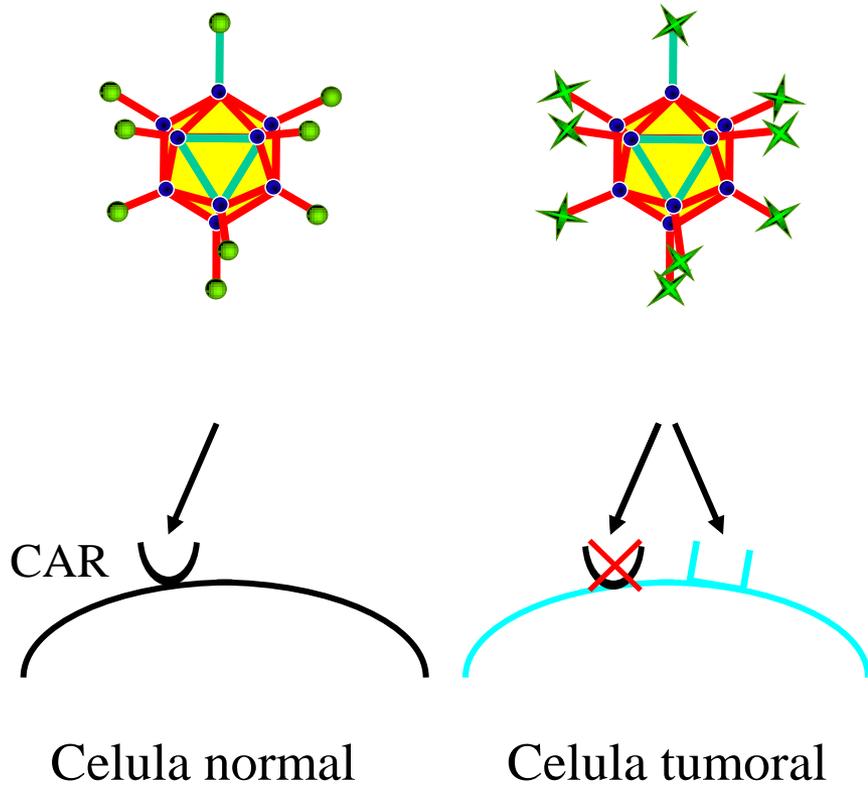
- ↳ *Ingreso a la célula tumoral a través de un receptor diferente y específico de la célula tumoral*
- ↳ *Replicación selectiva en el tumor*
- ↳ *Favorecer dispersión viral lateral*
- ↳ *Evitar su eliminación por el sistema inmune*

¿Qué tenemos que mejorar en los CRAAds?

Selectividad y eficacia

- ↳ Ingreso a la célula tumoral a través de un receptor diferente y específico de la célula tumoral*
- ↳ Replicación selectiva en el tumor*
- ↳ Favorecer dispersión viral lateral*
- ↳ Evitar su eliminación por el sistema inmune*

Expansion del Tropismo de los CRAds

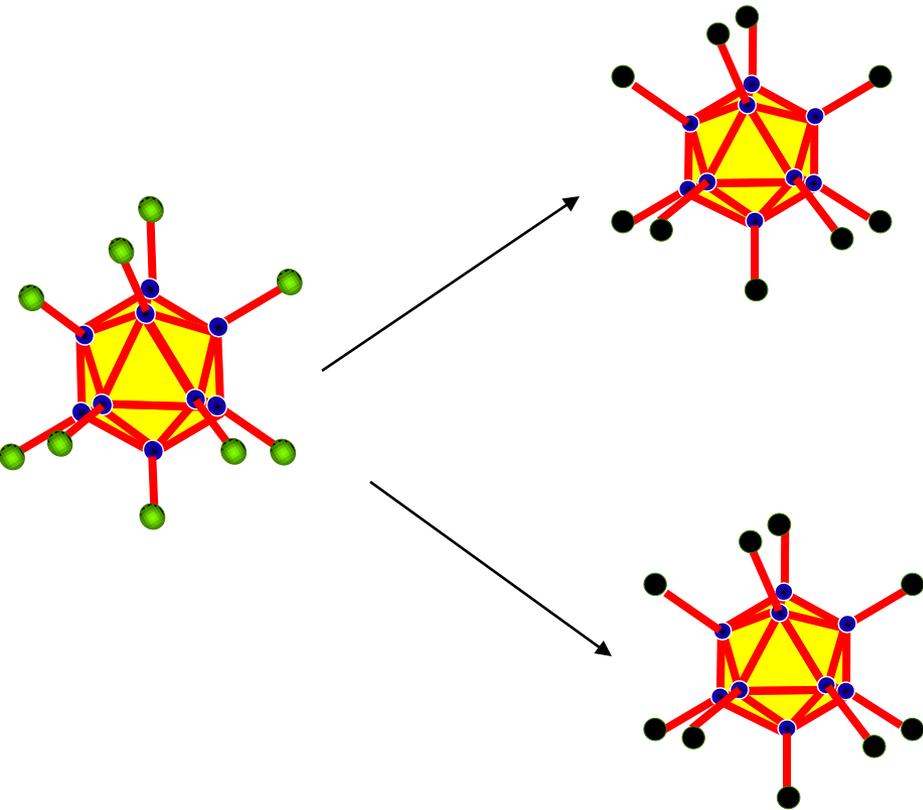


- Modificar el tropismo para que el virus ingrese a traves de otro receptor

Adenovirus

Grupo	Serotipo
A	12, 18, 31
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50
C	1, 2, 5, 6
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51
E	4
F	40, 41

Modificación del tropismo

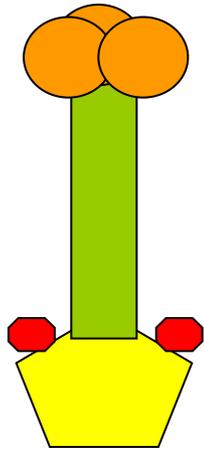


Fibra quimera 5/3

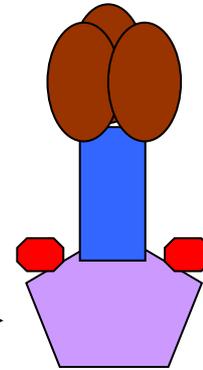
Motivo RGD, une integrinas

Motivo pk7, se une a los receptores con heparan sulfato

Ad5



Ad35



Knob



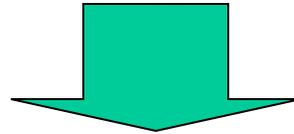
Shaft



RGD

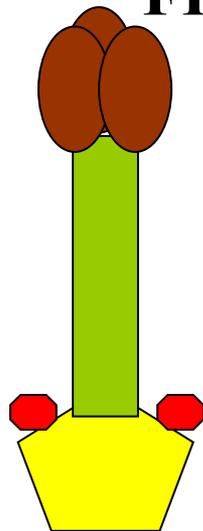


Penton base

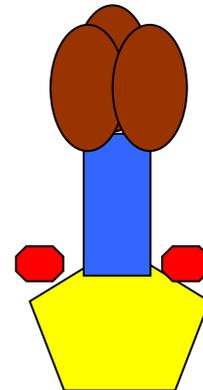


FIBRAS QUIMERAS

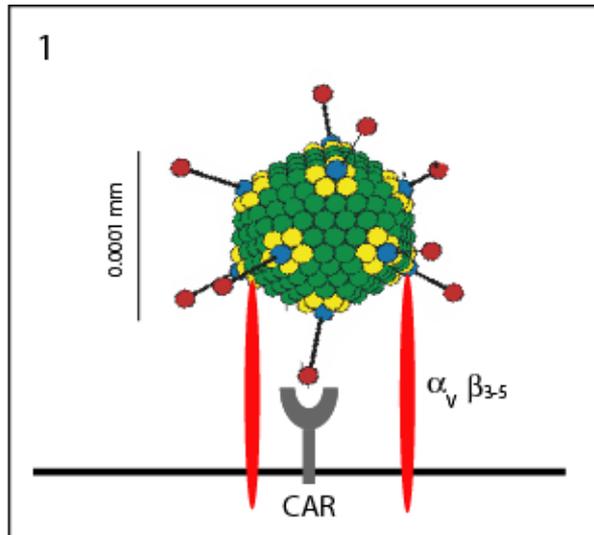
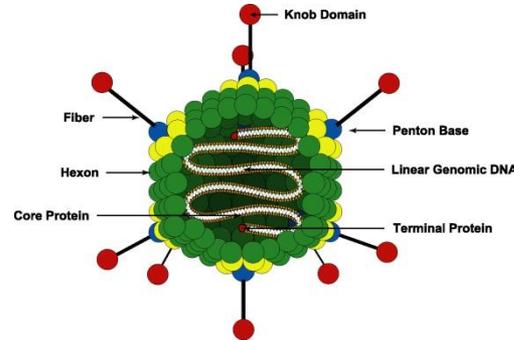
**Fibra Ad5/35
Larga**



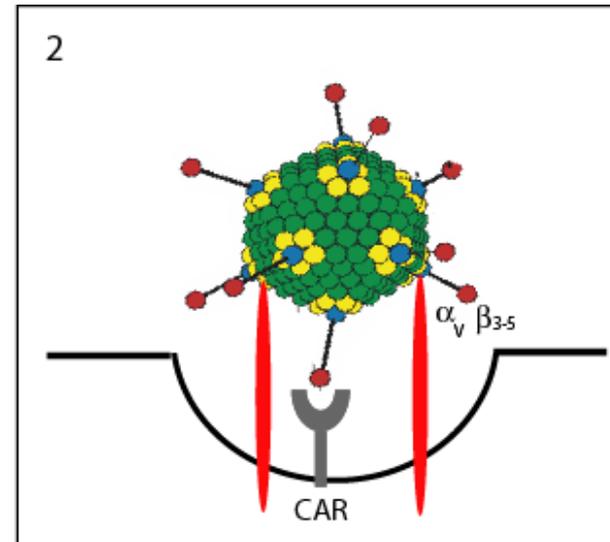
**Fibra Ad5/35
Corta**



Podríamos usar un puente que facilite La entrada del virus??



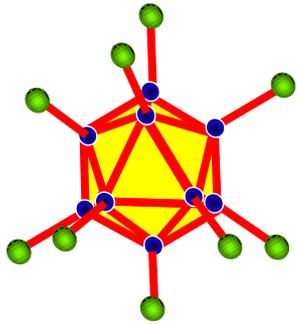
Primero interacciona el dominio Knob con el receptor de CAR



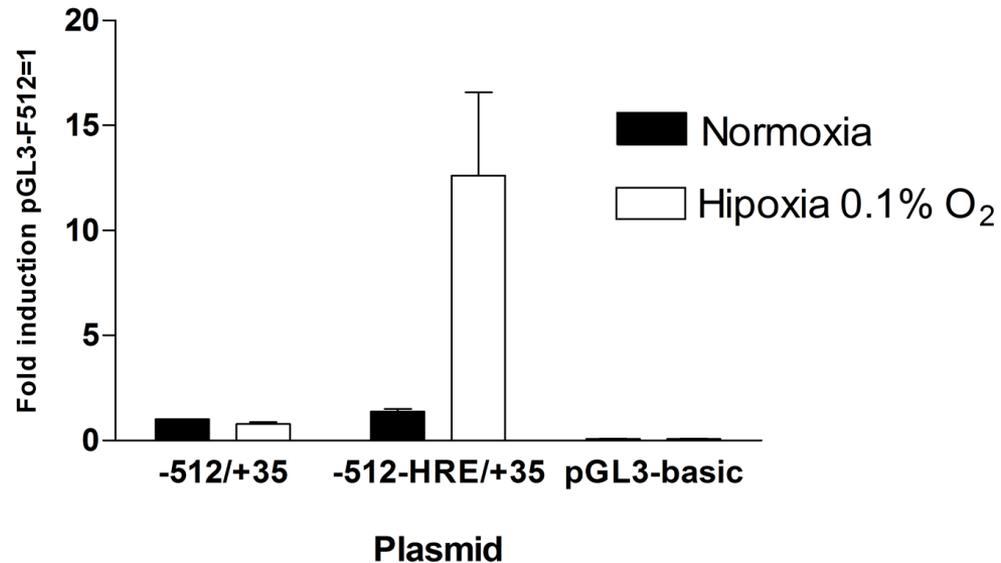
Segundo intervienen los dominios RGD del penton base y se unen a integrinas

***Como mejorar la selectividad
de los CRAds. III***

Aprovechando características del tumor



Nueva modificación de los promotores de CRAds



Conclusiones

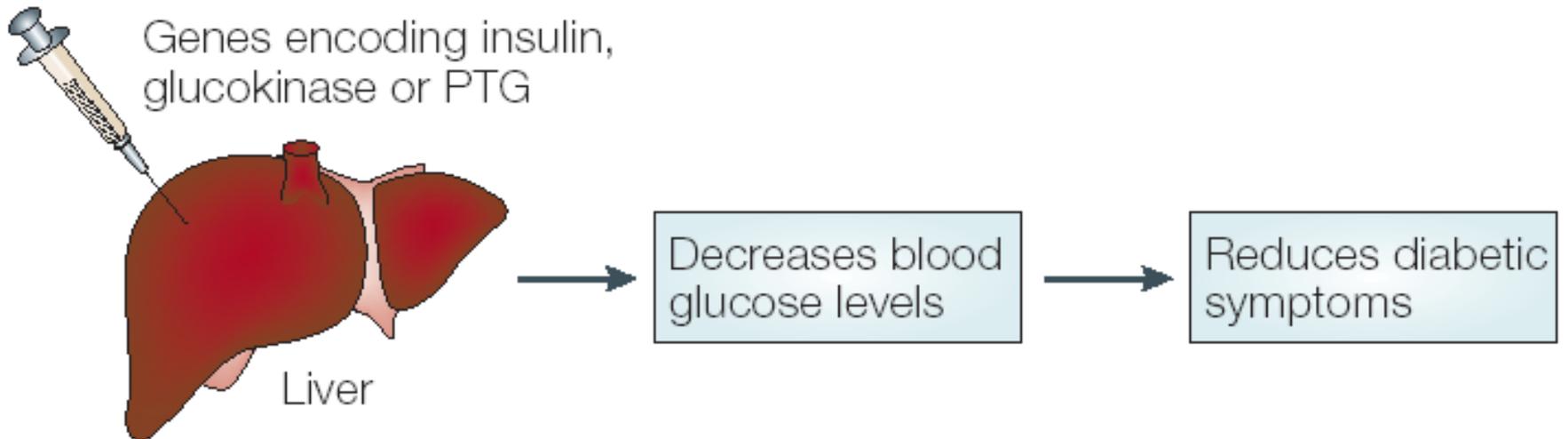
Los adenovirus oncolíticos de replicación condicionada son herramientas capaces de eliminar células tumorales en forma específica

Existe un fuerte nivel de atenuación en células normales lo que les confiere a estos adenovirus una importante perspectiva clínica

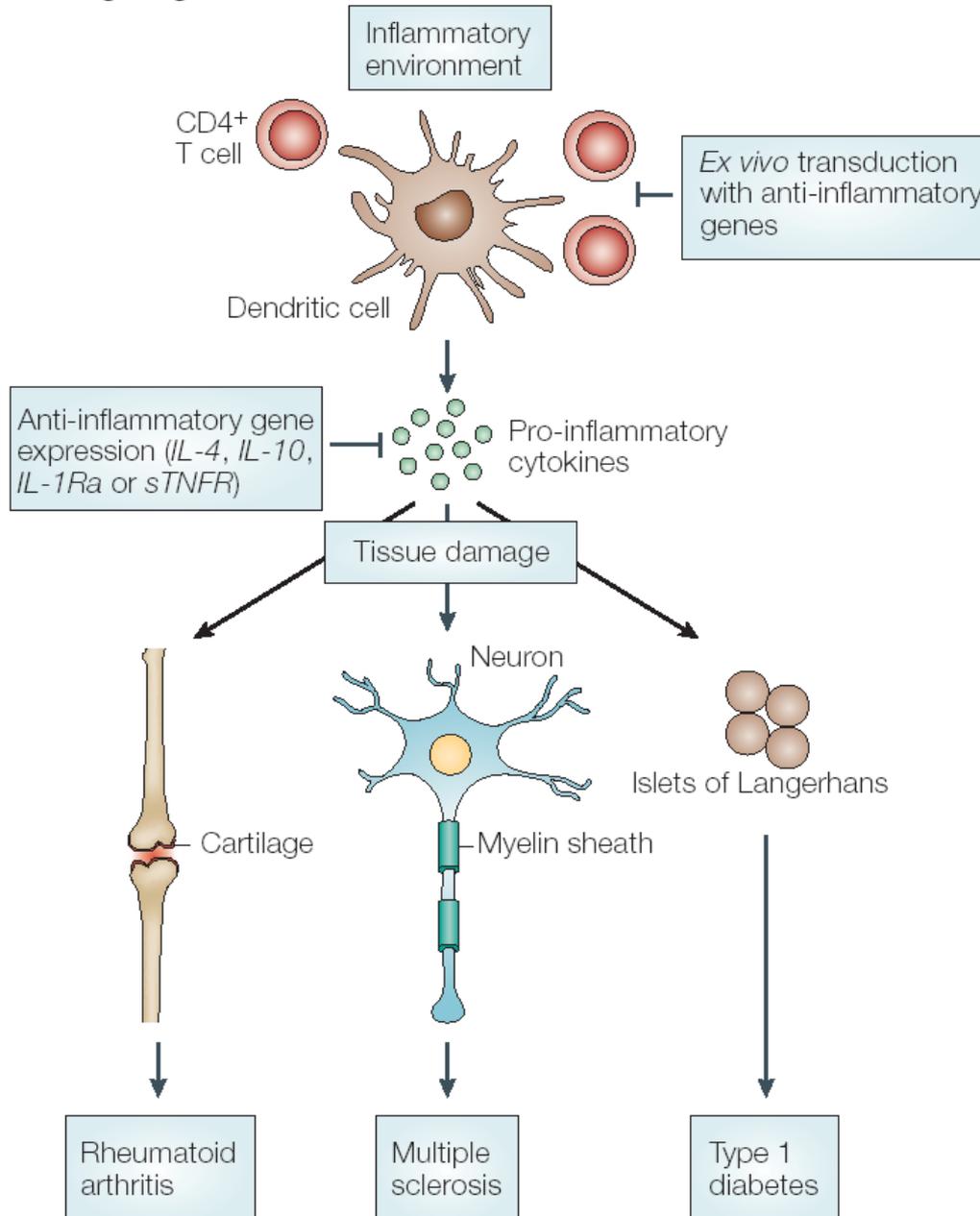
Las modificaciones por ingeniería genética tanto internas como externas tornan a estos virus herramientas “inteligentes” para atacar el tumor en forma específica

Molecular targets in autoimmune diseases.

a Reconstituting genes

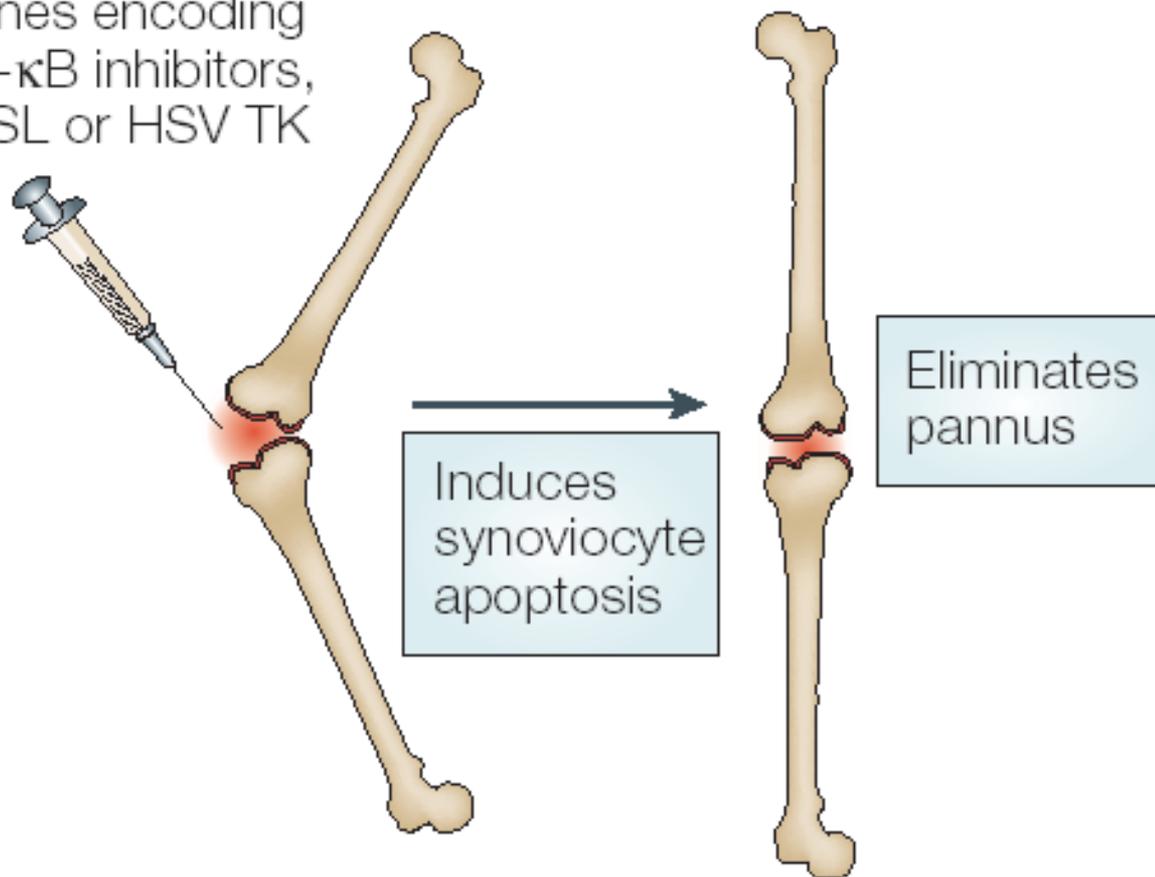


b Targeting inflammation

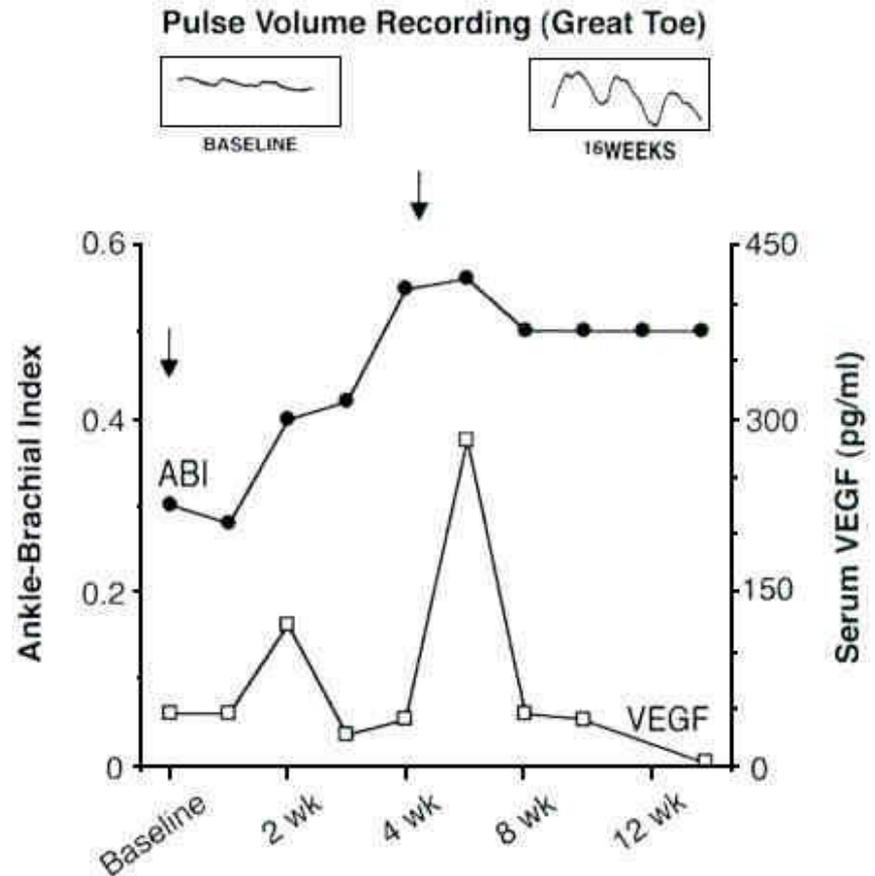


d Targeting associated pathologies

Genes encoding
NF- κ B inhibitors,
FASL or HSV TK



🌸 VEGF intramuscular injection for critical limb ischemia



🌸 Circulation 97 (12): 1114 (1998)

Ethical considerations

 **Cosmetic uses (currently being done with collagens)**

 **In utero gene therapy**

 **Sports uses (currently being done with EPO)**

 **Cloning and genetic engineering**

SCID

Causes

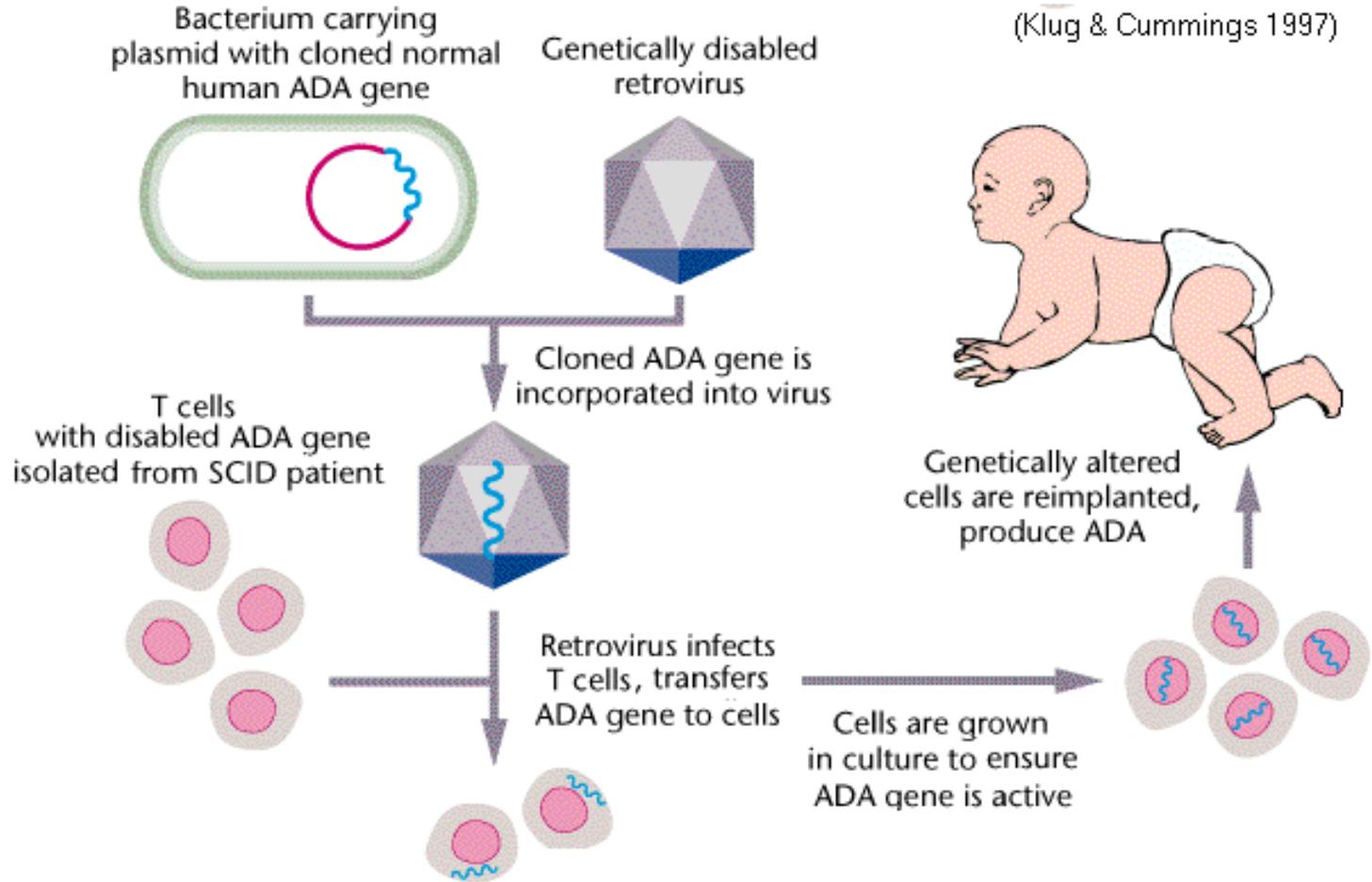
- **Mutated ADA**
 - **X-linked**
- **Mutated γ_c Receptor for cytokines**
- **~ 70 other forms of primary immunodeficiency**

Treatments

- **Germ-free environment**
- **Histocompatible bone marrow**
 - **graft v. host**
- **PEG-ADA**
- **Gene Therapy?**

Gene Therapy for SCID

diseases



🌸 Major success of gene therapy



Commonly referred to a "bubble boy" disease, SCID, gets its moniker from David Vetter, a boy who lived out his 12 years of life in a germ-free plastic bubble.

🌸 Gene Therapy

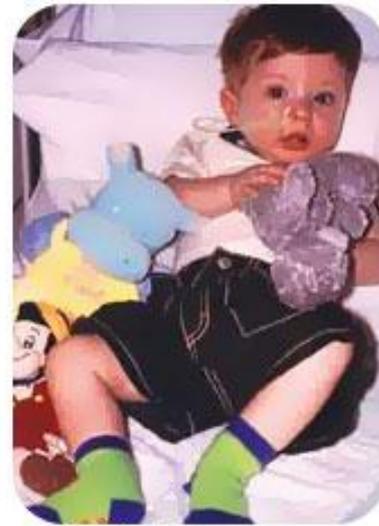
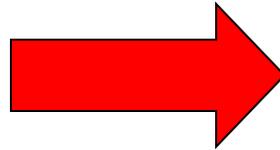
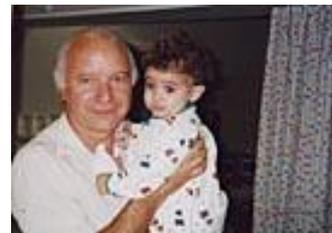


Photo: Courtesy of 'Jeans for Genes'

Ten-month-old Rhys Evans was successfully treated with gene therapy for SCID in 2001.



[http://www.newscientist.com/article/
dn13783-gene-therapy-success-
reverses-blindness.html](http://www.newscientist.com/article/dn13783-gene-therapy-success-reverses-blindness.html)