

# “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

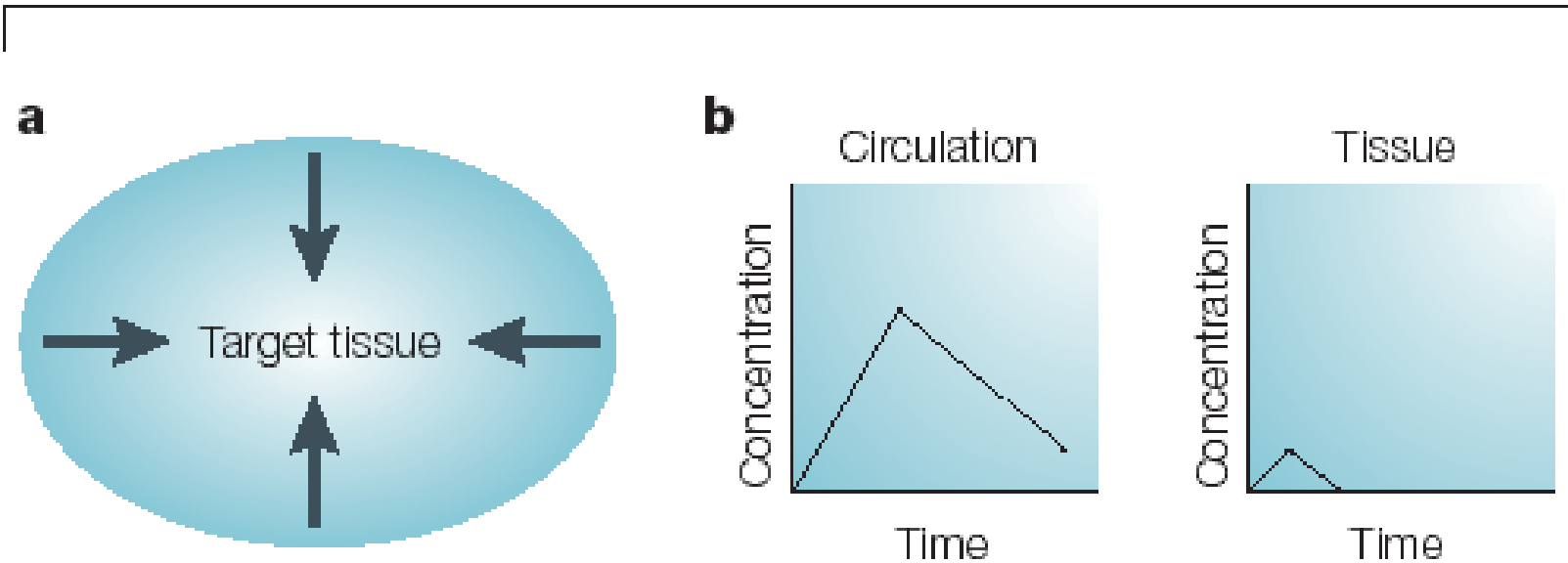
D) systemic administration might produce unacceptable side effects such as widespread immunosuppression

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

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

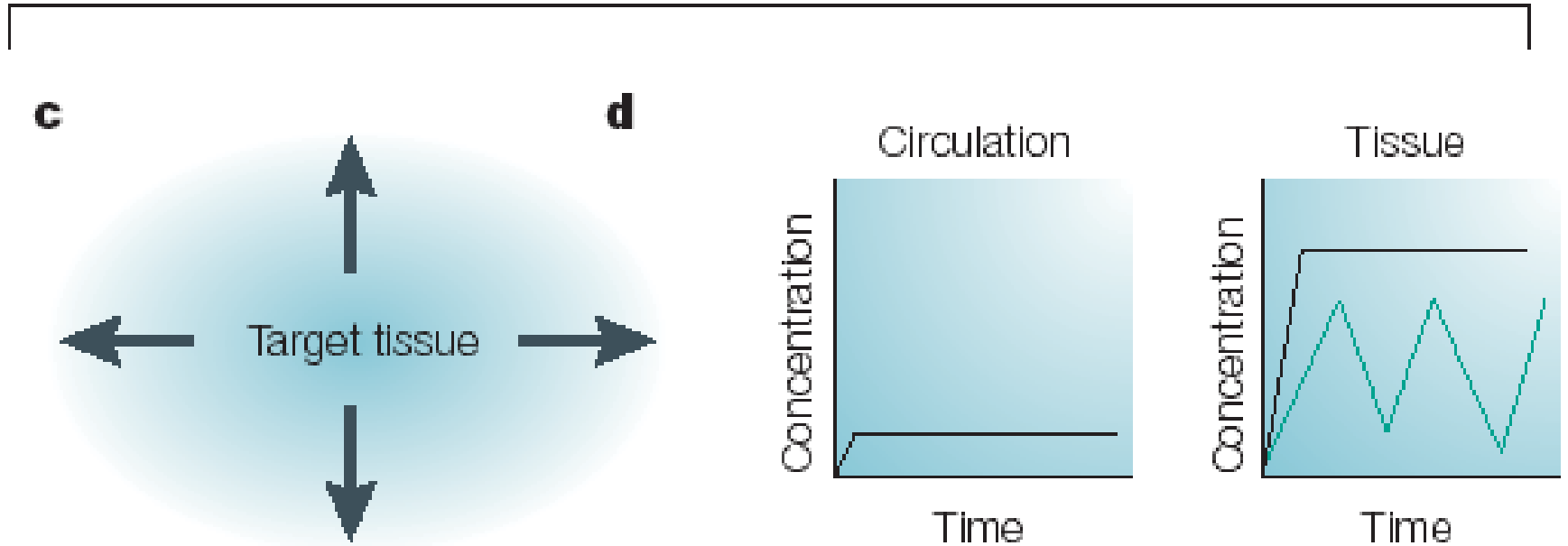
# Pharmacological differences between protein and gene therapy

## Protein therapy

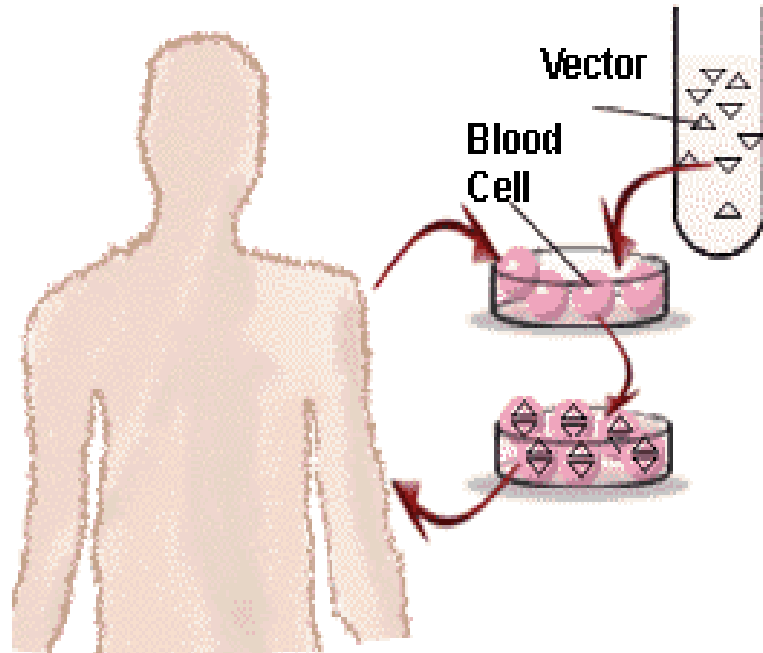


# Pharmacological differences between protein and gene therapy

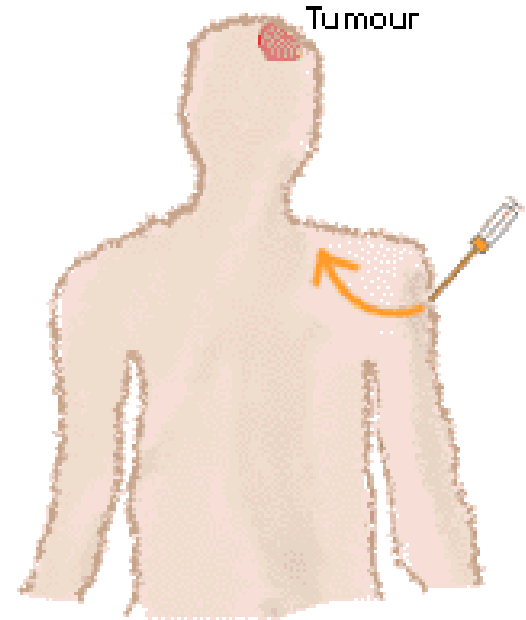
## Gene therapy



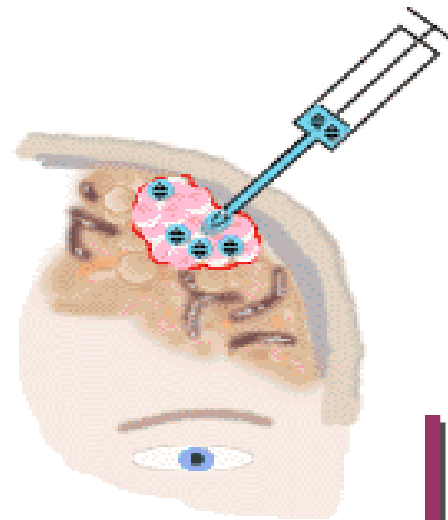
# Strategies for gene transfer



**Ex vivo**



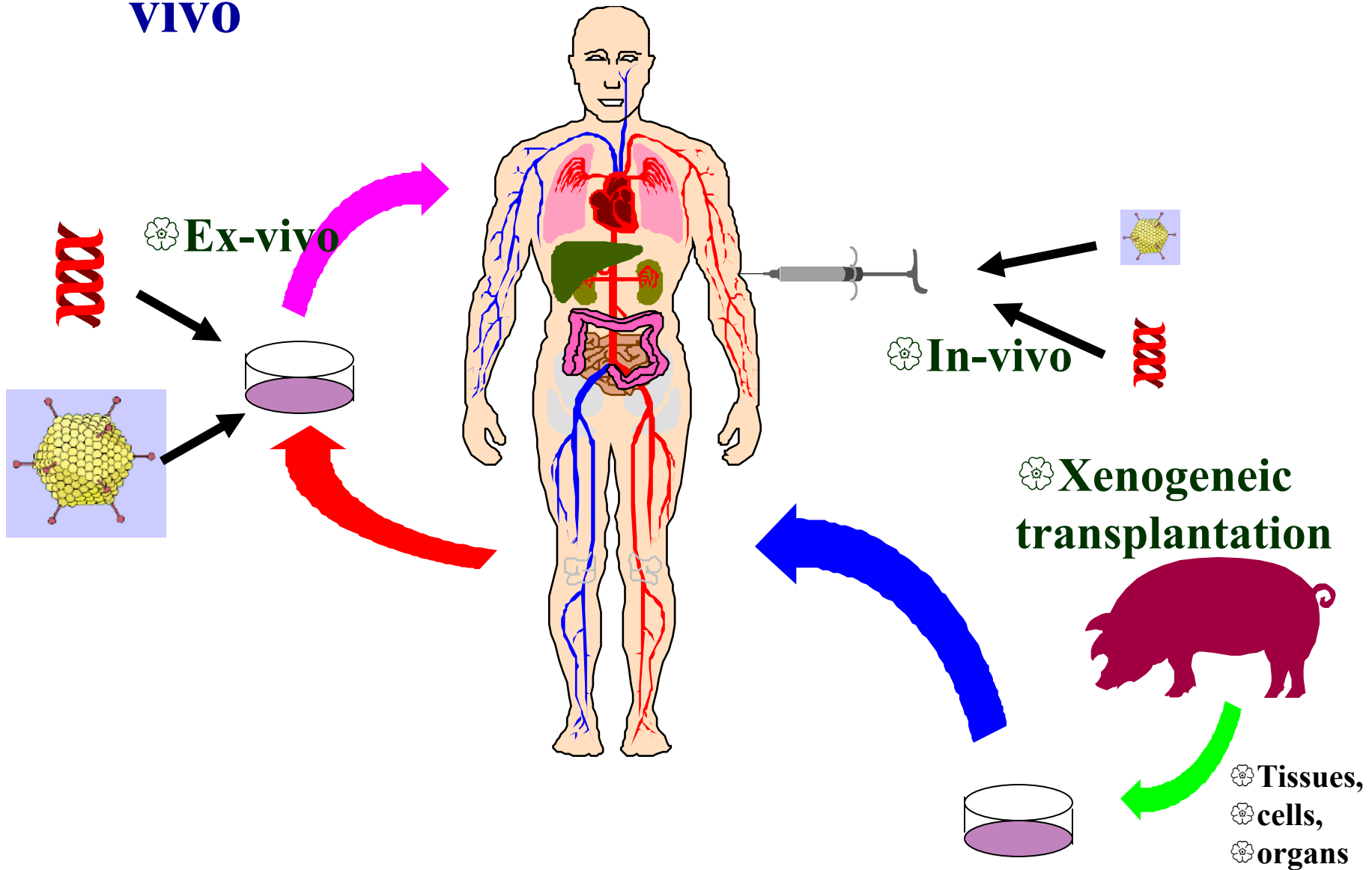
**In vivo**



**In situ**

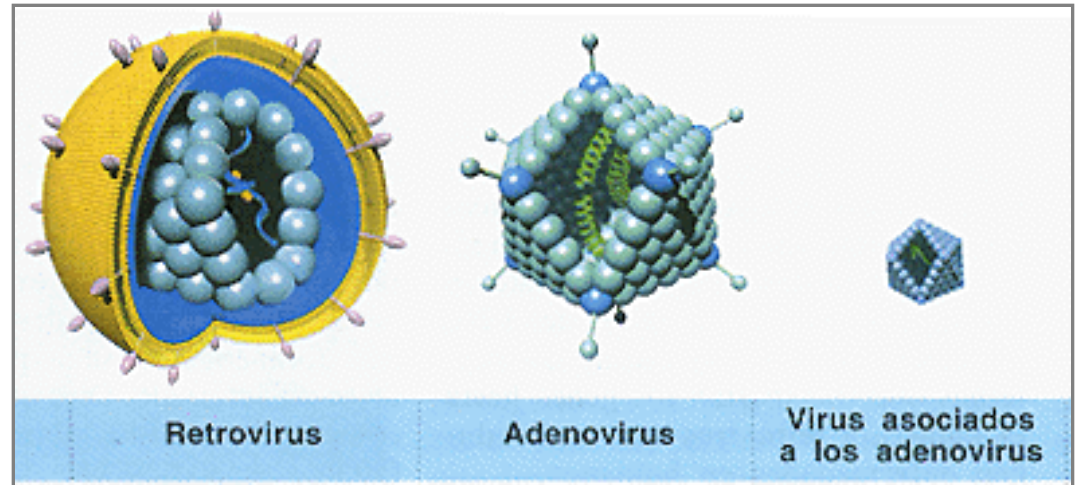


# 🌸 Somatic gene therapy: ex vivo vs in vivo

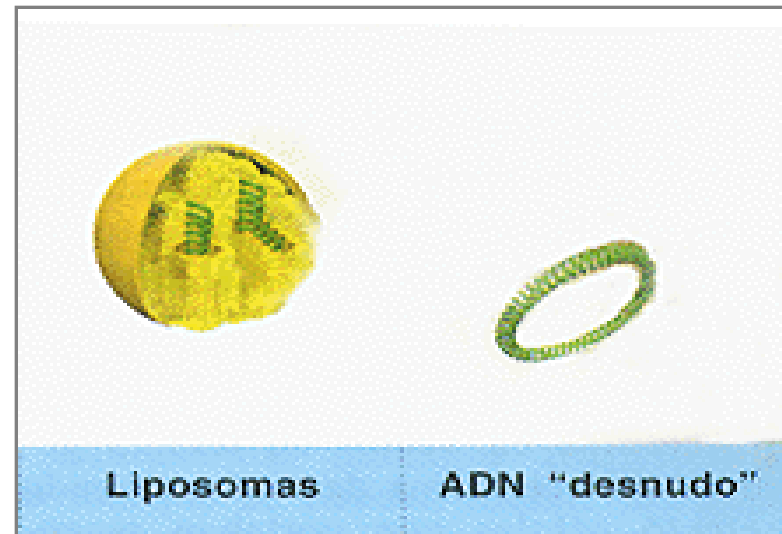


# Vectores utilizados

## Vectores virales



## Vectores no virales



---

---

## Vectores recombinantes

### ① Virales

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

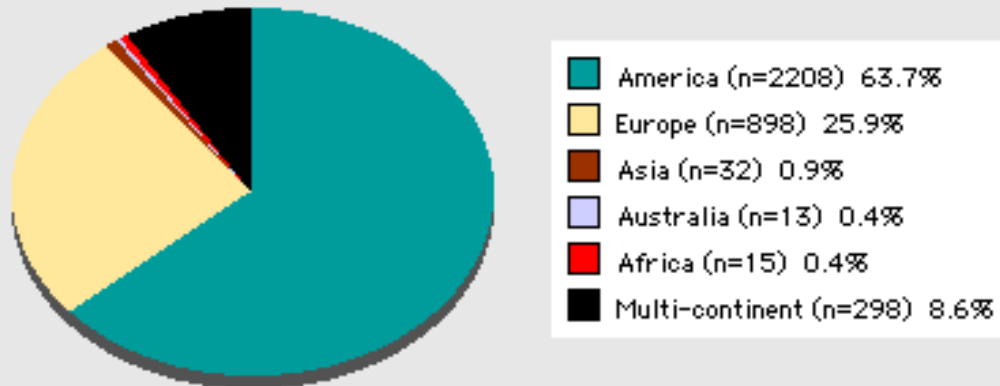
### ② No virales

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

### ③ Mixtos

- ❖ Virus + liposomas
- ❖ Virus + copolímeros

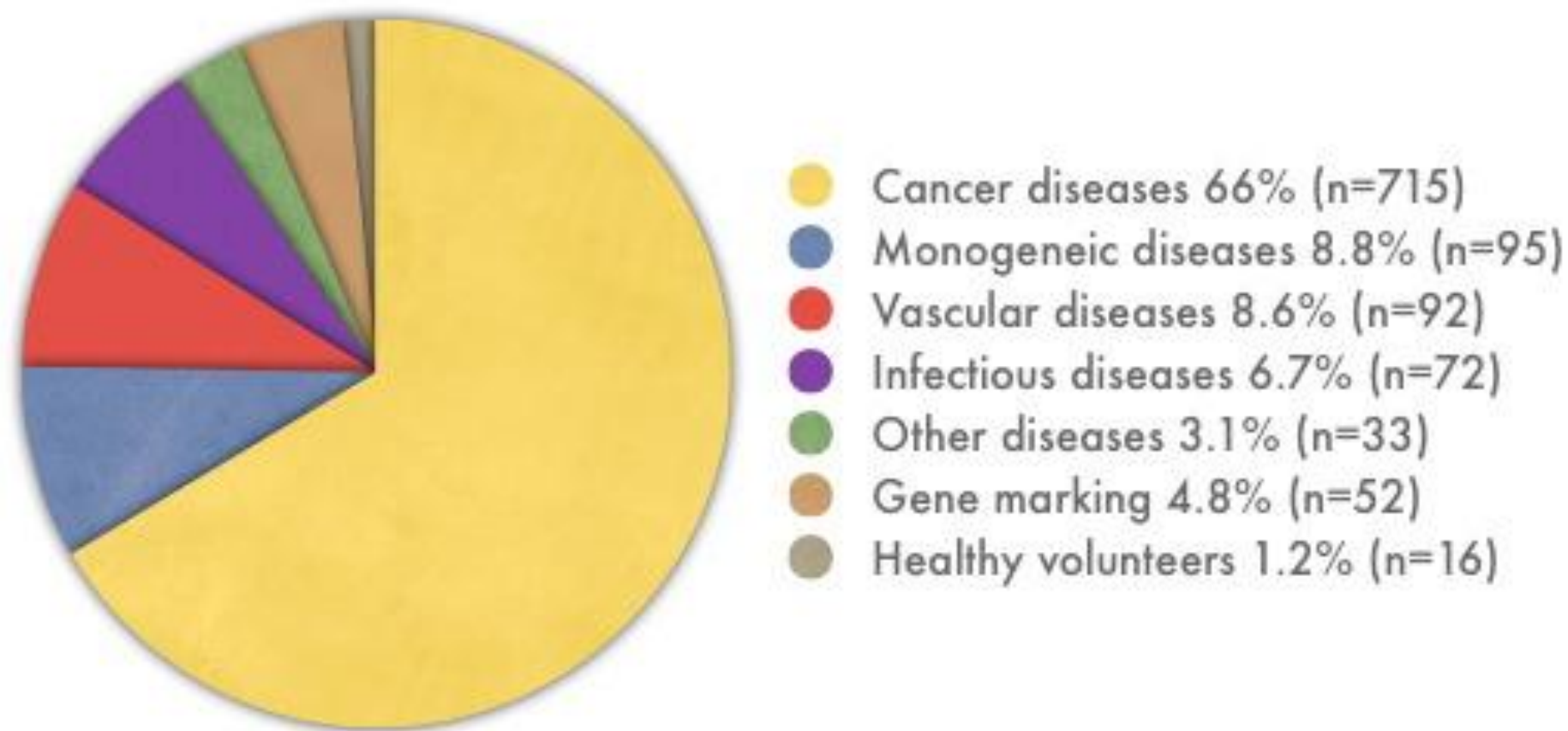
## Pacientes por continente



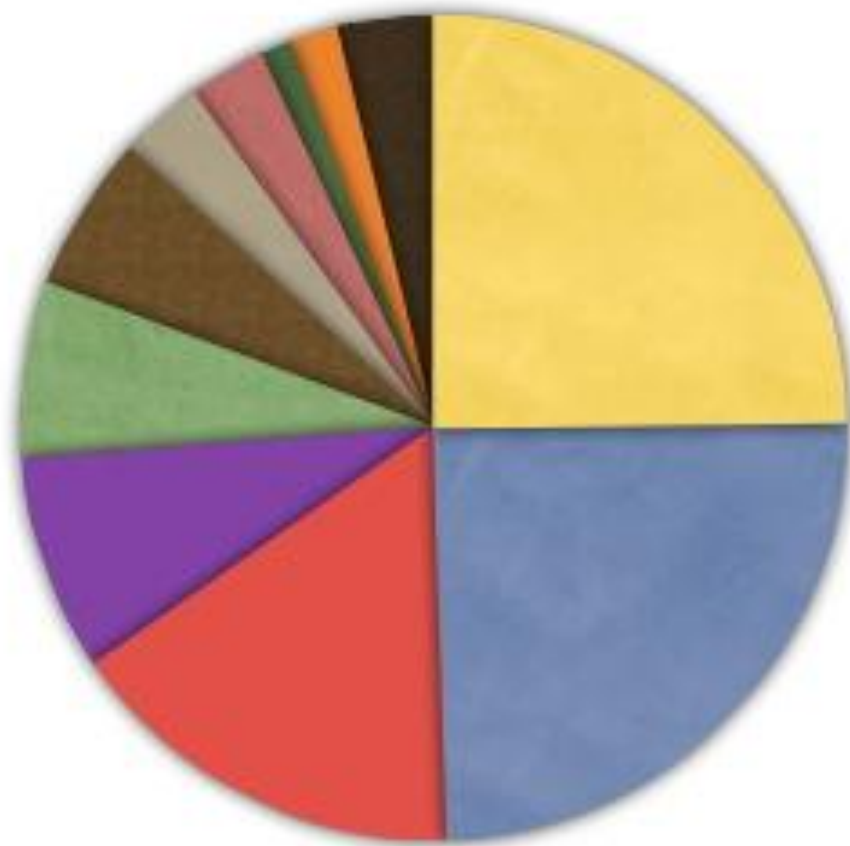
Continent	Protocols		Patients	
	Number	%	Number	%
America	<b>480</b>	<b>80</b>	<b>2208</b>	<b>63.2</b>
Europe	<b>103</b>	<b>17.2</b>	<b>928</b>	<b>26.6</b>
Asia	<b>9</b>	<b>1.5</b>	<b>32</b>	<b>0.9</b>
Australia	<b>3</b>	<b>0.5</b>	<b>13</b>	<b>0.4</b>
Africa	<b>1</b>	<b>0.2</b>	<b>15</b>	<b>0.4</b>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

Trial continents

## Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials

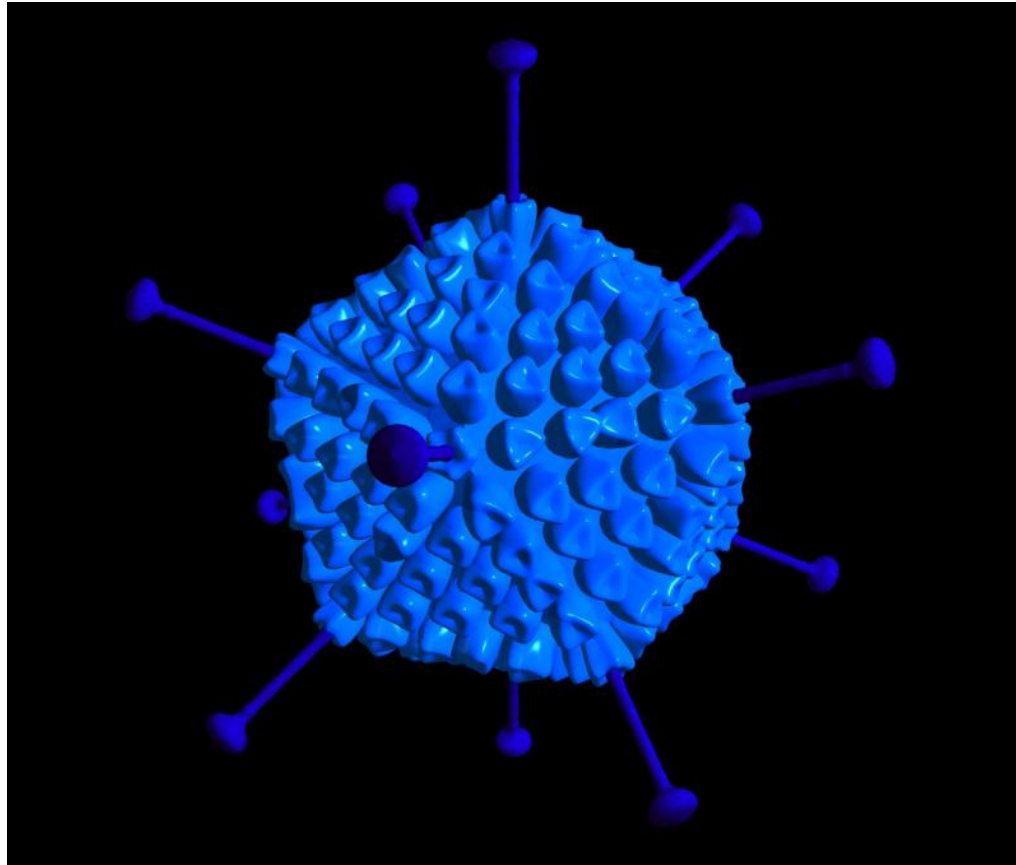


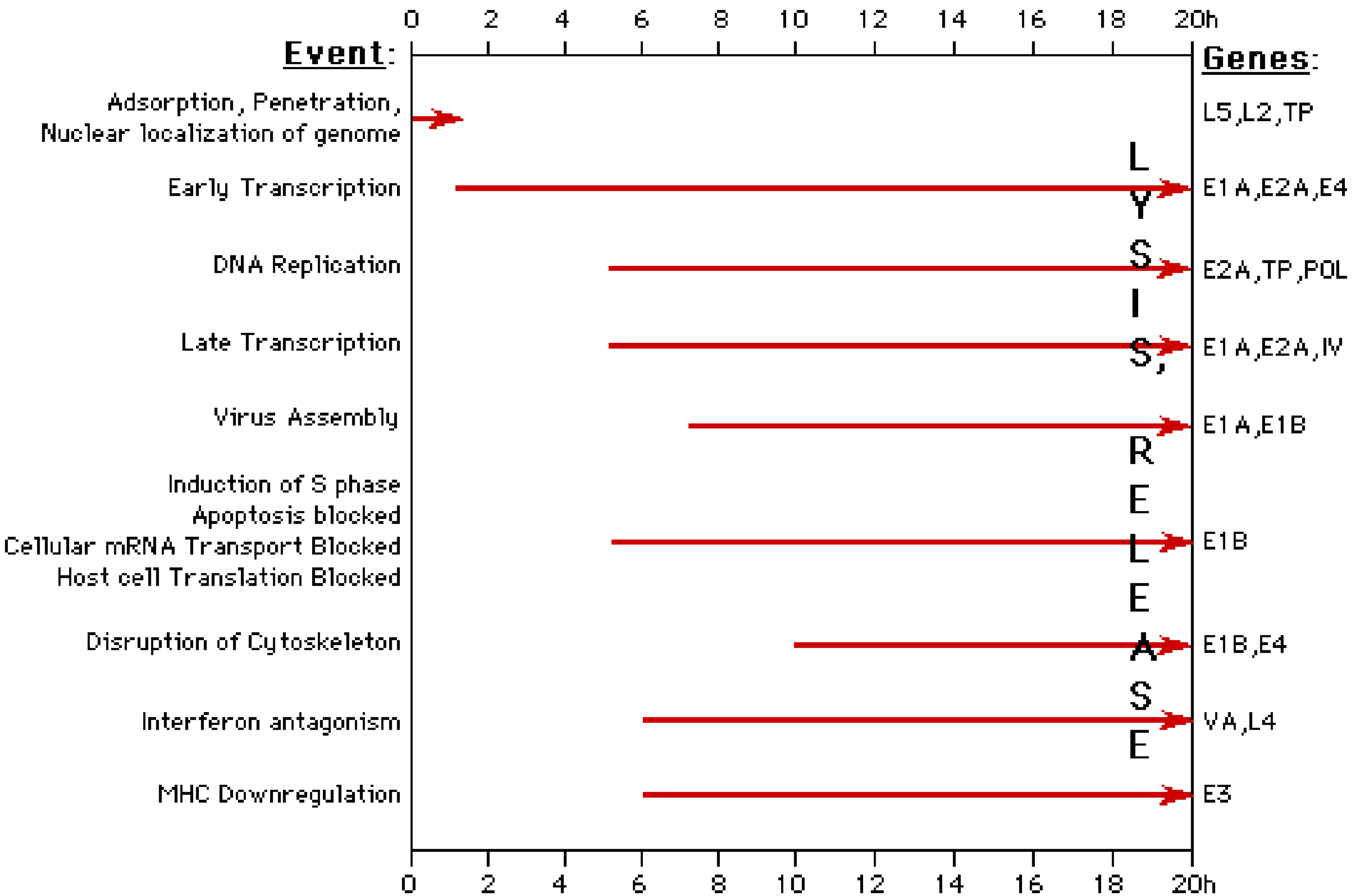
## Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials



- 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)

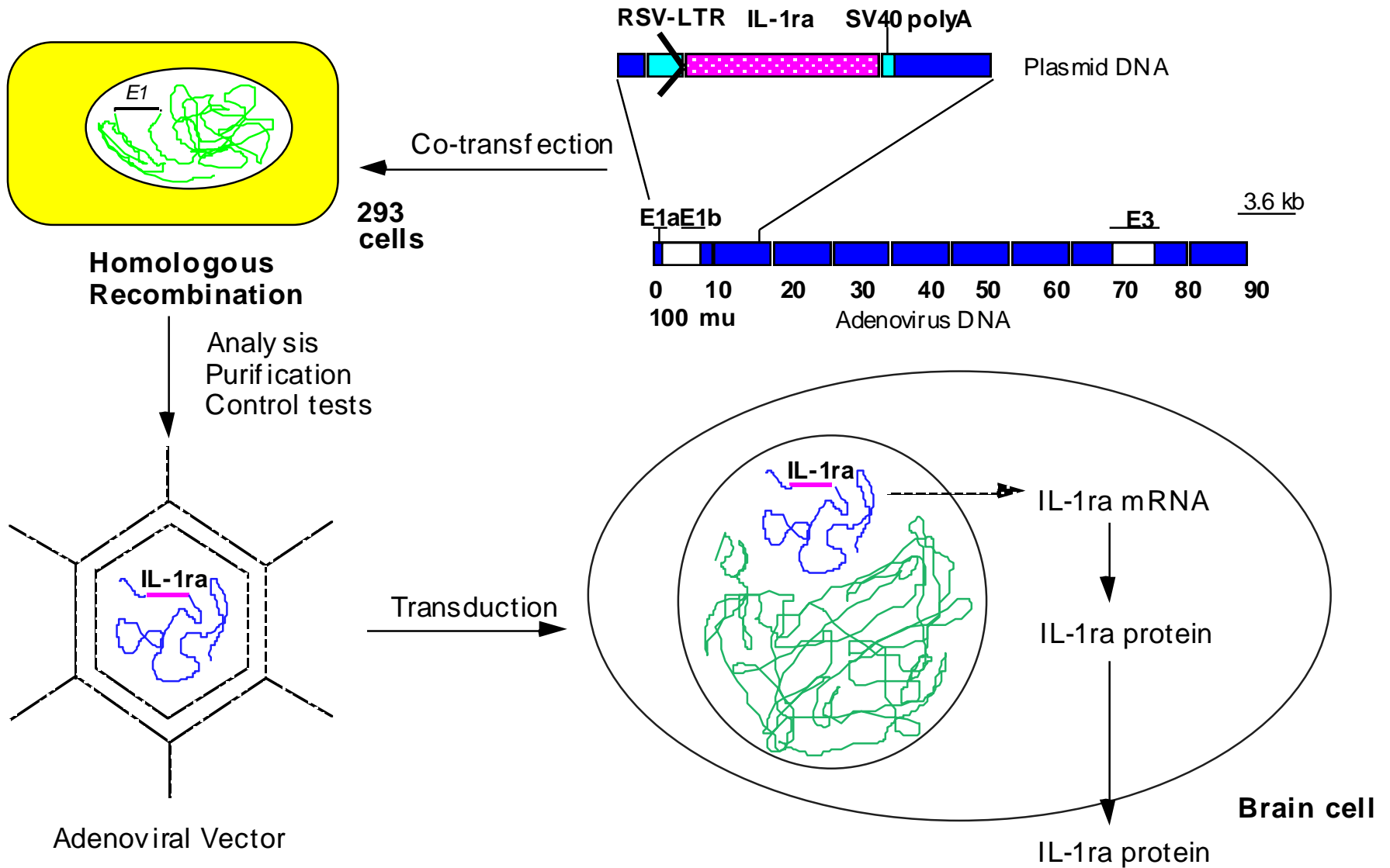
# Adenovirus



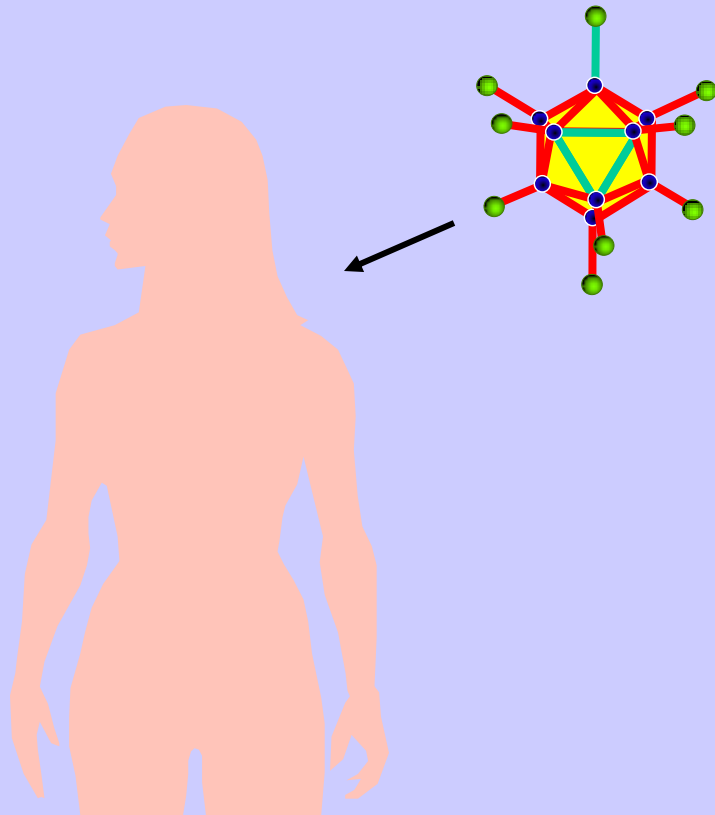




# Replication-deficient adenoviral vectors for gene transfer in vivo



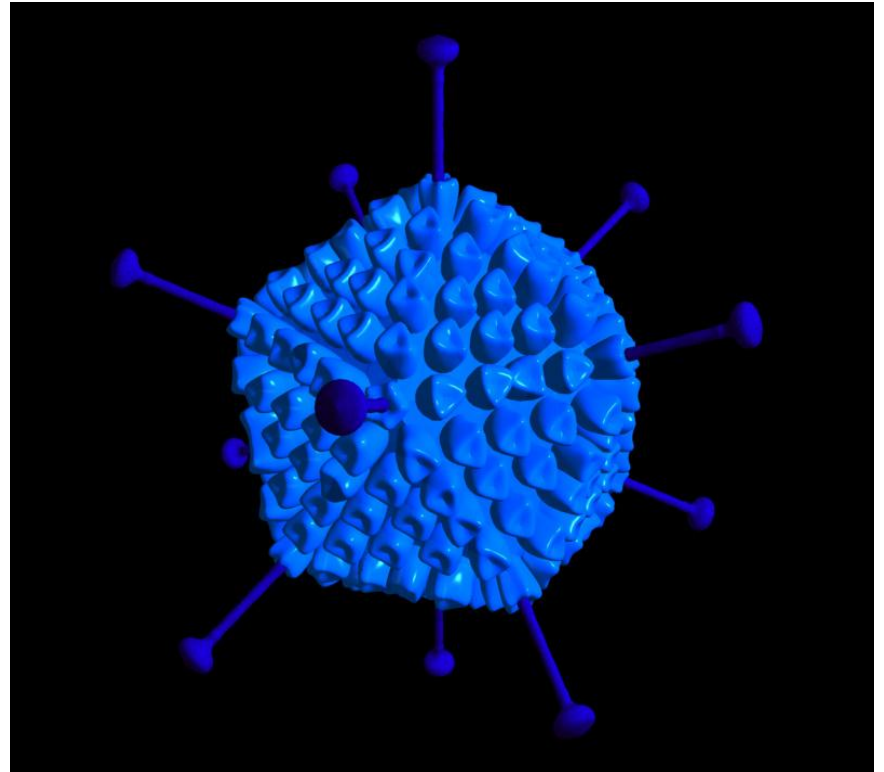
# Terapia Genica en Cancer



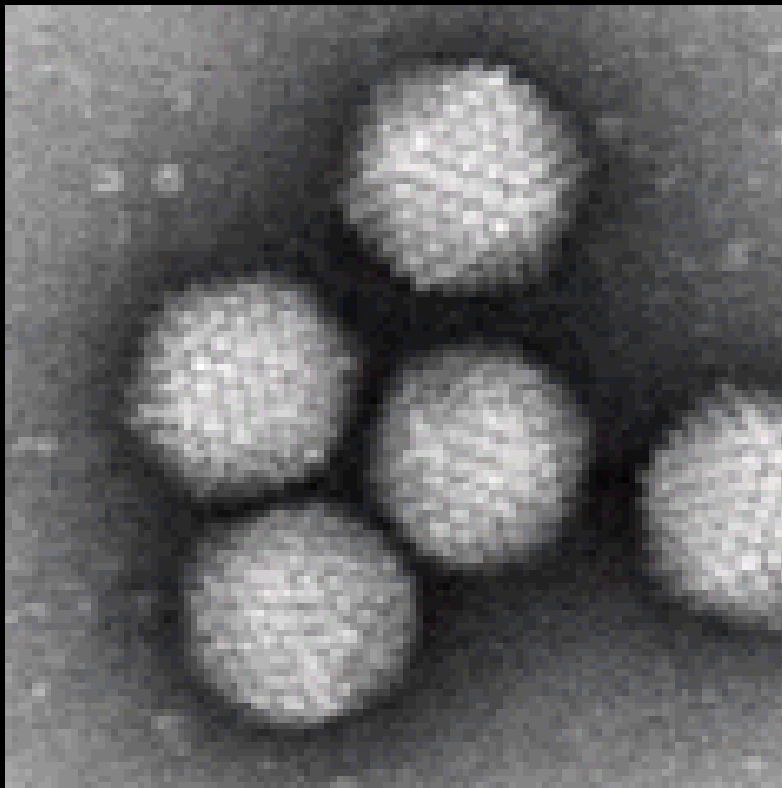
- Los ensayos clinicos con virus han demostrado un alto nivel de bioseguridad en pacientes
- Su eficacia es limitada esencialmente debido a la **poca eficacia terapeutica** de los vectores no replicativos usados inicialmente

# Parametros a considerar en la mejora de un virus terapeutico

- Gene delivery
- Actividad del gen
- Bioseguridad



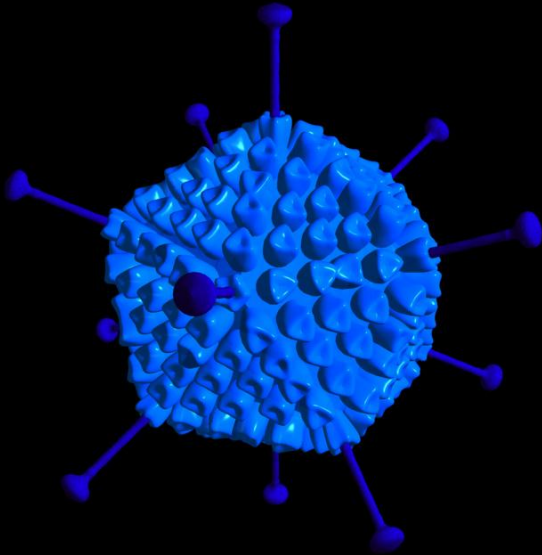
# Ventajas del uso de adenovirus



- 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

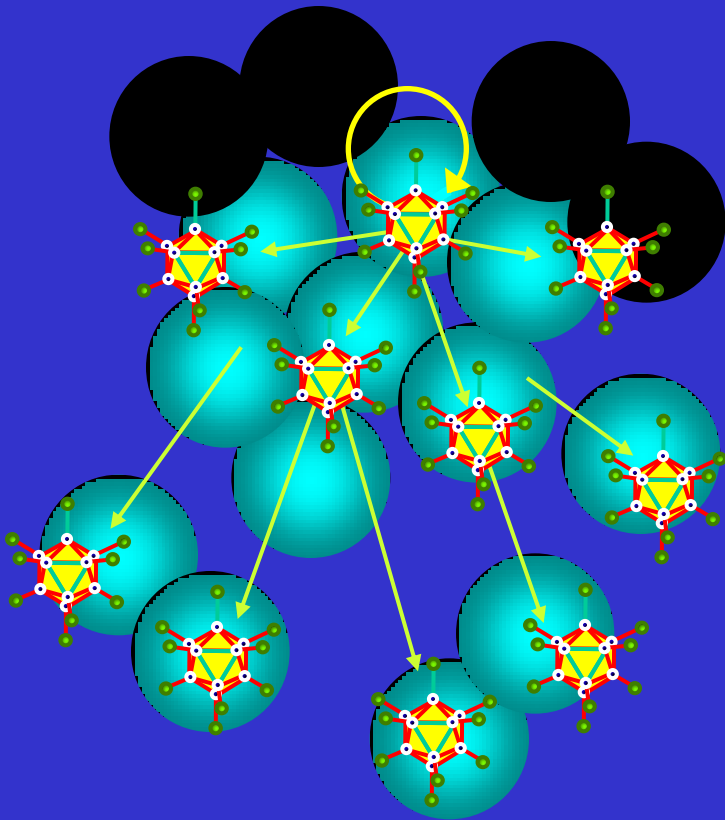
---



**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???

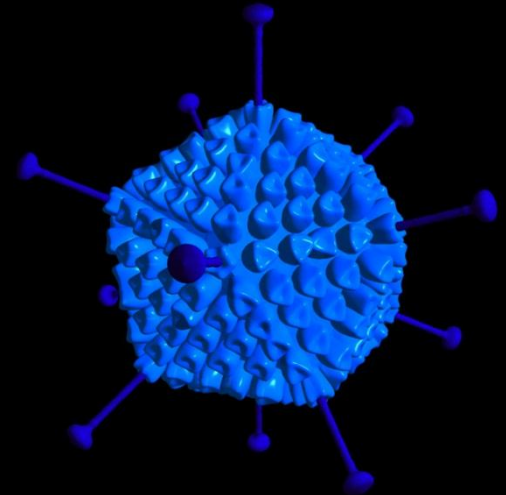
---

✓ 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

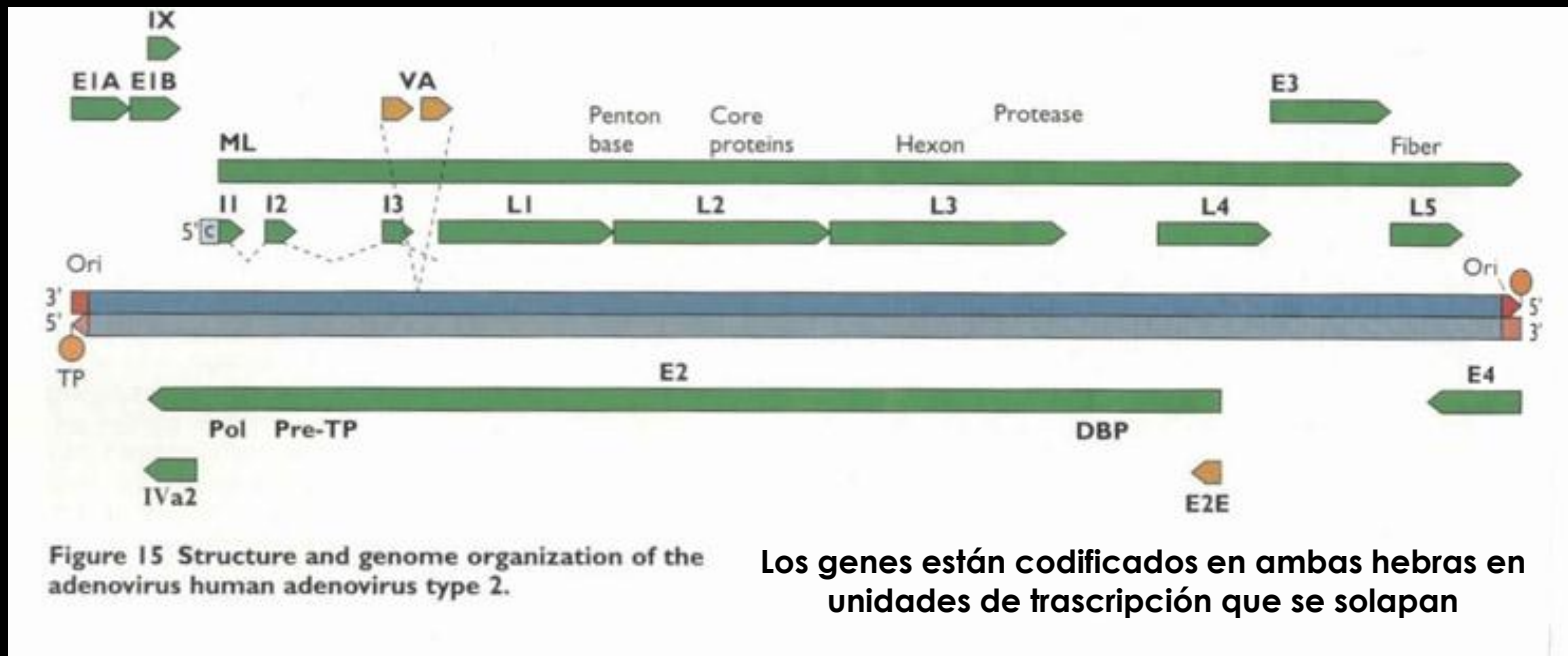


# Organización del genoma viral y ciclo infectivo

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)

### Criterios para seleccionar un TSP:

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



Ad-wt, promotor nativo de E1A



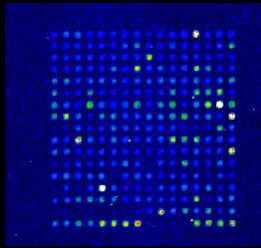
CRAd, promotor tumor-específico conduciendo a E1A

### Clases de TSP:

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

# Como seleccionamos un promotor especifico??

---

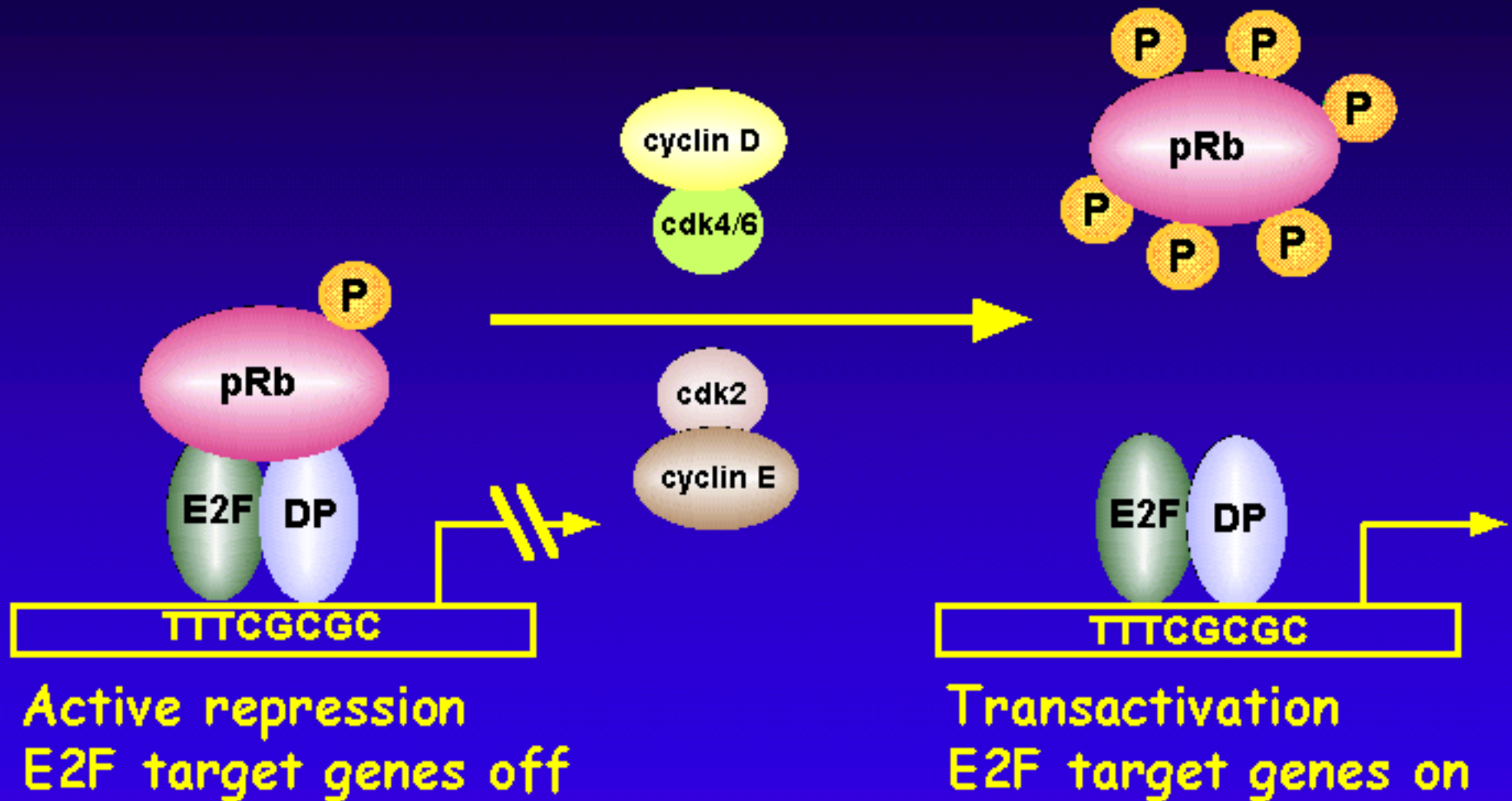


→ Sobre-expresión de un gen

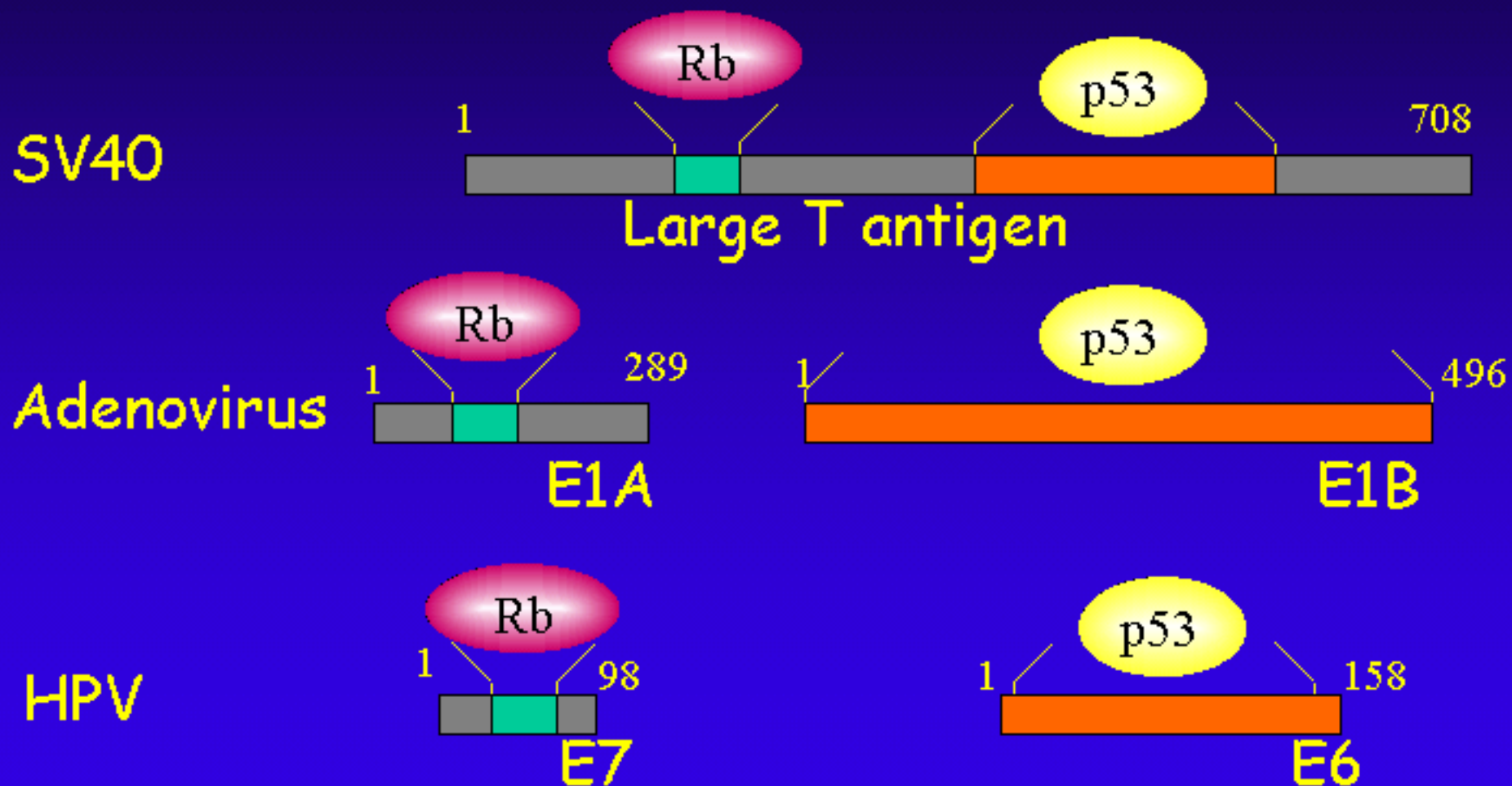


***Como mejorar la selectividad  
de los CRAds. I***

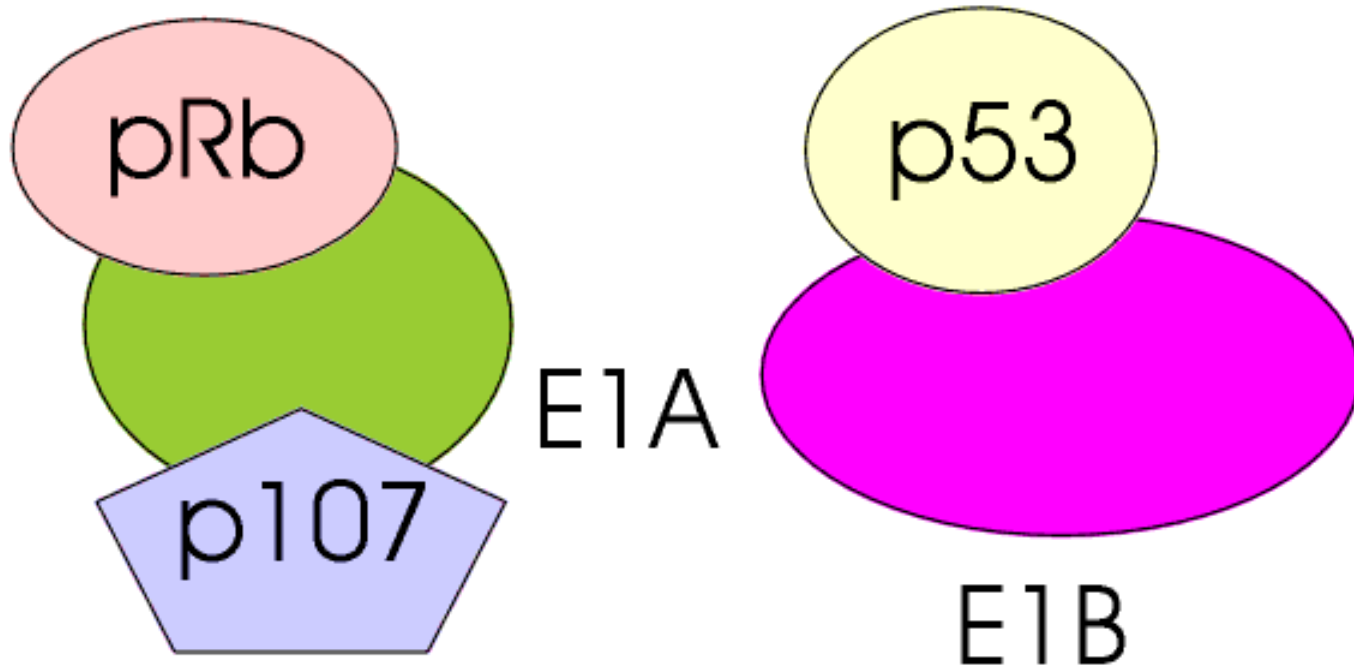
# Regulation of E2F activity through pRb phosphorylation



# DNA tumor viruses bind multiple cellular proteins

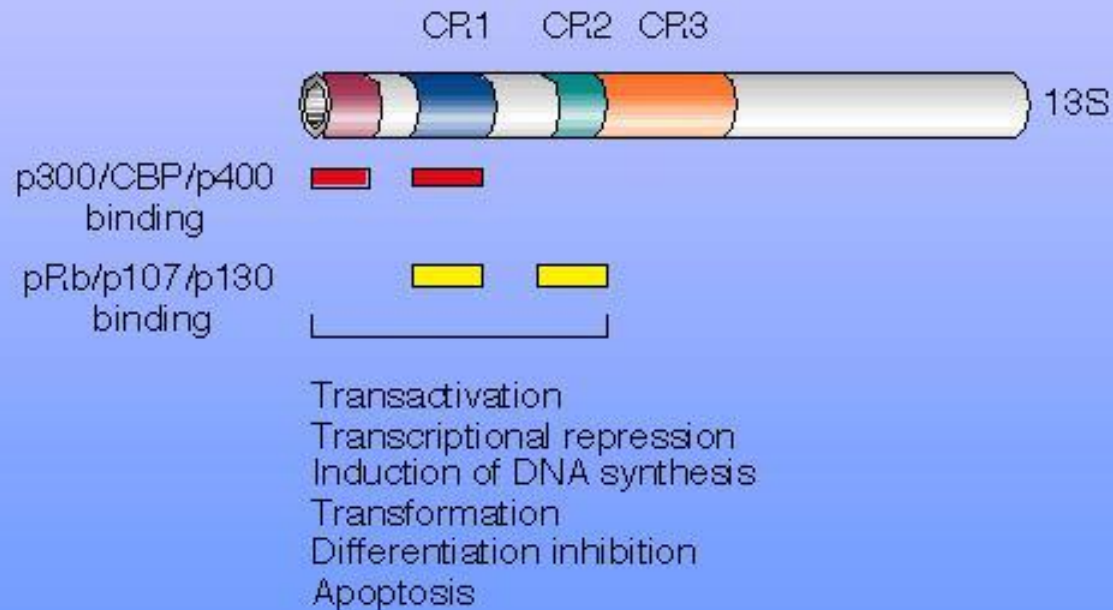


## Interacción de E1 con Rb y p53

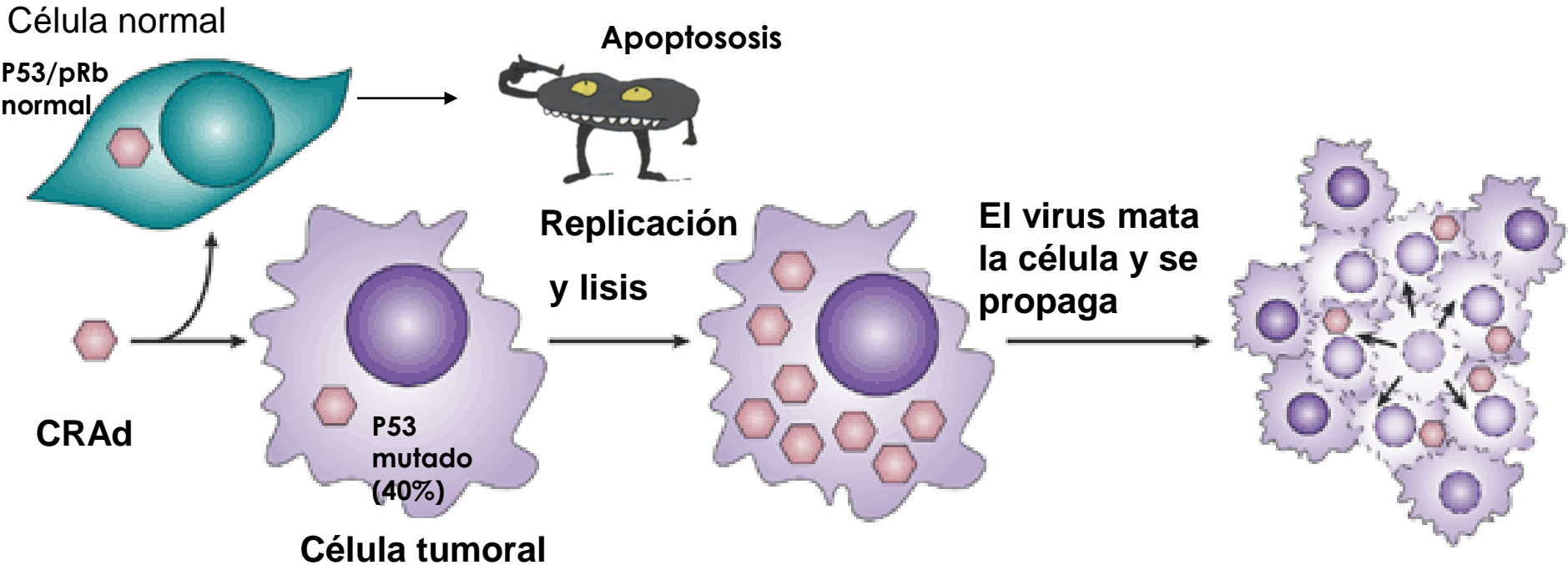




# Adenovirus E1A protein

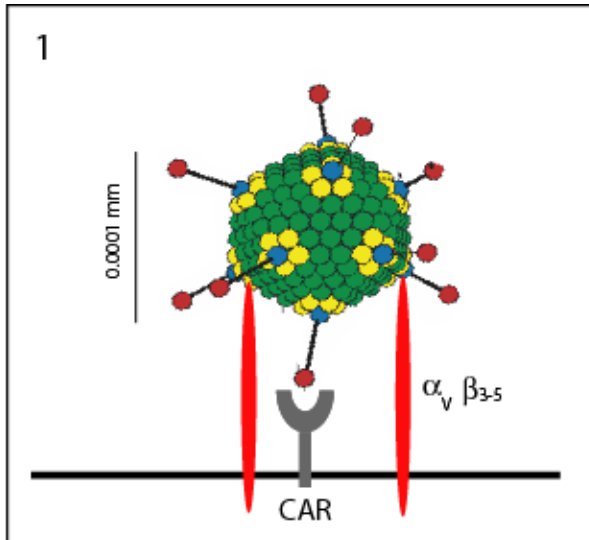
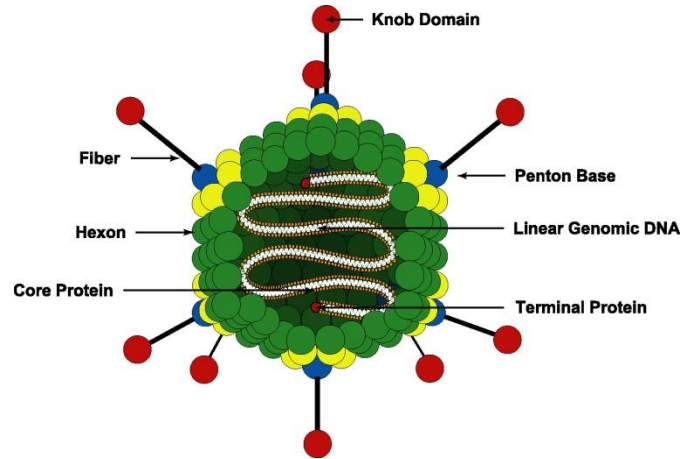


# Si sumamos un TSP a E1A mutado tenemos.....

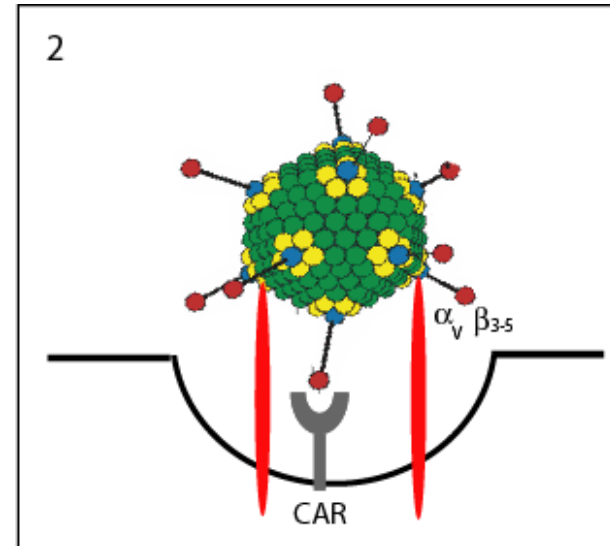


***Como mejorar la selectividad  
de los CRAds. II***

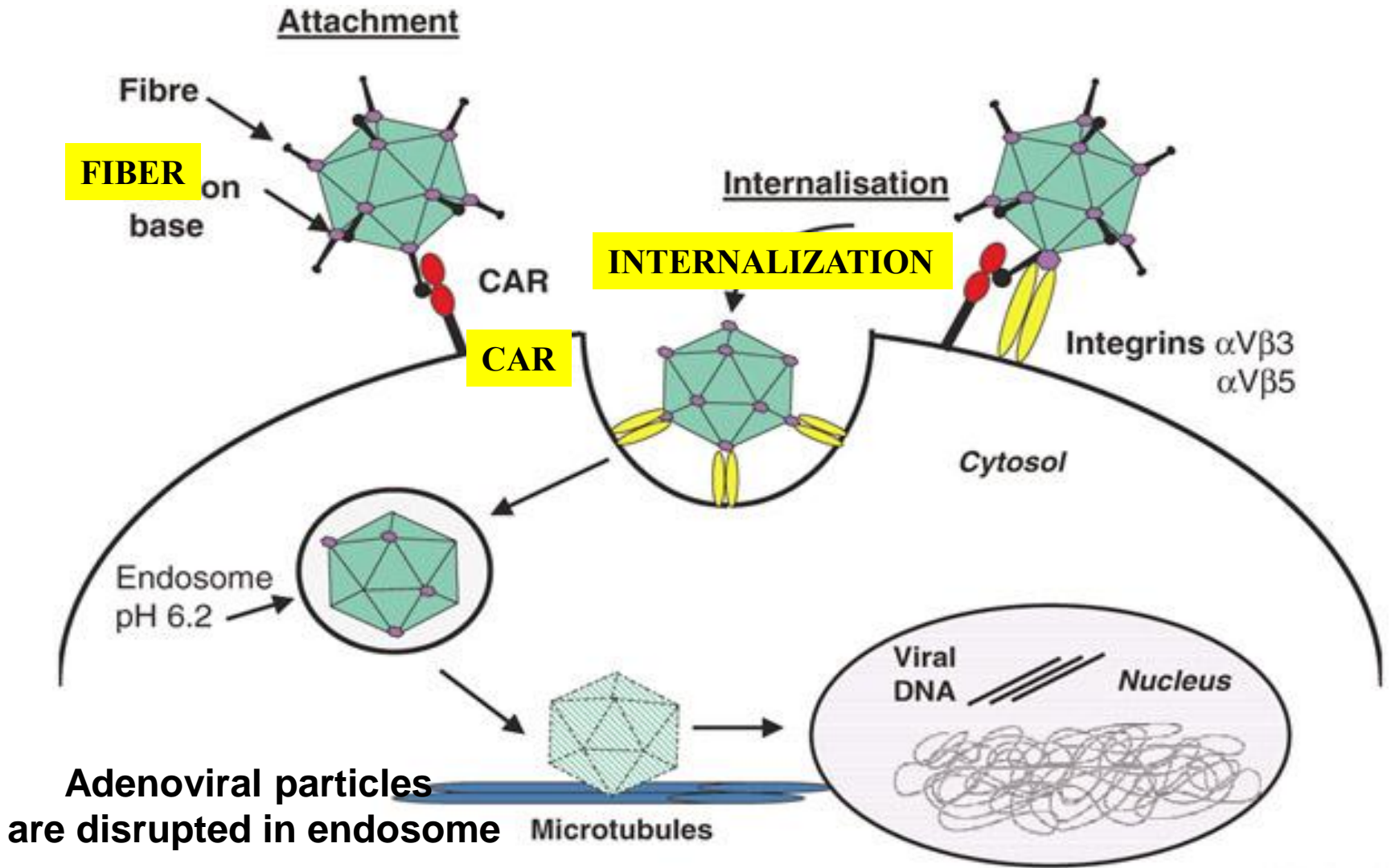
# Como infecta un adenovirus



**Primero interacciona el dominio Knob con el receptor de CAR**



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

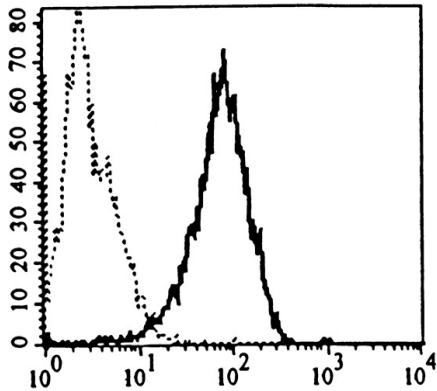


Arthritis Research

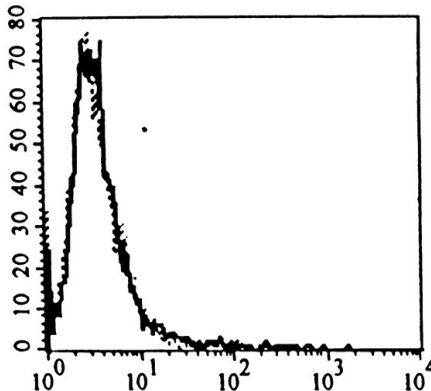
***Esto ocurre tanto en células normales como tumorales***

# *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*

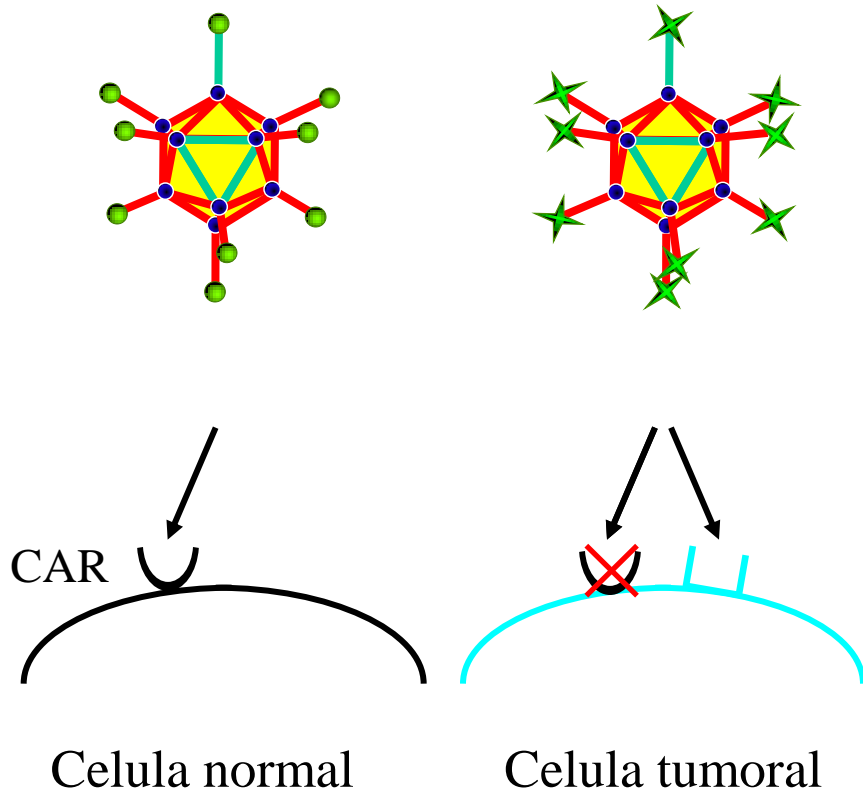
# ¿Qué tenemos que mejorar en los CRAAds?

## *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 través de otro receptor

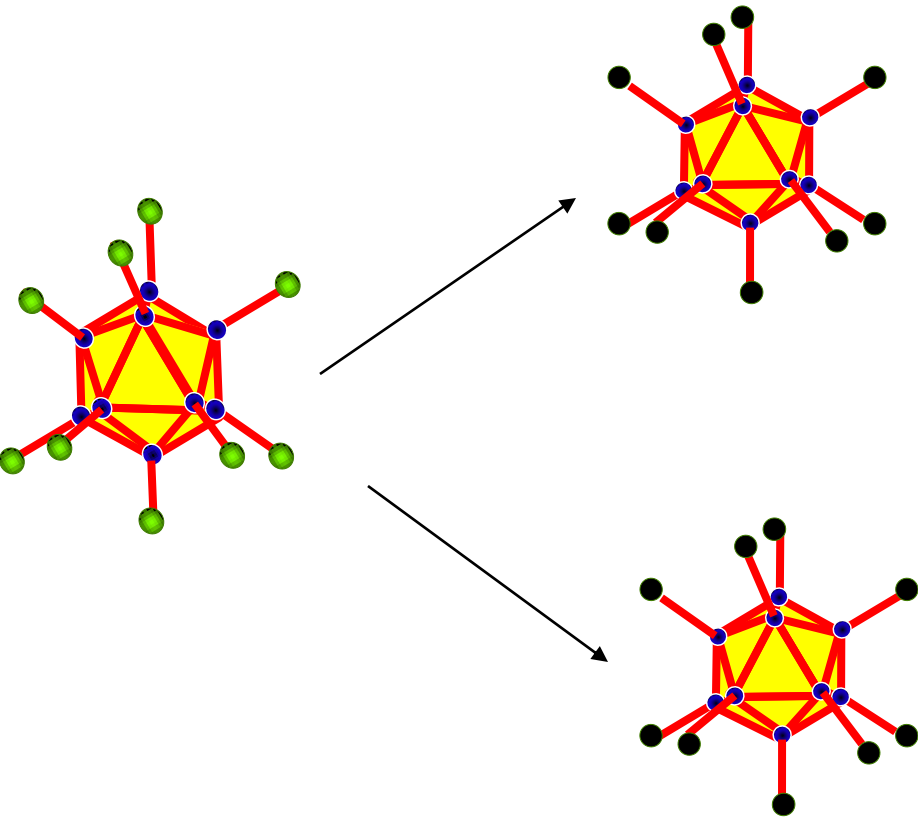
# Adenovirus

---

---

<b>Grupo</b>	<b>Serotipo</b>
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

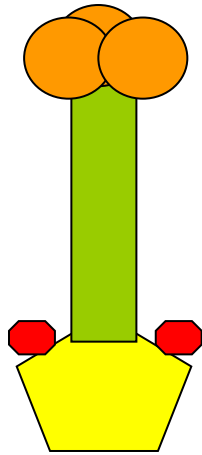


Fibra quimera 5/3

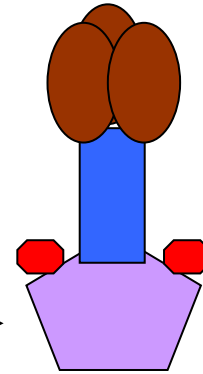
Motivo RGD, une integrinas

Motivo pk7, se une a los receptores con heparan sulfato

**Ad5**



**Ad35**



**Knob**



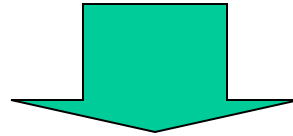
**Shaft**



**RGD**

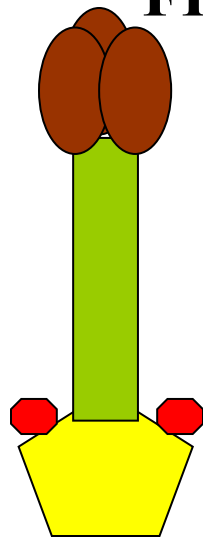


**Penton base**

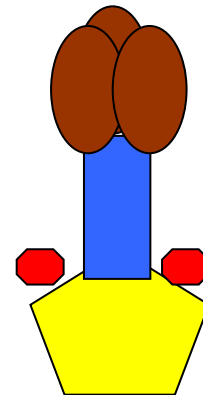


**FIBRAS QUIMERAS**

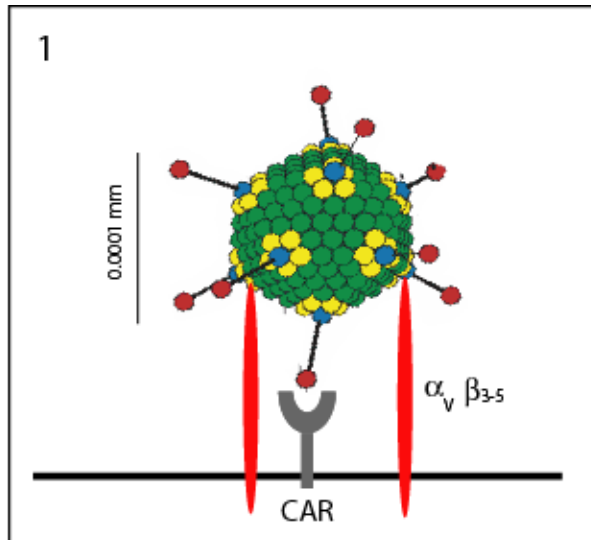
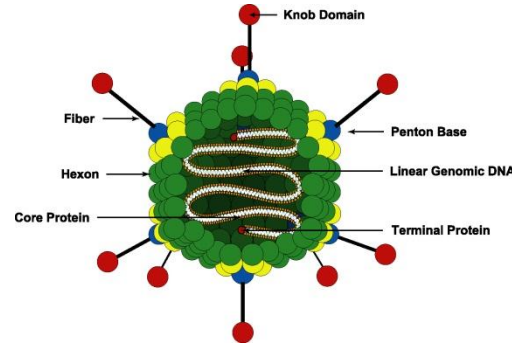
**Fibra Ad5/35  
Larga**



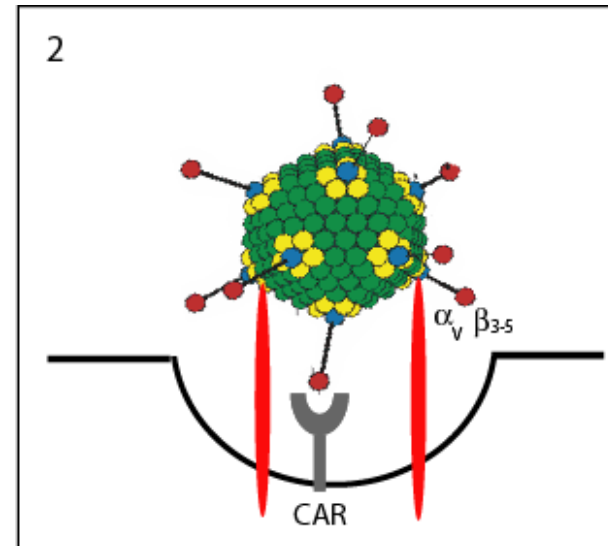
**Fibra Ad5/35  
Corta**



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



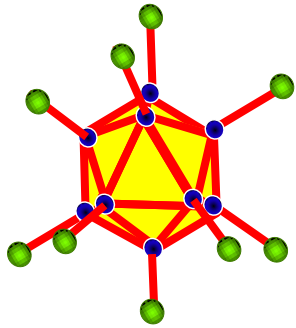
**Primero interacciona el dominio Knob con el receptor de CAR**



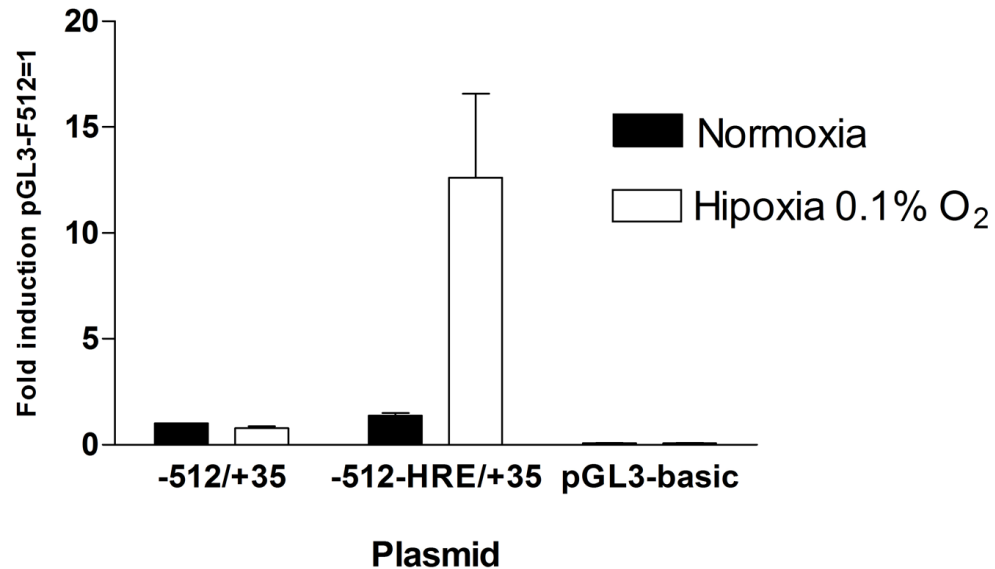
**Segundo intervienen los dominios RGD del penton base y se unen a integrinas**

***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

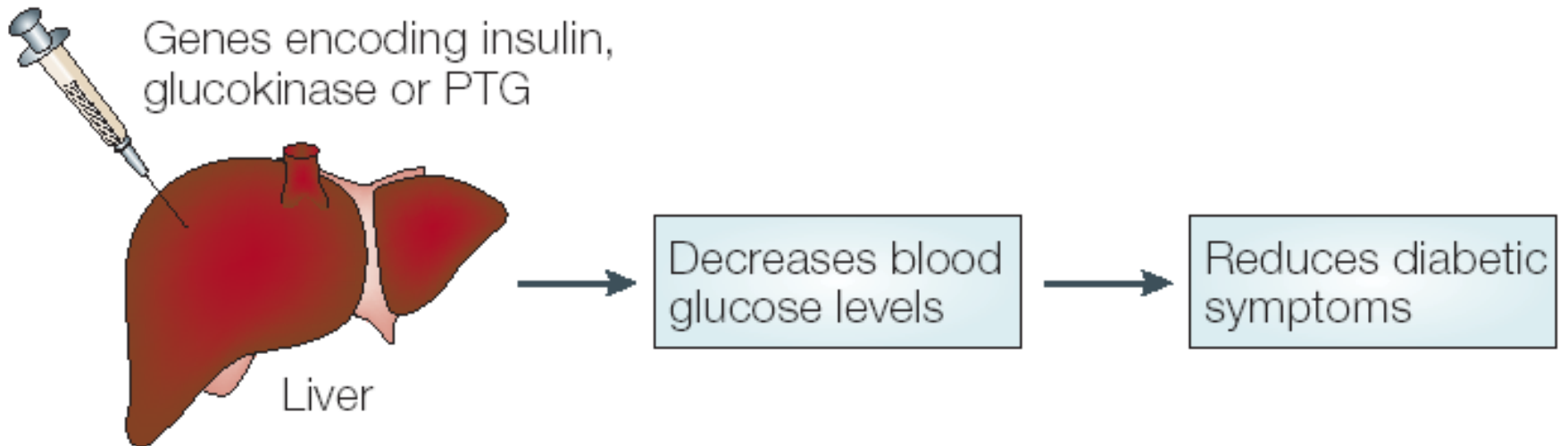
Existe un fuerte nivel de atenuación en células normales lo que les confiere a estos adenovirus una importante perspectiva clínica

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

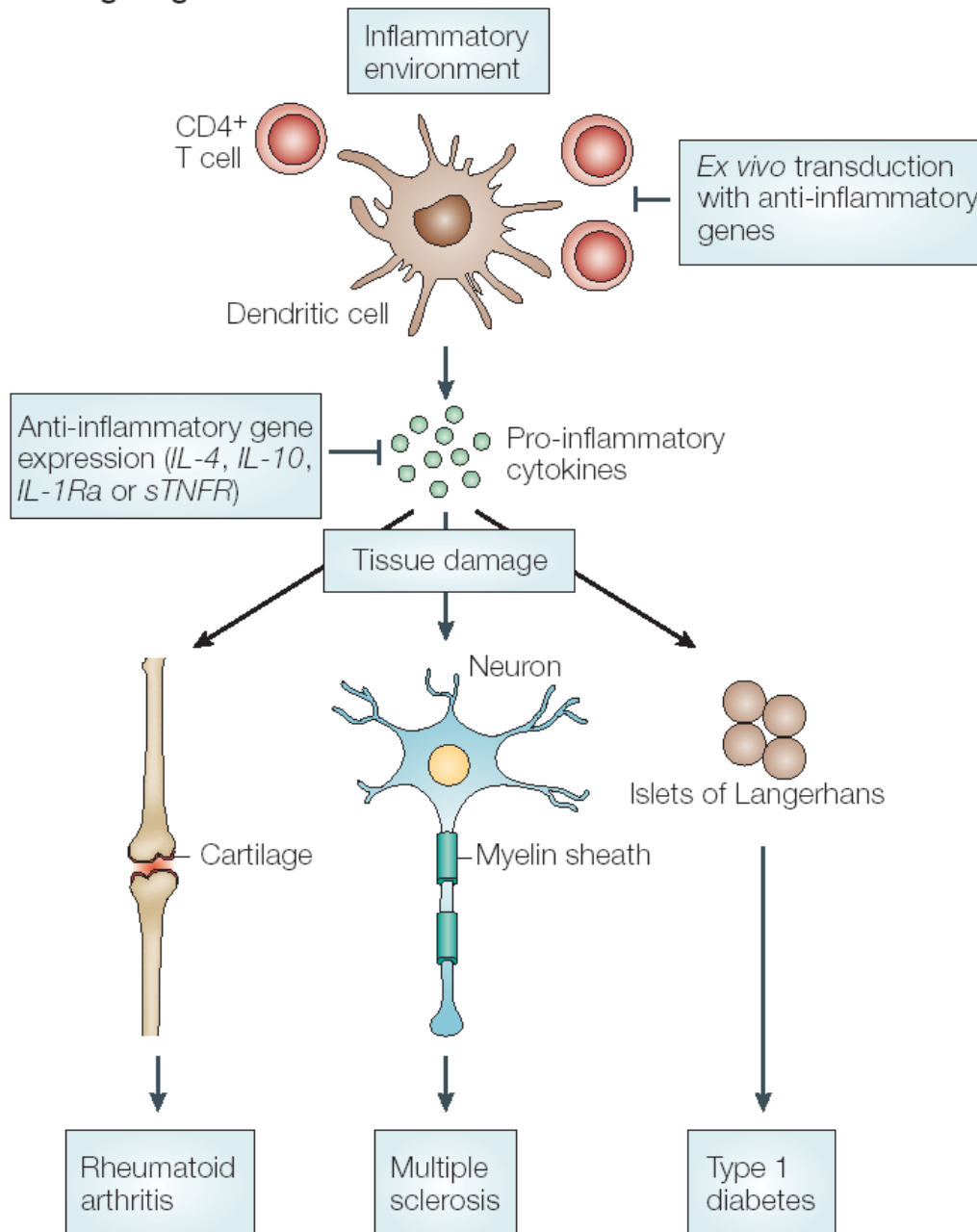


# **Molecular targets in autoimmune diseases.**

## a Reconstituting genes

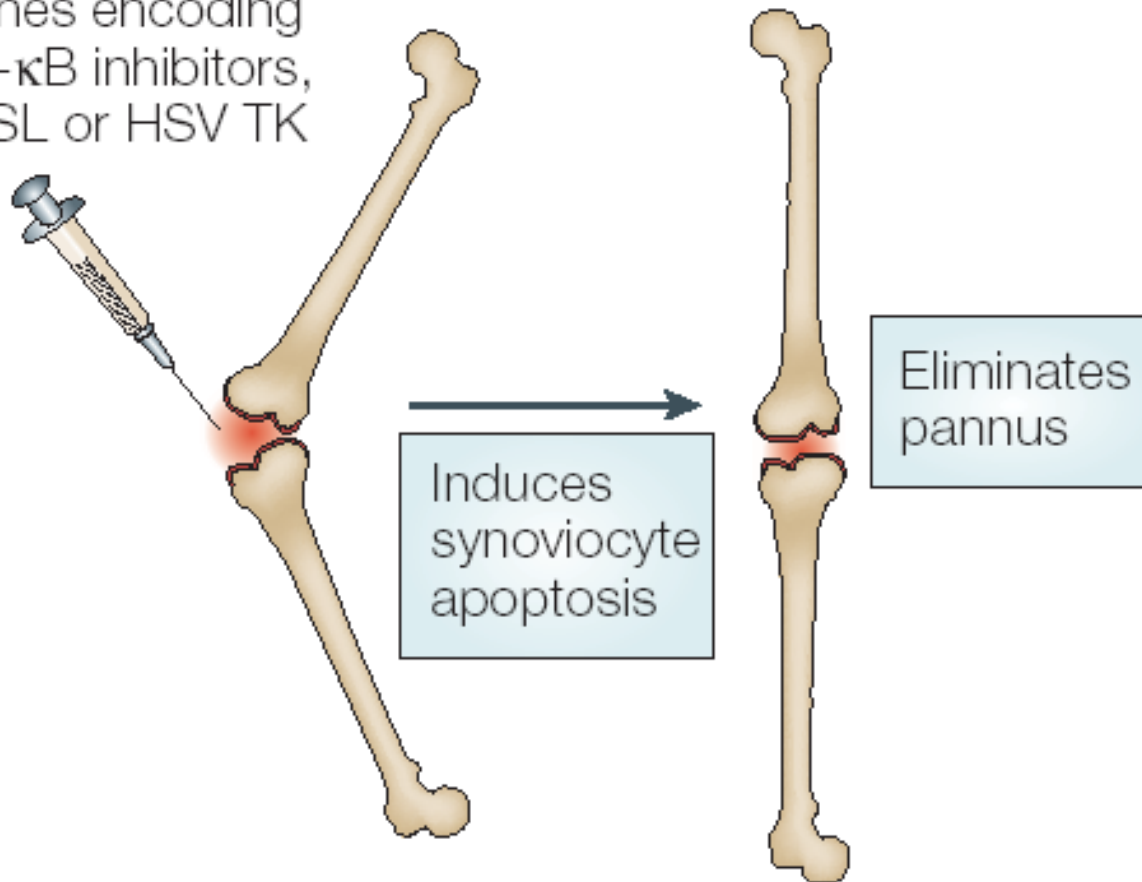


## b Targeting inflammation

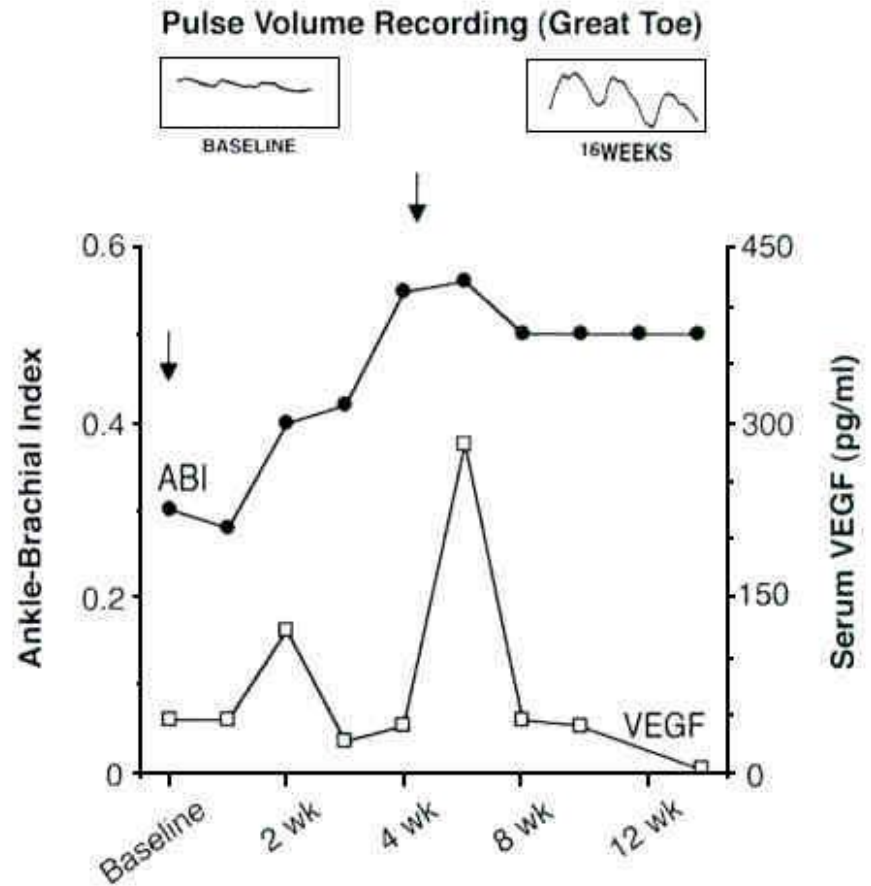


## **d Targeting associated pathologies**

Genes encoding  
NF- $\kappa$ 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

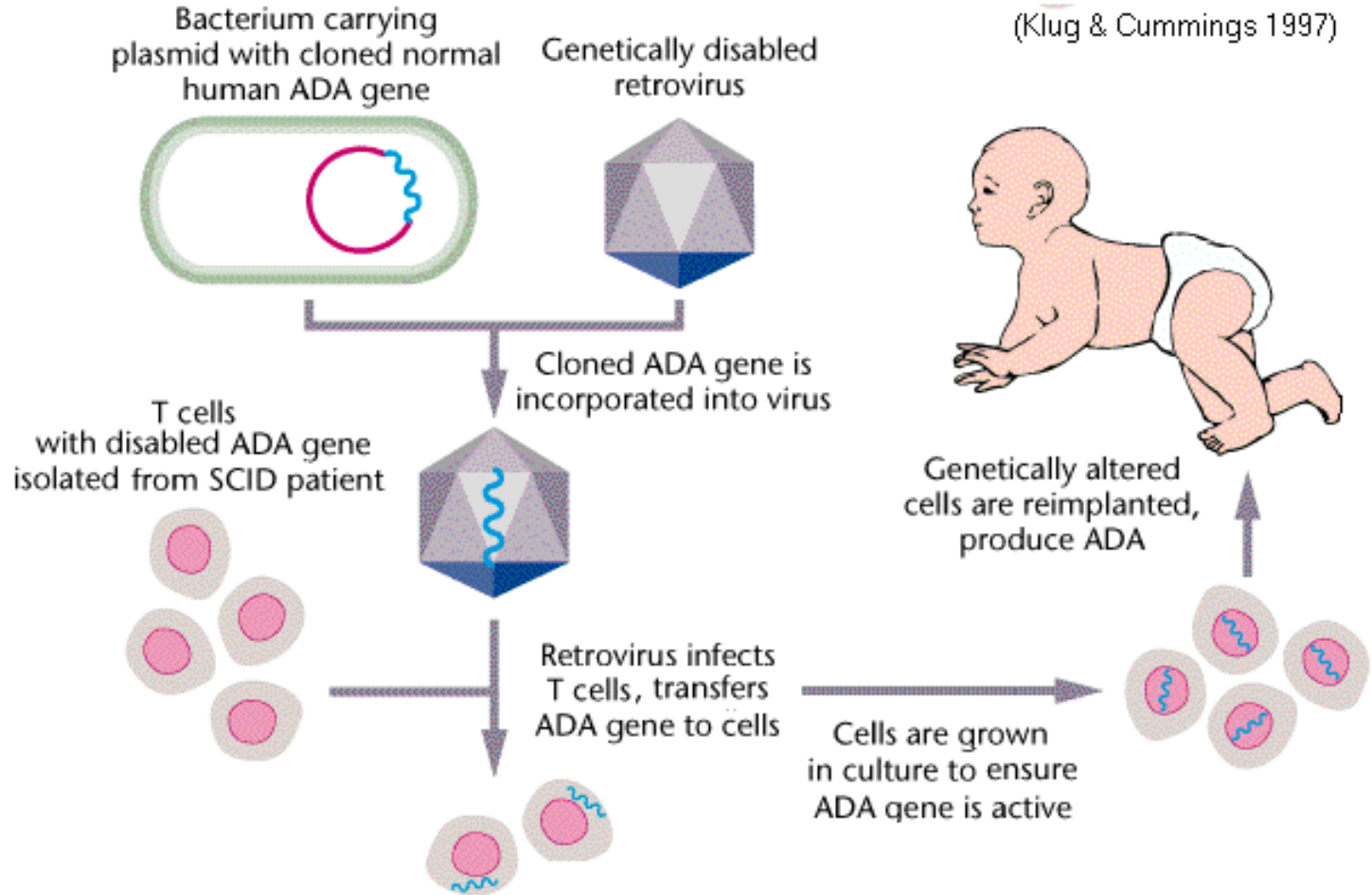
- **Mutated ADA**
  - **X-linked**
- **Mutated  $\gamma_c$  Receptor for cytokines**
- **~ 70 other forms of primary immunodeficiency**

## Treatments

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

# Gene Therapy for SCID

## diseases

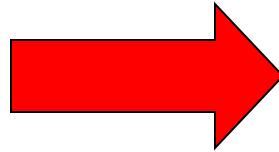




# 🌸 Major success of gene therapy



## 🌸 Gene Therapy



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



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)