

Administración y disposición de ADN y ARN en terapia génica



Tema 22

Índice de contenidos

- ❑ Definición y clasificación de la terapia génica
- ❑ Formas de administración de ADN: vectores virales y vectores no virales
- ❑ Proceso de captación celular y disposición intracelular
- ❑ Aplicaciones de la terapia génica
- ❑ RNA de interferencia

Terapia génica: concepto

Según la Agencia Europea de Medicamentos (EMA):

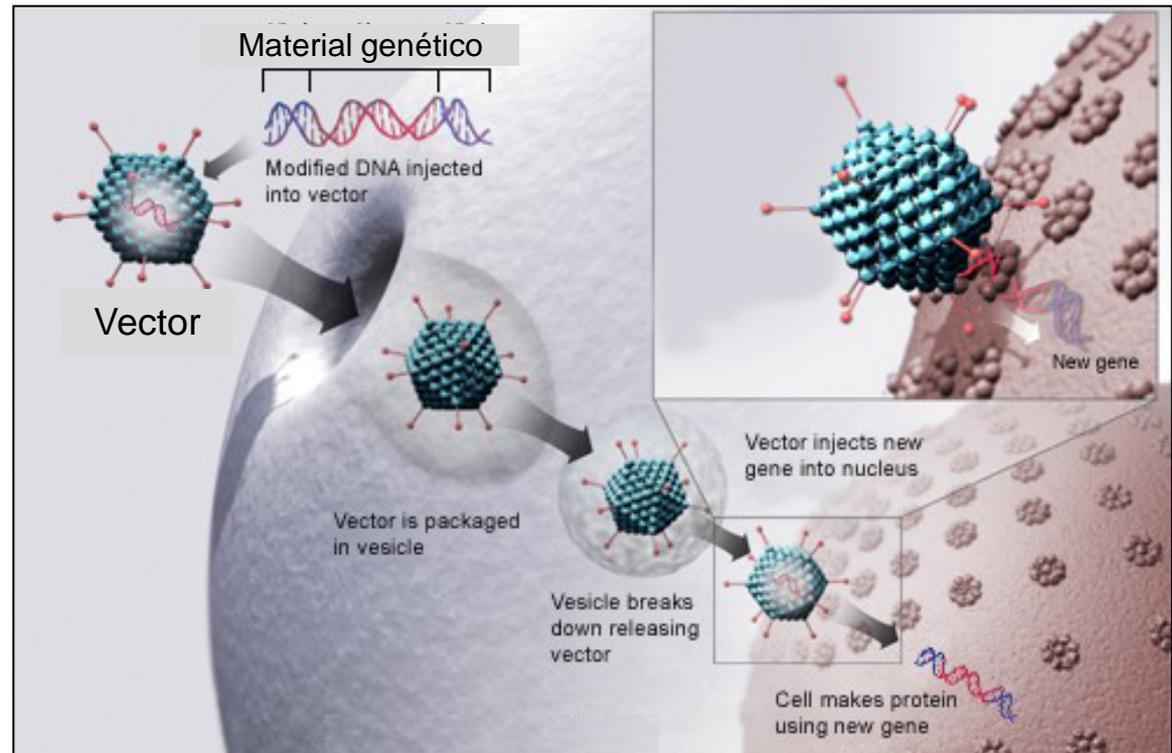
Terapias avanzadas:

1. Terapia génica
2. Terapia celular
3. Ingeniería de tejidos

- ❖ Principio activo: ácido nucleico o constituido por él
- ❖ Regular, reparar, sustituir, añadir o eliminar una secuencia génica
- ❖ Utilizado en seres humanos
- ❖ Efecto terapéutico: depende de la secuencia del ácido nucleico o del producto de la expresión génica de esa secuencia

Terapia génica: concepto

Conjunto de técnicas mediante las cuales se puede vehiculizar fragmentos de ADN o ARN al interior de células diana con el fin de modular la expresión de determinadas proteínas que se encuentran alteradas, revirtiendo así el trastorno biológico

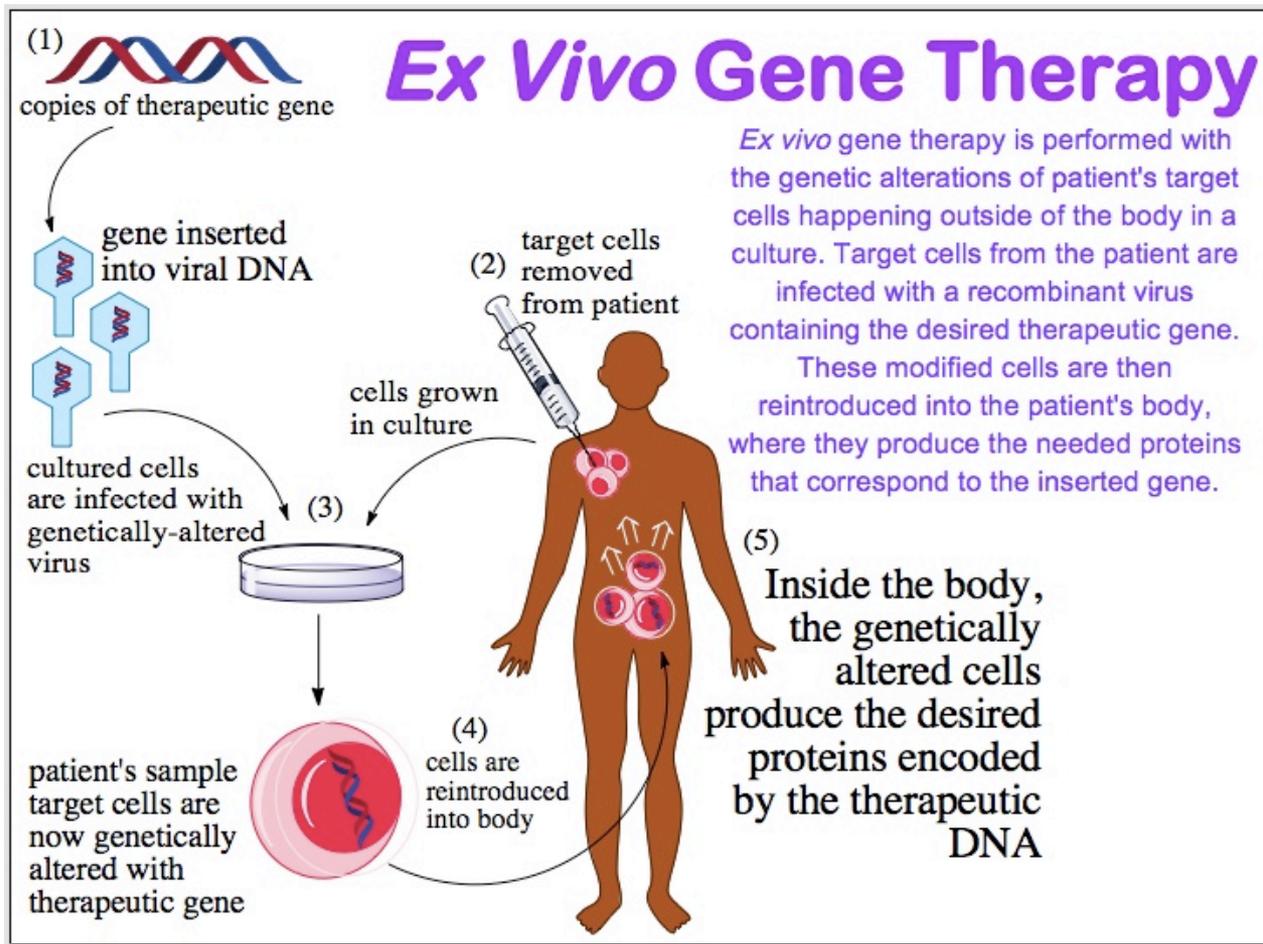


Adaptada de National Institutes of Health, publicada en Wikimedia Commons; Dominio público; http://en.wikipedia.org/wiki/Gene_therapy

Terapia génica: clasificación

- ❑ En función de la células a transfectar:
 - ❑ Terapia génica de células germinales
 - ❑ Terapia génica de células somáticas
- ❑ En función de la estrategia:
 - ❑ “Ex vivo”
 - ❑ “In vivo”

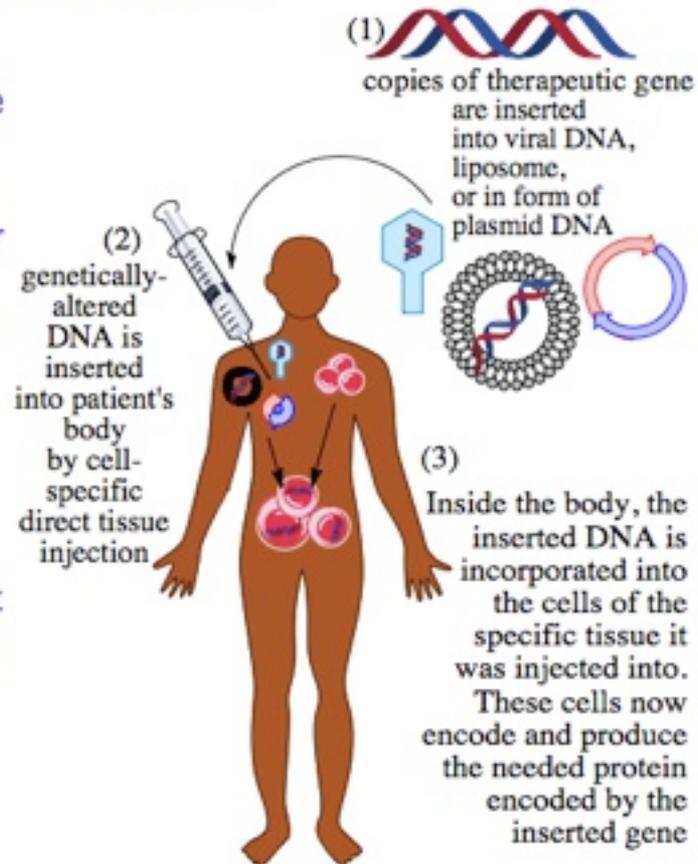
Terapia génica: clasificación



Terapia génica: clasificación

In Vivo Gene Therapy

In vivo gene therapy involves introduction of therapeutic DNA directly into the patient's body. The DNA is introduced by cell-specific direct injection into tissue in need. DNA in the form of a plasmid vector is introduced by a dermal vaccination. Modified liposomes are not currently used for gene therapy, but they will likely be the next advancement in therapeutic gene delivery as cell-specific receptor-mediated DNA carriers. Once inside the body and in contact with the specifically targeted cells, the inserted DNA is incorporated into the tissue's cells where it encodes the production of the needed protein.



Terapia génica: clasificación

“Ex vivo”

- Extracción y cultivo de las células del paciente
- Transfección “in vitro”
- Introducción de las células transfectadas al paciente

“In vivo”

- Introducción directa del material genético en las células del paciente sin tener que extraerlas

Terapia génica: clasificación

“Ex vivo”

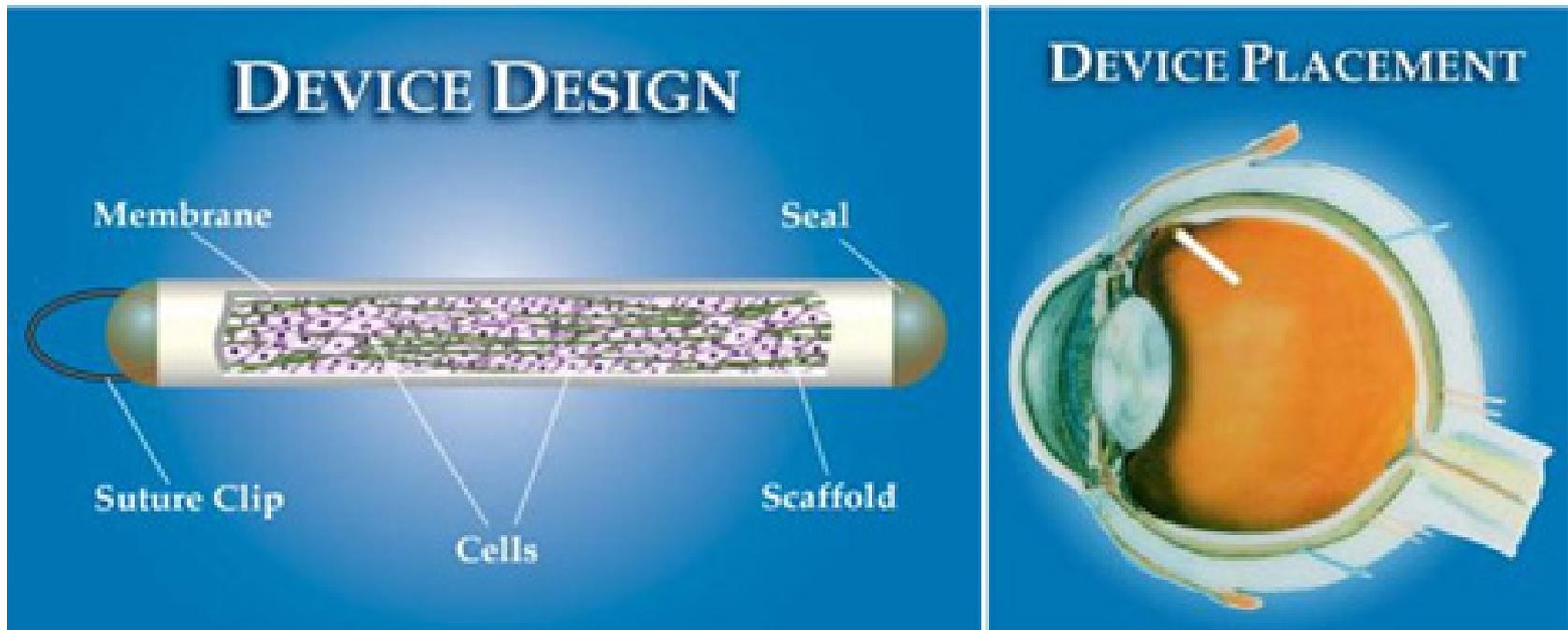
- Control sobre el proceso
- Selección de células
- Eficacia de transfección alta
- Alto coste
- Células que no crecen en cultivo

“In vivo”

- Sencillez
- Vías de administración habituales
- Menor control del proceso
- Menor eficacia de transfección
- Especificidad celular baja

Terapia génica: clasificación

Terapia génica “ex vivo”



X Liu et al. Can J Ophthalmol 2007;42: 447-454

Terapia génica: clasificación

Terapia génica “in vivo”

- ❑ Sistemas físicos
- ❑ Vectores virales
- ❑ Vectores químicos (vectores no virales)

- Proteger el material genético de la degradación enzimática
- Facilitar la internalización celular
- Liberar el ADN en el citoplasma celular

Terapia génica: clasificación

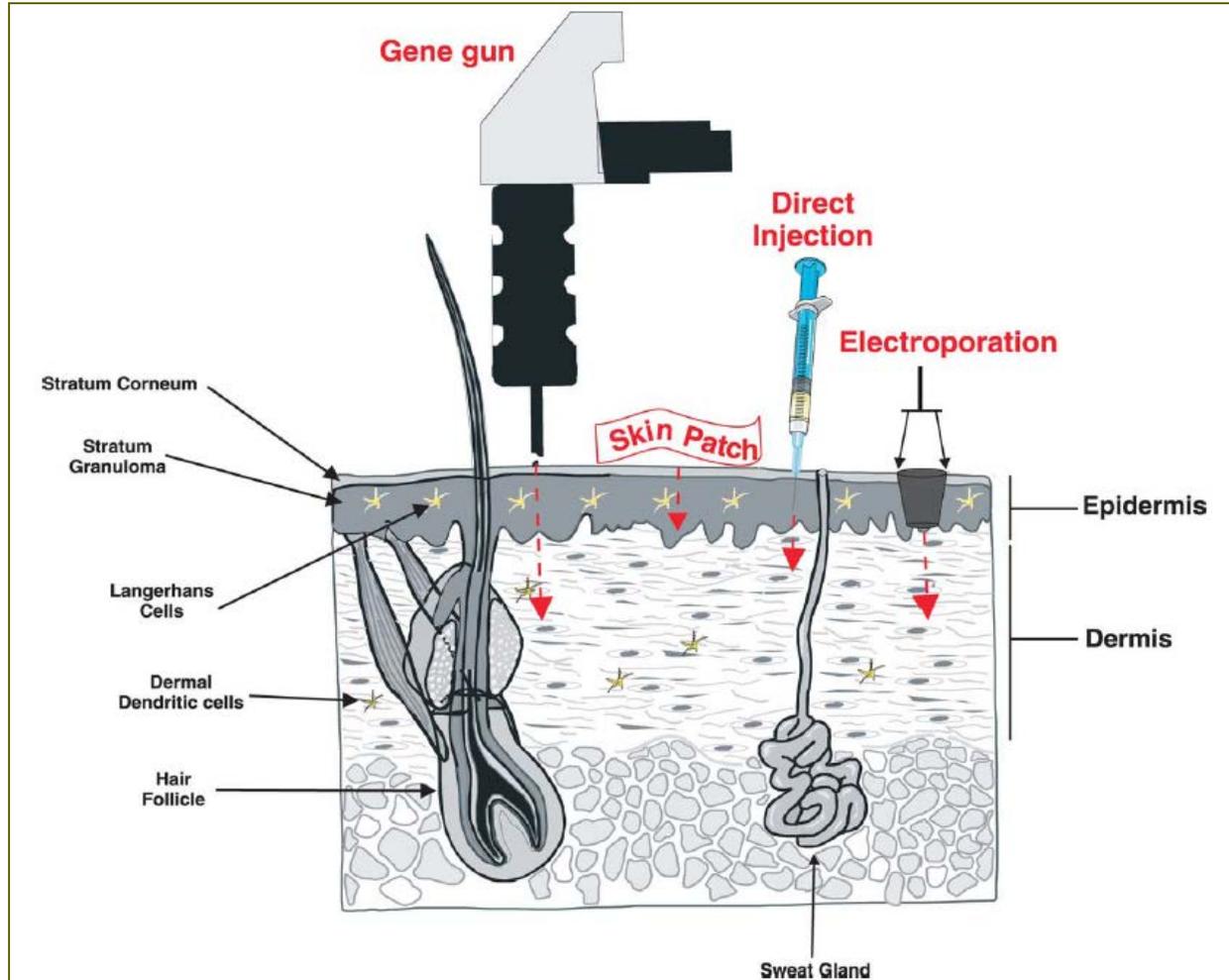
Terapia génica “in vivo”

Sistemas físicos

- Administración directa: músculo, hígado, piel, tumores
- Electroporación
- Sistemas de administración sin agujas (gene gun)

Terapia génica: clasificación

Terapia génica “in vivo”



Peachman KK, Rao M, Alving CR. Methods 2003;31:232-242

Terapia génica: clasificación

Terapia génica “in vivo”

Requisitos de un vector para terapia génica

- ❑ Específico para la célula
- ❑ Transfección eficaz
- ❑ No tóxico
- ❑ No mutagénico
- ❑ No inmunogénico
- ❑ Producción sencilla y a bajo coste

Formas de administración de ADN: Vectores virales

Ventajas:

- Alta eficiencia de transfección

Inconvenientes:

- Inmunogenicidad debida a las proteínas víricas
- Potencial oncogénico debido a la inducción de mutagénesis
- Limitado tamaño del ADN que son capaces de transportar

Formas de administración de ADN: Vectores virales

TABLE 1. Characteristics of vector systems currently in human trials

Vector	Advantages	Disadvantages	Number of US clinical trials	Examples of disease applications
Gamma-retrovirus	High efficiency integration	Insertional mutagenesis with secondary malignancy	>600	ADA-SCID, X-SCID, CGD, familial hyperlipidemia, tumor vaccine
Lentivirus	Stable gene transfer Non-dividing cells	Requires cell division Insertional mutagenesis with secondary malignancy	6	HIV, MPS-type VII
Adenovirus	Stable gene transfer Non-dividing cells	Risk of replication competent HIV Innate immunity	194	CF, ornithine transcarbamylase deficiency, mesothelioma, colon cancer
Adeno-associated virus	High efficiency Non-dividing cells	Transient gene transfer Small packaging limit	32	CF, hemophilia B, Leber congenital amaurosis, Canavan disease, AAT deficiency
Herpesvirus	Minimal innate response Stable gene transfer Non-dividing cells	Adaptive immune response to capsid Potential for innate and adaptive immunity	13	Brain tumors, colon cancer, intractable pain
Non-viral	High efficiency Non-dividing cells Large packaging capacity	Innate immunity Transient gene transfer	156	CF, DNA vaccines, metastatic cancer

Note that the number of US clinical trials is based on all trials listed by the NIH Office of Biotechnology Activities (OBA) GEMCRIS website. Some of those trials may not yet have been initiated, but all have been IRB-approved and reviewed by OBA and/or the Recombinant DNA Advisory Committee (RAC).

TR Flotte. J Cell Physiol 2007;213:301-305

Formas de administración de ADN: Vectores virales

Vectores utilizados en ensayos clínicos de terapia génica

- ❑ Adenovirus
- ❑ Virus adenoasociados
- ❑ Retrovirus
- ❑ Lentivirus
- ❑ Poxvirus
- ❑ Herpes simplex
- ❑ Lipofección
- ❑ AND desnudo

Formas de administración de ADN: Vectores no virales

Ventajas:

- Mayor seguridad
- Facilidad de producción a gran escala
- Capacidad de transportar moléculas de ADN de gran tamaño

Inconvenientes:

- Baja eficiencia de transfección

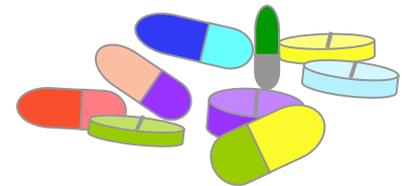
Formas de administración de ADN: Vectores no virales

Compuesto activo
(ácido nucleico)



Formulación
(Drug Delivery)

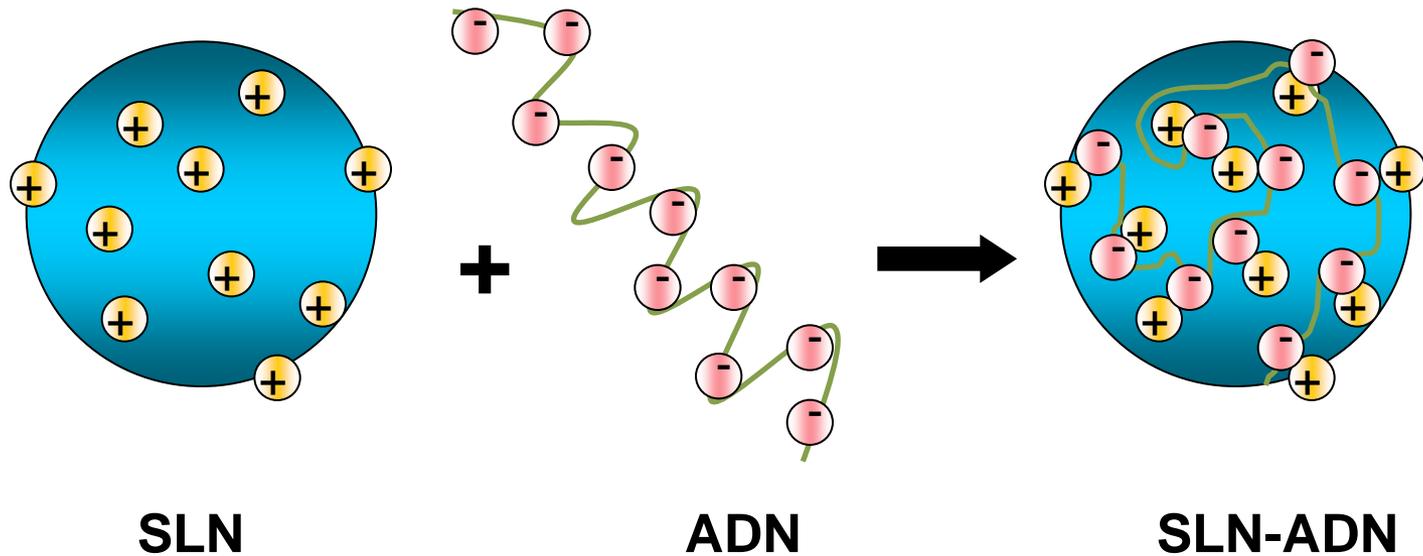
MEDICAMENTO



Formas de administración de ADN: Vectores no virales

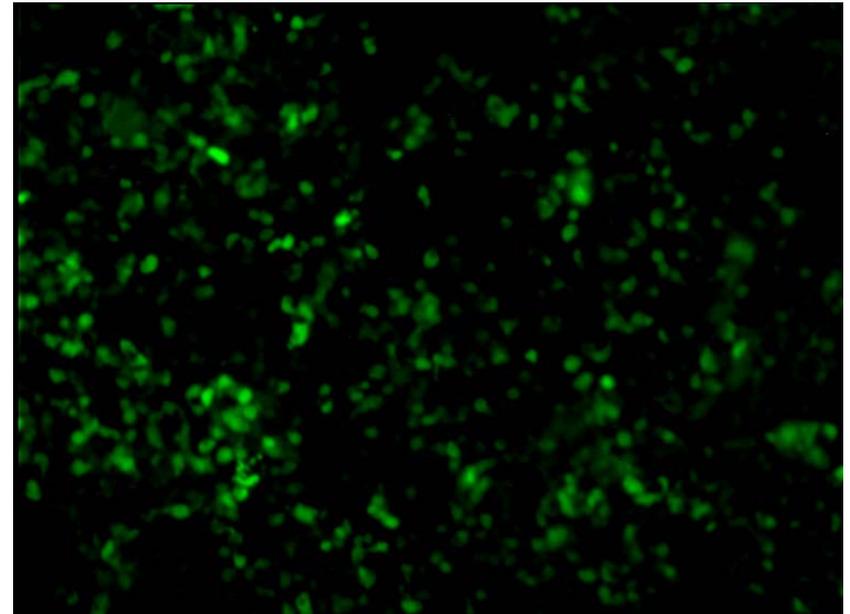
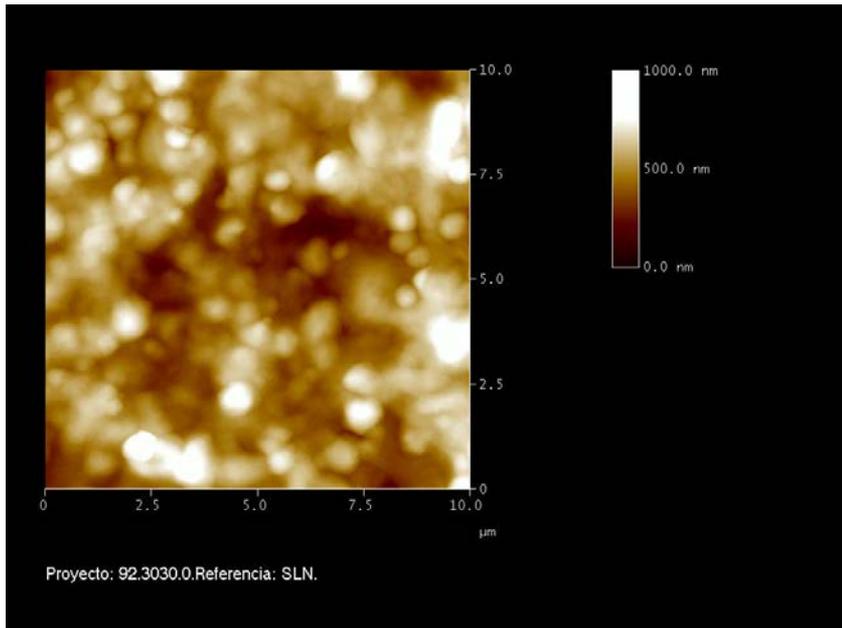
- ❑ Polímeros: PEI, quitosanos, poli-L-lisina
- ❑ Péptidos
- ❑ Lípidos:
 - Liposomas
 - Nanopartículas sólidas lipídicas

Sistemas no virales

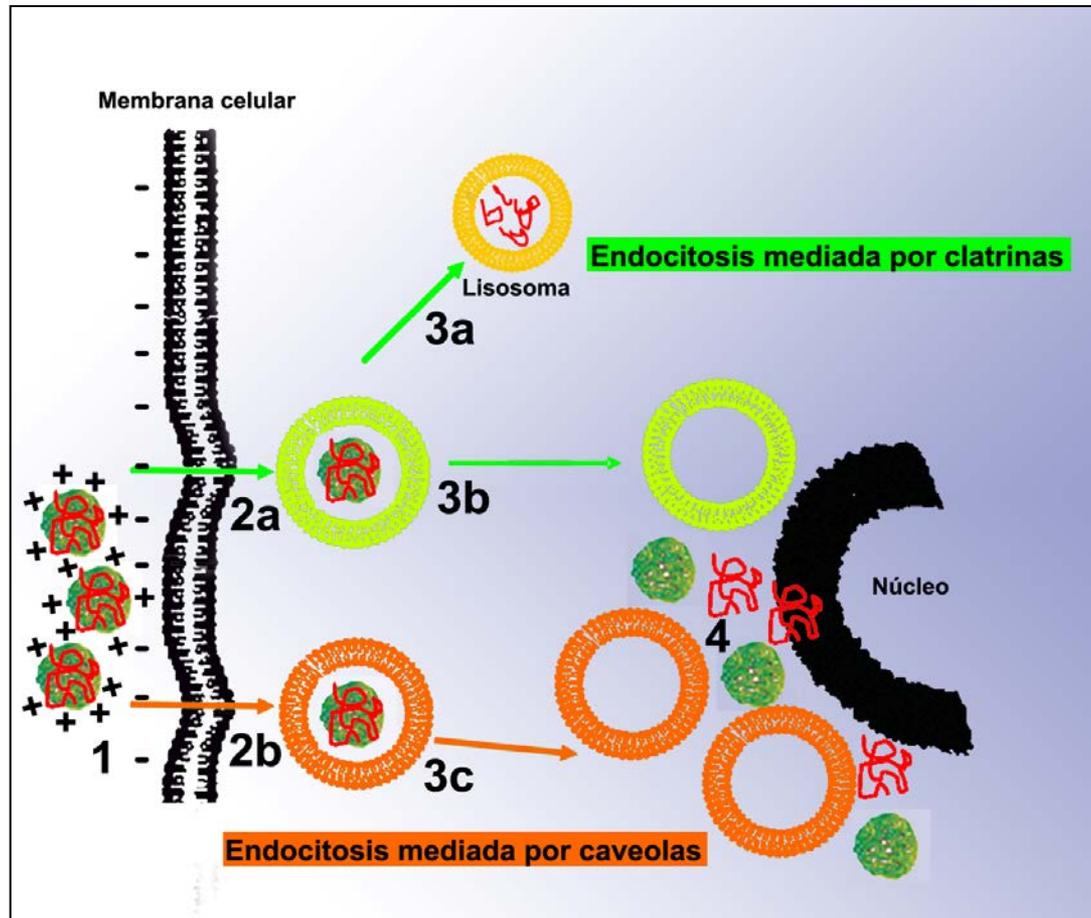


Sistemas no virales

Transfección de células HEK-293 con nanopartículas lipídicas que contienen el plásmido GFP (proteína verde fluorescente)



Proceso de captación celular y disposición intracelular



Adaptado de Del Pozo A, Delgado D, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. *Int J Pharmaceut* 2008;360:177-183

Proceso de captación celular y disposición intracelular

- Formas de mejorar la eficacia de transfección:
 - Incrementar la endocitosis (quitosano, péptidos de penetración celular)
 - Favorecer el escape endosomal (colesterol)
 - Favorecer la entrada en el núcleo (péptidos con secuencias de señalización nuclear)

Aplicaciones de la terapia génica

- Enfermedades monogénicas:
 - Inmunodeficiencia severa combinada
 - Hemofilia
 - Fibrosis quística
 - Distrofia muscular de Duchenne
 - Enfermedad de de Fabry

- Enfermedades poligénicas:
 - VIH
 - Cáncer
 - Enfermedades cardiovasculares

Aplicaciones de la terapia génica

Indicaciones de los ensayos clínicos en terapia génica

- ❑ Cáncer (mayoría)
- ❑ Enfermedades cardiovasculares
- ❑ Enfermedades infecciosas
- ❑ Enfermedades monogénicas
- ❑ Enfermedades oculares

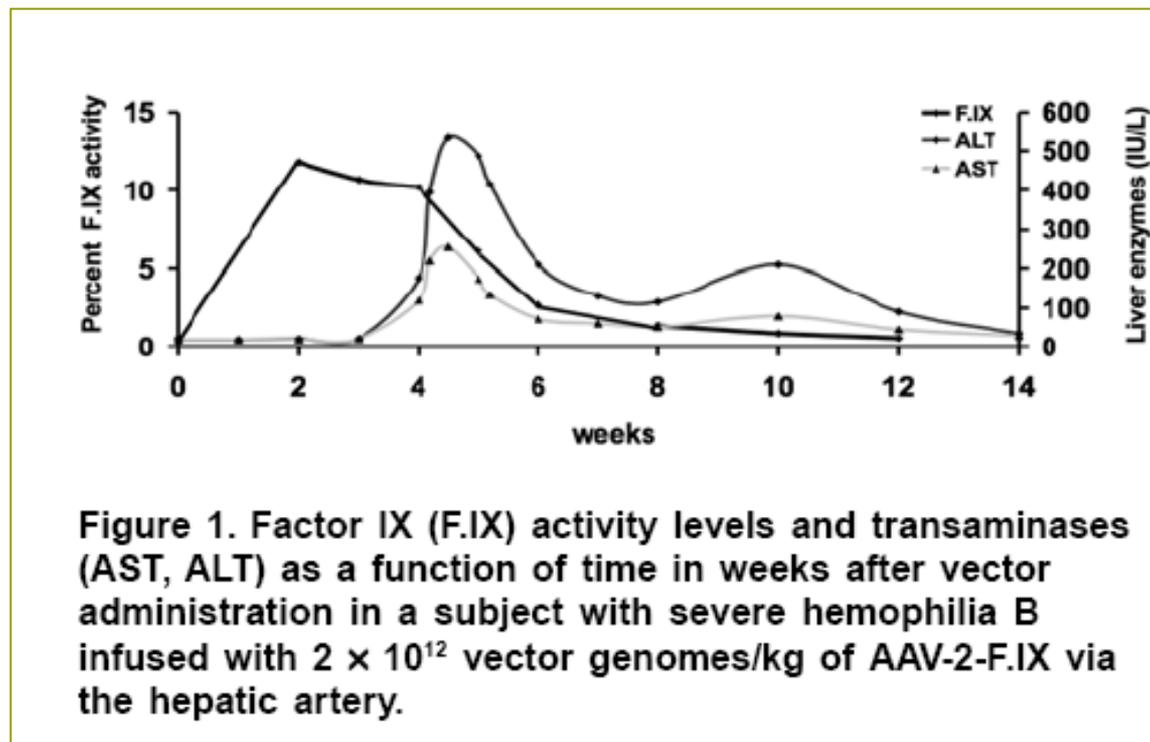
Aplicaciones de la terapia génica

Tipos de genes utilizados en ensayos clínicos de terapia génica

- ❑ Antígenos
- ❑ Citoquinas
- ❑ Factores supresores de tumores
- ❑ Genes suicidas
- ❑ Factores de crecimiento
- ❑ Receptores

Hemofilia

- ❑ Hemofilia A: Déficit del factor VIII de la coagulación
- ❑ Hemofilia B: Déficit del factor IX de la coagulación



Inmunodeficiencia severa combinada

- ❑ Deficiencia en la enzima adenosina desaminasa (ADA-SCID)
- ❑ Deficiencia en “cytokine receptor common gamma chain” (γ_c) (SCID-X1)

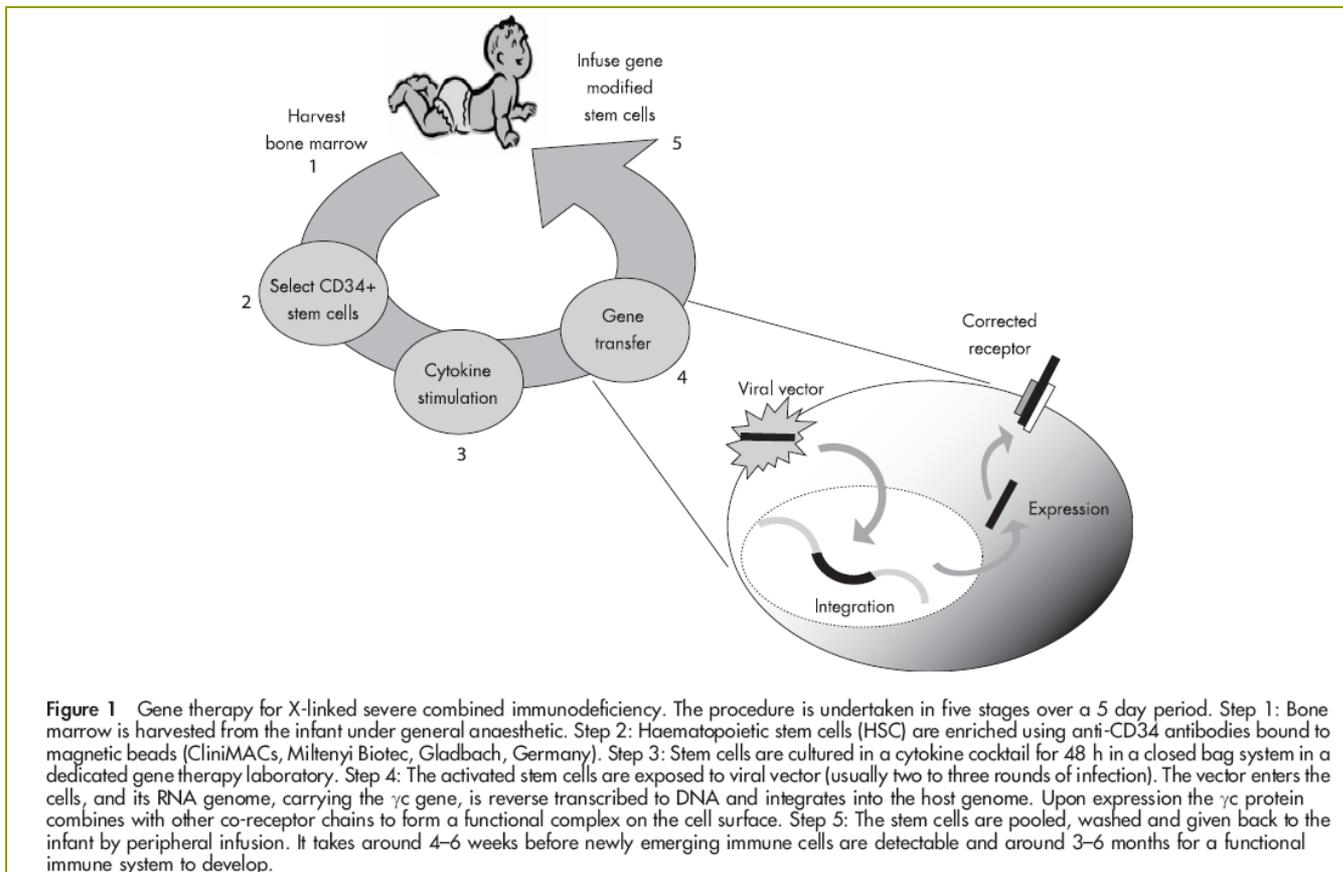


Figure 1 Gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. The procedure is undertaken in five stages over a 5 day period. Step 1: Bone marrow is harvested from the infant under general anaesthetic. Step 2: Haematopoietic stem cells (HSC) are enriched using anti-CD34 antibodies bound to magnetic beads (CliniMACs, Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany). Step 3: Stem cells are cultured in a cytokine cocktail for 48 h in a closed bag system in a dedicated gene therapy laboratory. Step 4: The activated stem cells are exposed to viral vector (usually two to three rounds of infection). The vector enters the cells, and its RNA genome, carrying the γ_c gene, is reverse transcribed to DNA and integrates into the host genome. Upon expression the γ_c protein combines with other co-receptor chains to form a functional complex on the cell surface. Step 5: The stem cells are pooled, washed and given back to the infant by peripheral infusion. It takes around 4–6 weeks before newly emerging immune cells are detectable and around 3–6 months for a functional immune system to develop.

Enfermedades cardiovasculares

- ❑ Inducción del efecto cardioprotector:
 - ❑ factor de crecimiento de hepatocitos
- ❑ Normalización de la contractilidad cardiaca:
 - ❑ IGF-1 (factor de crecimiento de insulina)
 - ❑ Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA2)
 - ❑ Proteína fijadora del calcio: S100A1

Cáncer

- ❑ Aumentando la actividad antitumoral de células inmunes: IL-12
- ❑ Aumentando la inmunogenicidad del tumor con antígenos tumorales activos
- ❑ Administración de antioncogenes (terapia antisentido)
- ❑ Introducción de genes que codifican factores supresores de tumores: p53
- ❑ Factores antiangiogénicos
- ❑ Genes suicidas (timidin kinasa/ganciclovir)

Cáncer

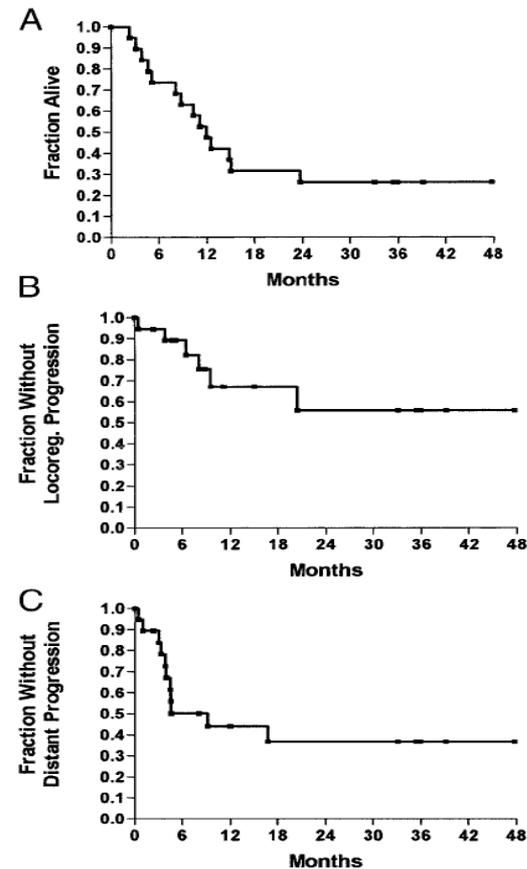
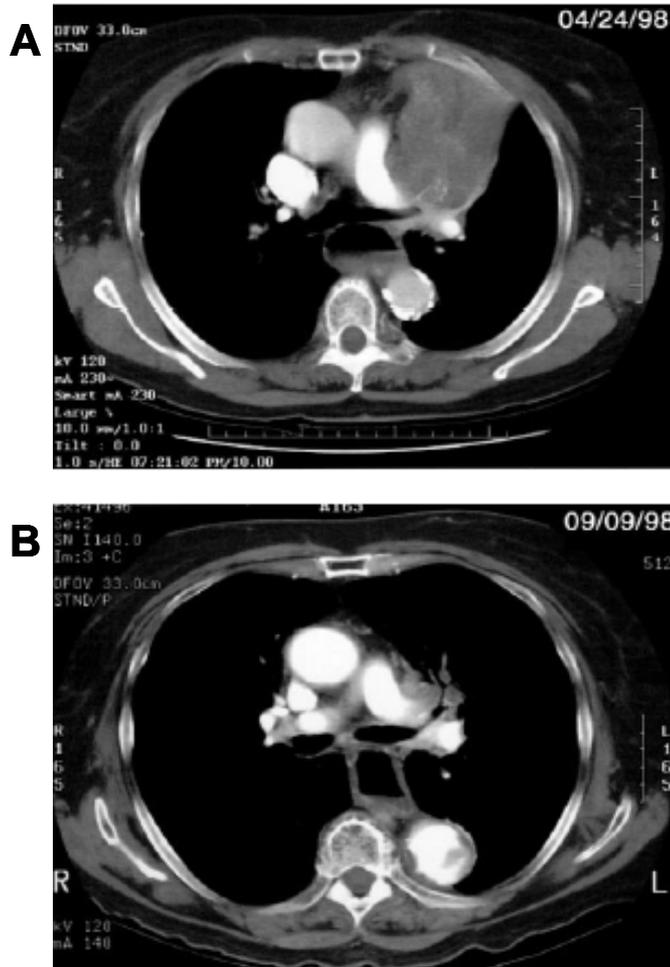


Fig. 2 A, overall survival of all patients ($n = 19$) entered on trial with Ad-p53 (INGN 201) and radiation therapy. B, locoregional time to progression of all patients ($n = 19$) entered on trial with Ad-p53 (INGN 201) and radiation therapy. C, metastatic time to progression of all patients ($n = 19$) entered on trial with Ad-p53 (INGN 201) and radiation therapy.

Evolución del cáncer pulmonar en un paciente al que se trató con adenovirus con el gen de la proteína p53 y con radioterapia. Imagen A: antes del tratamiento. Imagen B: tres meses después de finalizar el tratamiento

Terapia ocular

Albinismo: alteración en el gen OA1



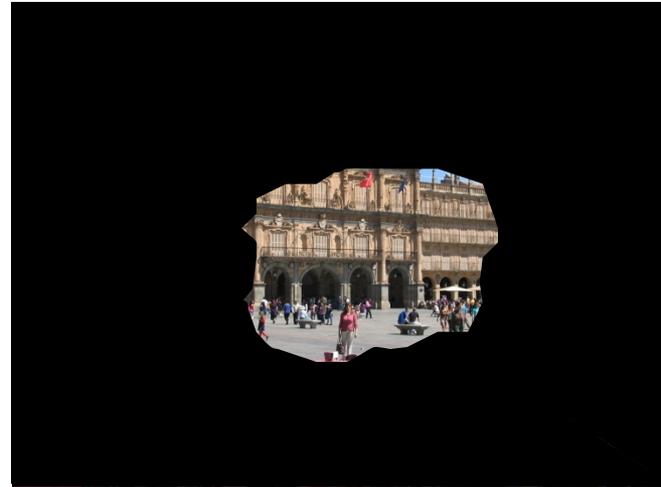
Ojos de una persona con albinismo

Gronskov K, Ek J, Bronum-Nielsen K. Orphanet J Rare Dis 2007;2:43

Amaurosis congénica de Leber: alteración en el gen RPE65

Terapia ocular

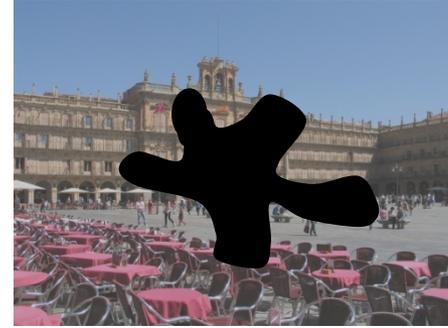
Retinosis pigmentaria: alteración en el gen RPE65



Visión de un paciente con retinosis pigmentaria

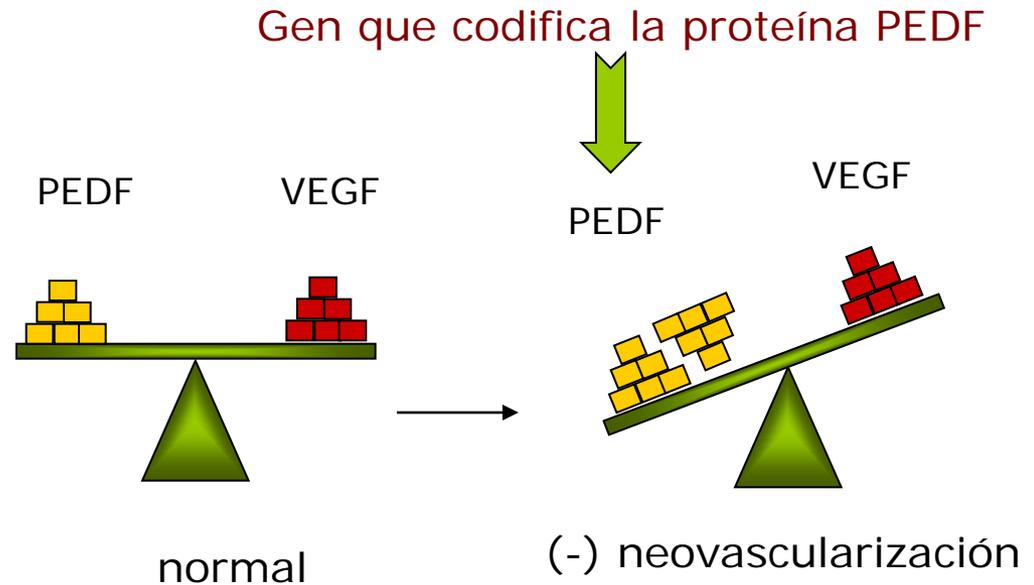
Terapia ocular

Degeneración Macular Asociada a la Edad



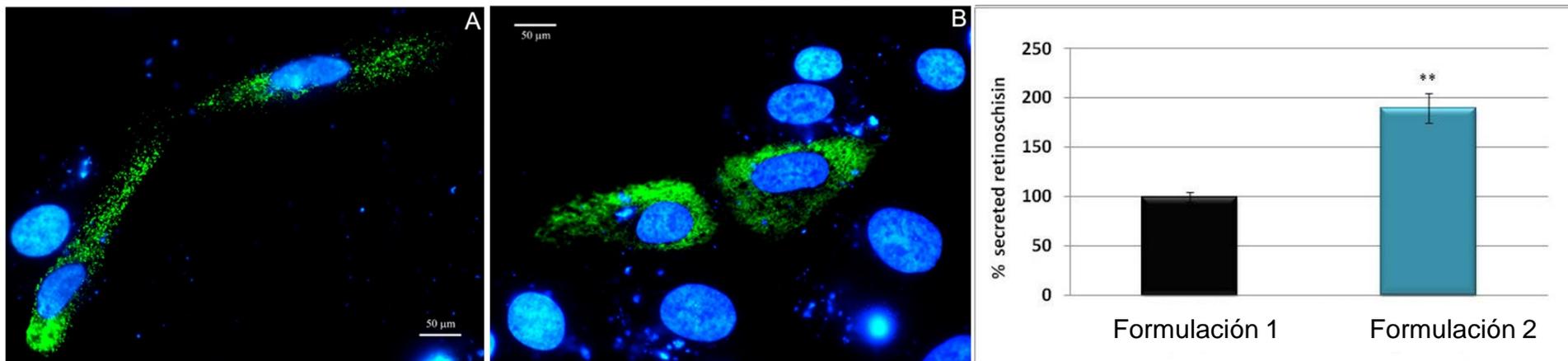
Evolución de la visión de un paciente con esta enfermedad

- Administración de genes que codifican proteínas antiangiogénicas (que inhiben la formación de nuevos vasos sanguíneos)
- Bloqueo de genes que codifican proteínas angiogénicas



Terapia ocular

Retinosquisis Juvenil Ligada al cromosoma X: deficiencia en el gen RS1, lo que provoca una deficiencia en la proteína retinosquisisina



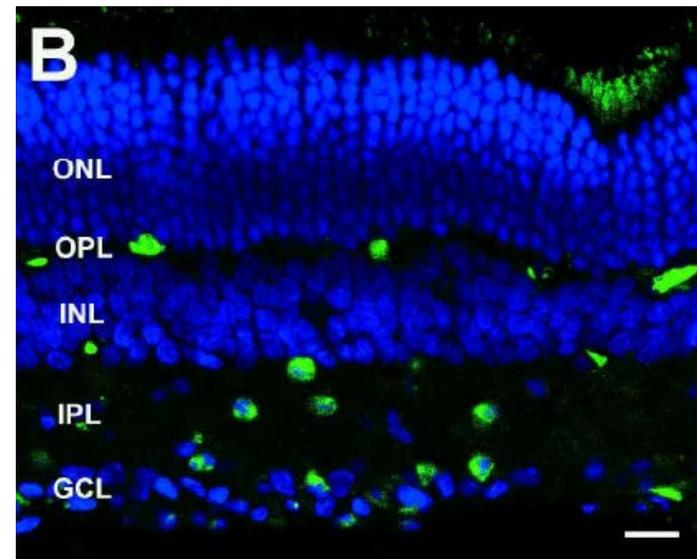
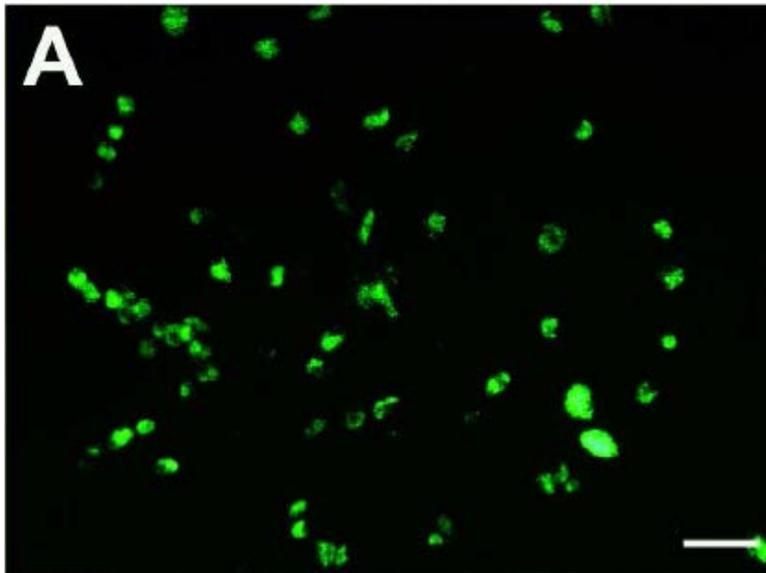
Expresión de retinosquisisina en células ARPE19 transfectadas con dos formulaciones (F1 y F2) basadas en nanopartículas lipídicas.

Verde: retinosquisisina

Azul: núcleos celulares y gen RS1 (gen que expresa la retinosquisisina)

Terapia ocular

▣ Administración intravítrea



Expresión de proteína verde fluorescente en la retina 72 h después de la administración intravítrea del vector.

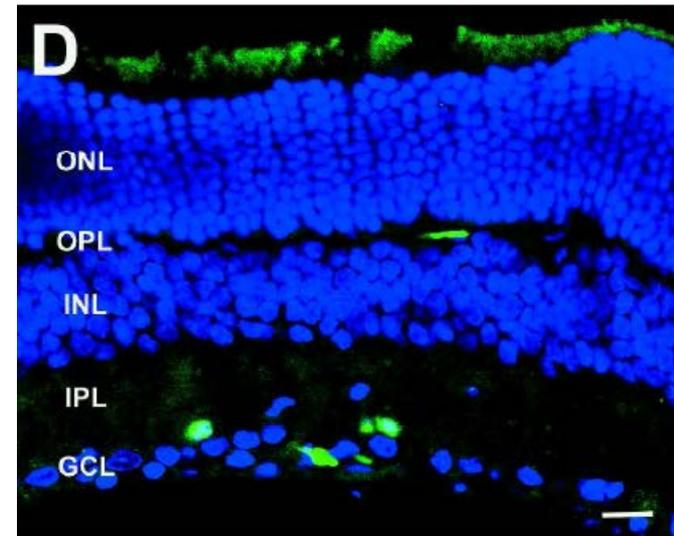
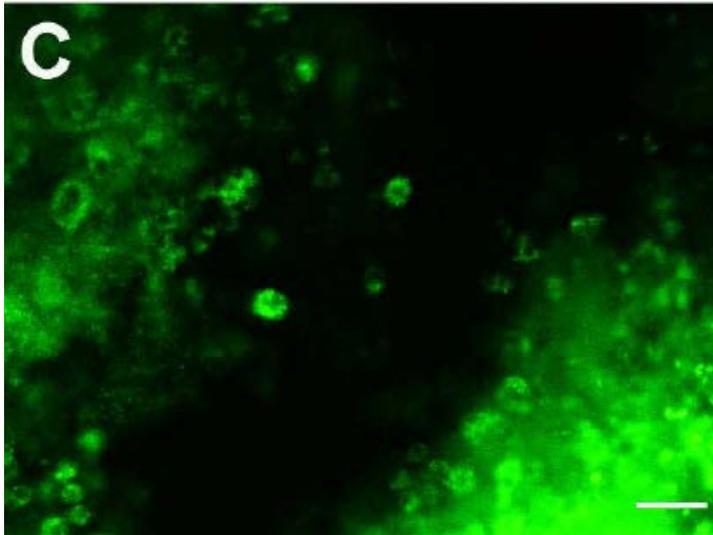
Se transfectan mayoritariamente células ganglionares.

En azul: núcleos.

D Delgado, A del Pozo-Rodríguez, MA Solinís, M Avilés-Trigueros, BHF Weber, E Fernández, AR Gascón. Hum Gene Ther 2012;23:343-355

Terapia ocular

□ Administración subretiniana



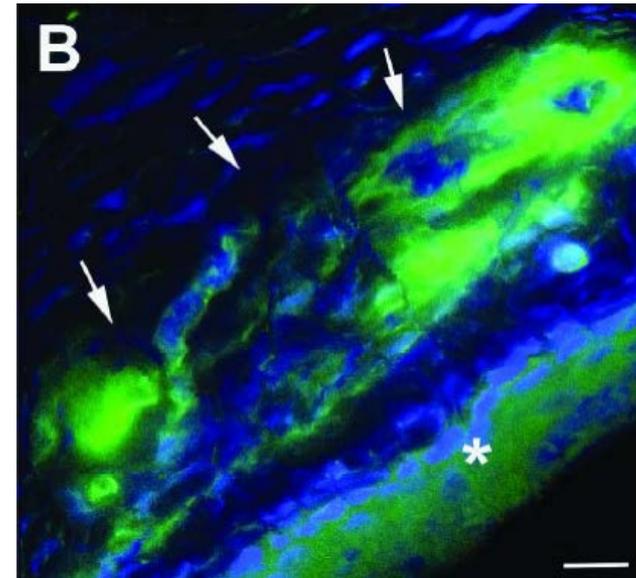
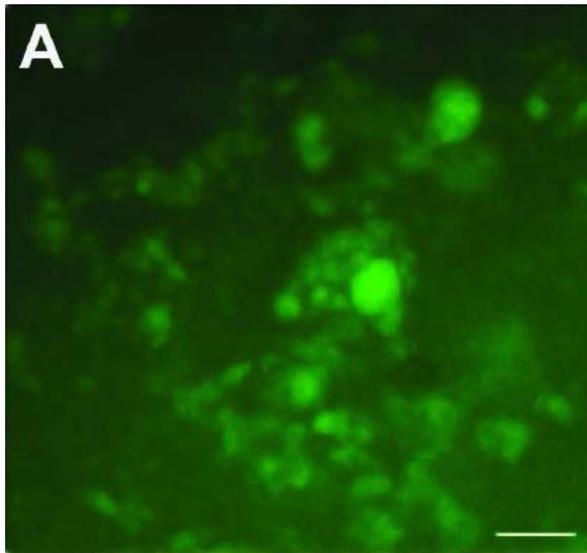
Expresión de proteína verde fluorescente en la retina 72 h después de la administración subretiniana del vector.

Se transfectan mayoritariamente células del epitelio pigmentario de la retina y fotorreceptores.

En azul: núcleos

Terapia ocular

□ Administración tópica en la córnea



Expresión de proteína verde fluorescente en la córnea 72 horas después de la instilación tópica del vector

En azul: núcleos

*: epitelio corneal

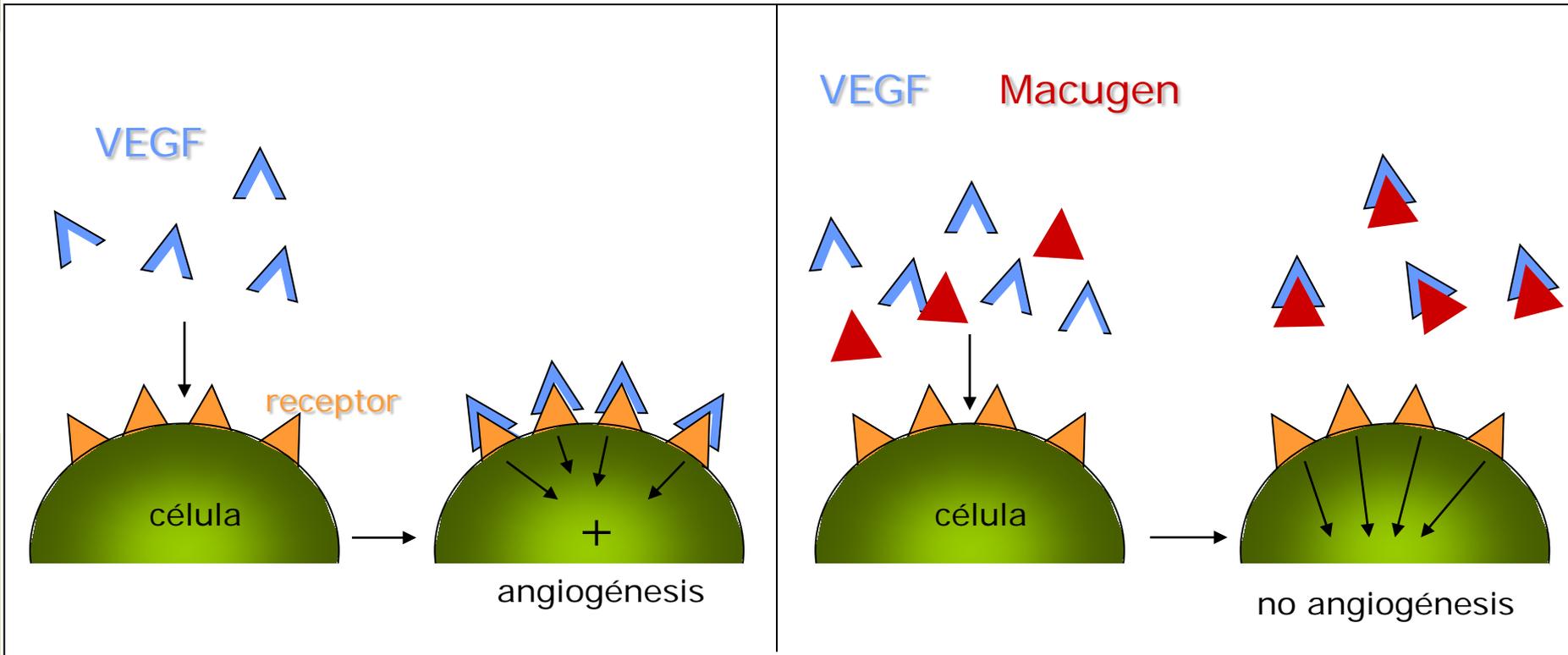
Terapia ocular

Vitravene®

Tratamiento de la retinitis por citomegalovirus en pacientes con SIDA

Terapia ocular

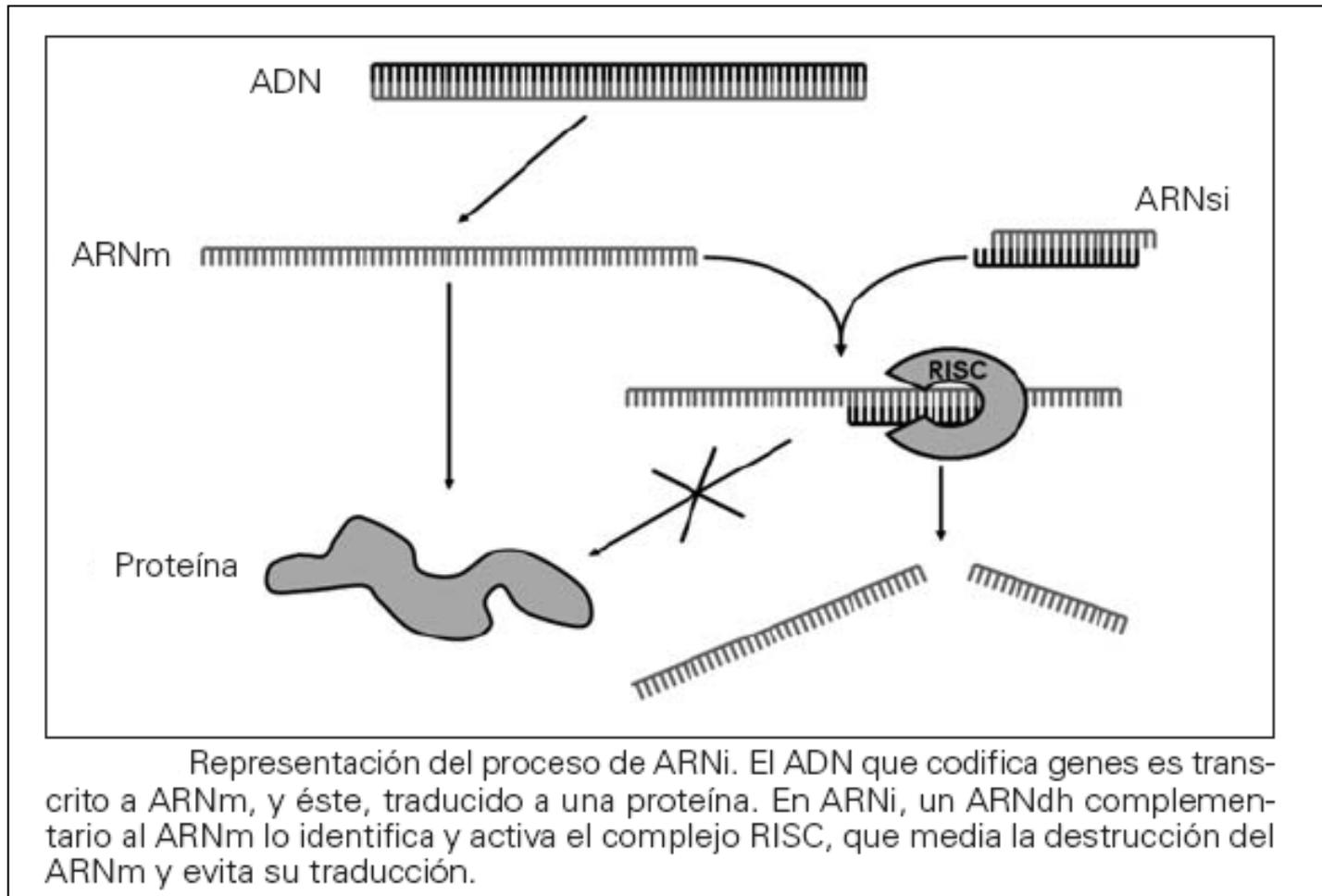
Macugen: tratamiento para la degeneración macular



VEGF: se une a receptores sobre la superficie de la célula e induce la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos)

Macugen: se une al VEGF, inhibiendo la unión de este a los receptores; así, la angiogénesis no se favorece.

RNA de interferencia (siRNA)



RNA de interferencia (siRNA)

- ❑ Disminuir la expresión de oncogenes (Bcl-2)
- ❑ Disminuir la expresión de moléculas implicadas en la iniciación o progresión de cáncer (p53, VEGF)
- ❑ Silenciar genes de agentes infecciosos (VIH; hep C)
- ❑ Enfermedades neurodegenerativas