

DNA eta RNAren administrazioa eta disposizioa terapia genikoan



22. gaia

Edukien indizea

- ❑ Terapia genikoaren definizioa eta sailkapena
- ❑ DNA administratzeko moduak: bektore biralak eta ez biralak
- ❑ Hartze zelularraren prozesua eta zelula-barneko disposizioa
- ❑ Terapia genikoaren aplikazioak
- ❑ Interferentzia RNA

Terapia genikoa: kontzeptua

Europako Sendagaien Agentziaren arabera (EMA):

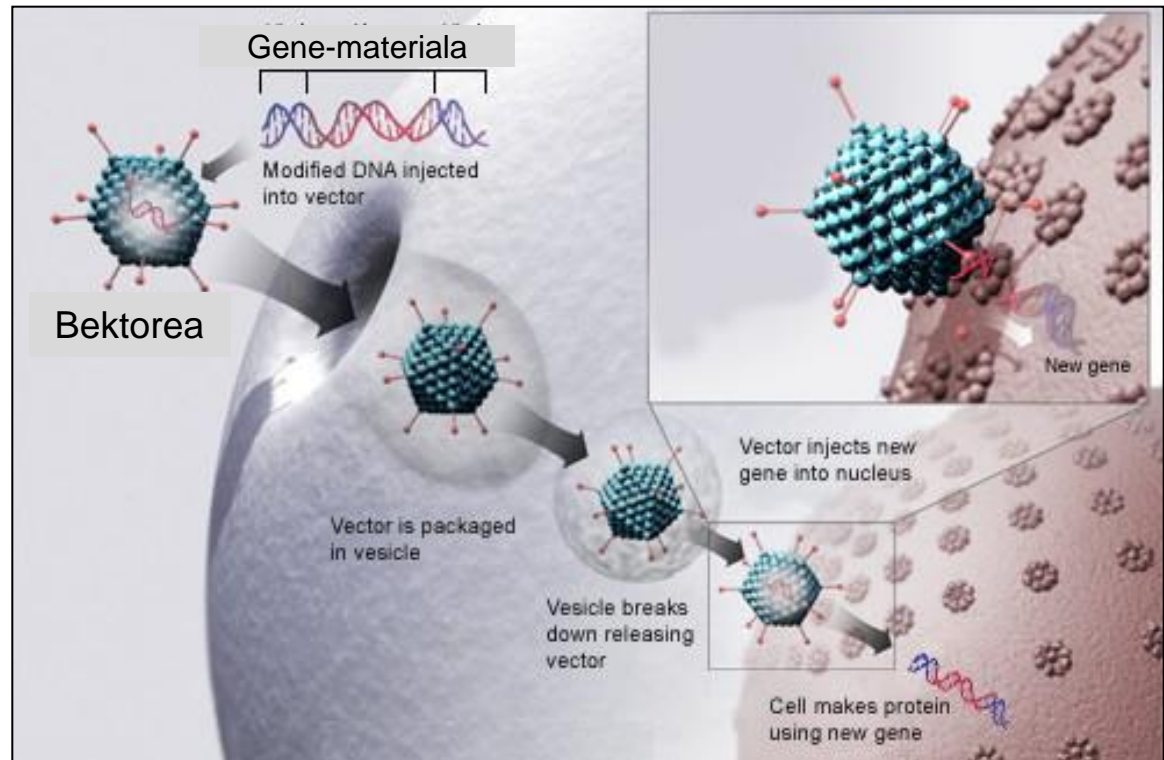
Terapia aitzindariak:

1. Terapia genikoa
2. Terapia zelularra
3. Ehunen ingeniariatza

- ❖ Osagai aktiboa: azido nukleikoa
- ❖ Sekuentzia geniko bat erregulatu, konpondu, ordezkatu, gehitu edo eliminatu
- ❖ Gizakietan erabili
- ❖ Eragin terapeutikoa: azido nukleiko sekuentziaren menpe edo sekuentzia horrek kodifikatzen duen produktuaren menpe

Terapia genikoa: kontzeptua

DNA edo RNA pusketak zelulen barnealdera garraiatzea ahalbidetzen duten teknika multzoa, hainbat proteinen espresioa modulatzuz eta ondorioz arazo biologikoa konponduz

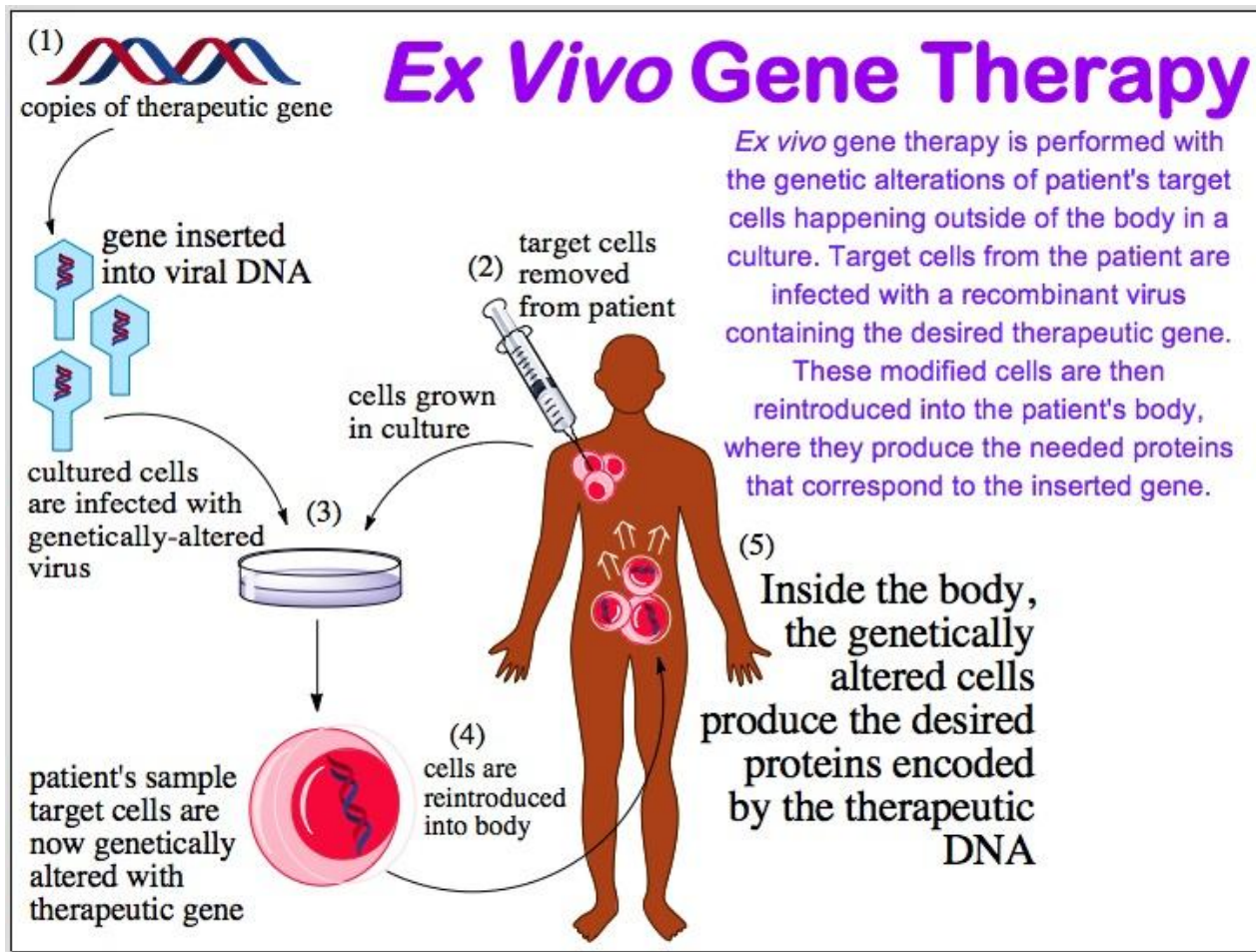


Iturri honetatik aldatua: National Institutes of Health. Wikimedia Commons-en argitaratua. Jabari publikoa. http://en.wikipedia.org/wiki/Gene_therapy

Terapia genikoa: sailkapena

- ❑ Transfektatu beharreko zelulen arabera:
 - ❑ Hozizelulen gene-terapia
 - ❑ Zelula somatikoan gene-terapia
- ❑ Estrategiaren arabera:
 - ❑ “Ex vivo”
 - ❑ “In vivo”

Terapia genikoa: sailkapena



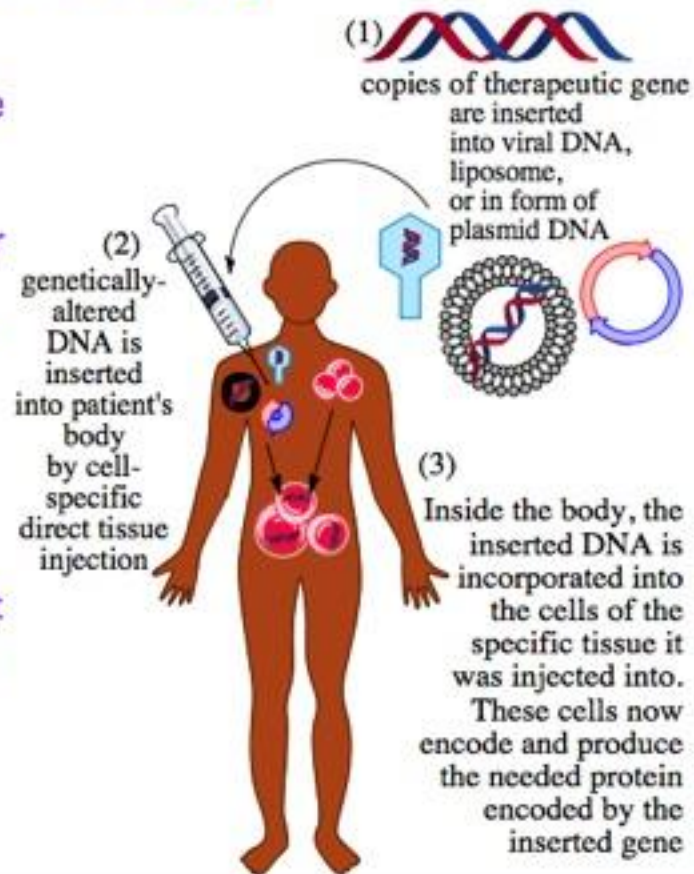
Lizanne Koch, Wikibooks-en argitaratua. Jabari publikoa.

http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/DNA_recombinant_techniques/Gene_Therapy

Terapia genikoa: sailkapena

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 genikoa: sailkapena

“Ex vivo”

- Pazientearen zelulak atera eta zelula-kultura prestatu
- Transfekzioa “in vitro”
- Transfektatutako zelulak pazienteari sartu

“In vivo”

- Material genetikoa zuzenean pazientearen zeluletan sartu, aldez aurretik organismotik atera gabe

Terapia genikoa: sailkapena

“Ex vivo”

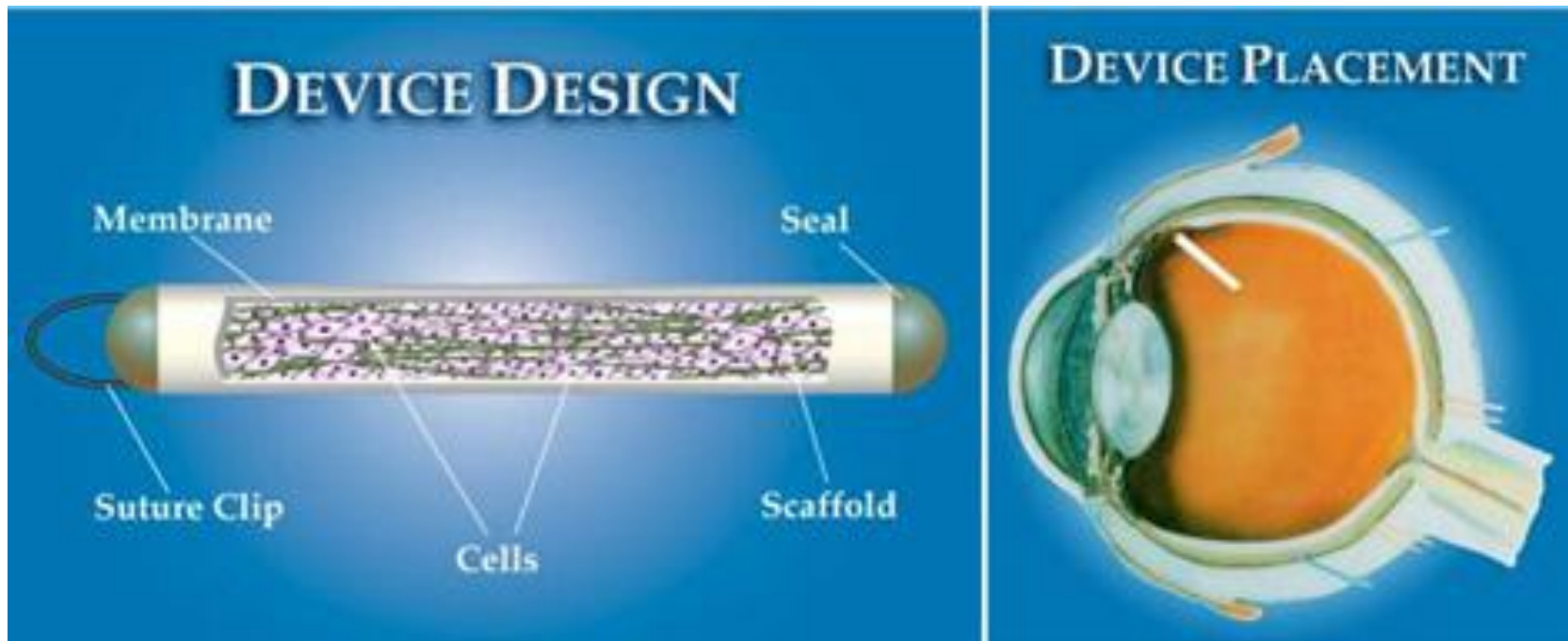
- Prozesuaren gaineko kontrola
- Zelulen aukeraketa
- Transfekzio eraginkortasun altua
- Kostu altua
- Kulturaren hazten ez diren zelulan

“In vivo”

- Erraztasuna
- Ohiko administrazio bideak
- Prozesuaren gaineko kontrola txikiagoa
- Transfekzio eraginkortasuna baxuagoa
- Zelula espezifikotasun baxua

Terapia genikoa: sailkapena

Ex vivo



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

Terapia genikoa: sailkapena

In vivo

- ❑ Sistema fisikoak
- ❑ Bektore biralak
- ❑ Bektore kimikoak (ez biralak)

- Material genetikoa degradazio entzimatikotik babestu
- Zelulan barneratze prozesua erraztu
- DNA zelularen zitoplasman askatu

Terapia genikoa: sailkapena

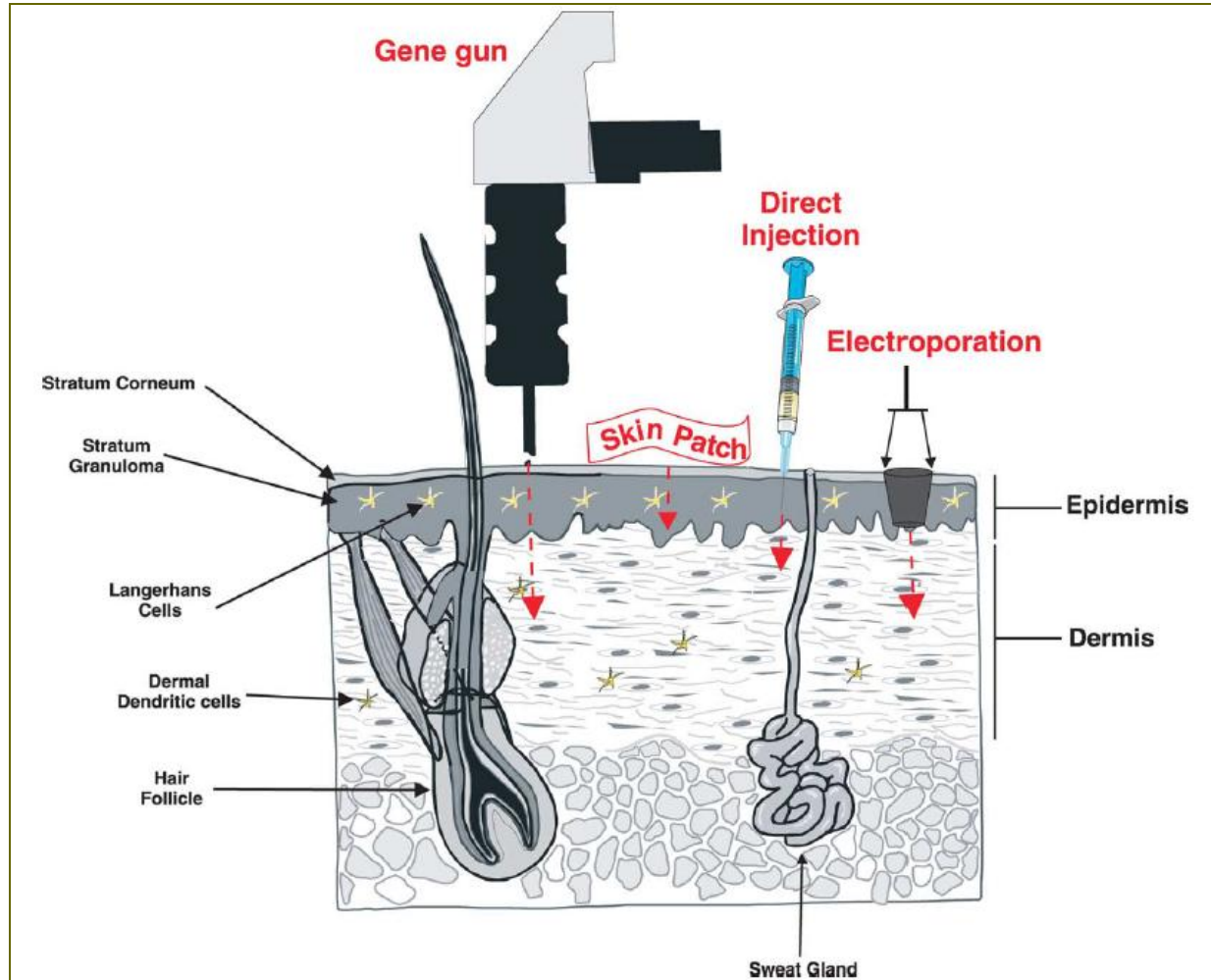
In vivo

Sistema fisikoak

- Zuzeneko administrazioa: Giharra, gibela, azala, tumoreak
- Elektroporazioa
- Orratz gabeko administrazio sistemak (*gene gun*)

Terapia genikoa: sailkapena

In vivo



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

Terapia genikoa: sailkapena

In vivo

Gene terapian erabilia izateko bektore baten betekizunak

- ❑ Zelularako espezifikoa
- ❑ Transfekzioa eraginkorra
- ❑ Toxikoa ez
- ❑ Mutagenikoa ez
- ❑ Immunogenikoa ez
- ❑ Ekoizpen erraza eta kostu baxuan

DNA administratzeko moduak:

Bektore biralak

Abantailak:

- Transfekzio eraginkortasun altua

Desabantailak:

- Proteina birikoengatiko immunogenizitatea
- Mutagenesia eragiteagatik gaitasun onkogenikoa
- Garraiatu dezaketen DNAREN tamaina mugatua

DNA administratzeko moduak:

Bektore biralak

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

DNA administratzeko moduak:

Bektore biralak

Gene terapiako ikerkuntza klinikoetan erabilitako bektore biralak

- ❑ Adenovirus
- ❑ Birus adenoasoziatuak
- ❑ Retrovirus
- ❑ Lentivirus
- ❑ Poxvirus
- ❑ *Herpes simplex*
- ❑ Lipofekzioa
- ❑ DNA biluxik

DNA administratzeko moduak:

Bektore ez biralak

Abantailak:

- Segurtasun altuagoa
- Eskala handiko ekoizpenerako egokiak
- Tamaina handiko DNA molekulak garraiatzeko gaitasuna

Desabantailak:

- Transfekzio eraginkortasun baxua

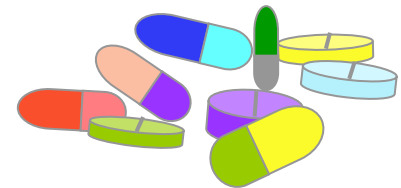
DNA administratzeko moduak:

Bektore ez biralak

Konposatu aktiboa
(azido nukleikoa)



SENDAGAIA



Formulazioa
(*Drug Delivery*)

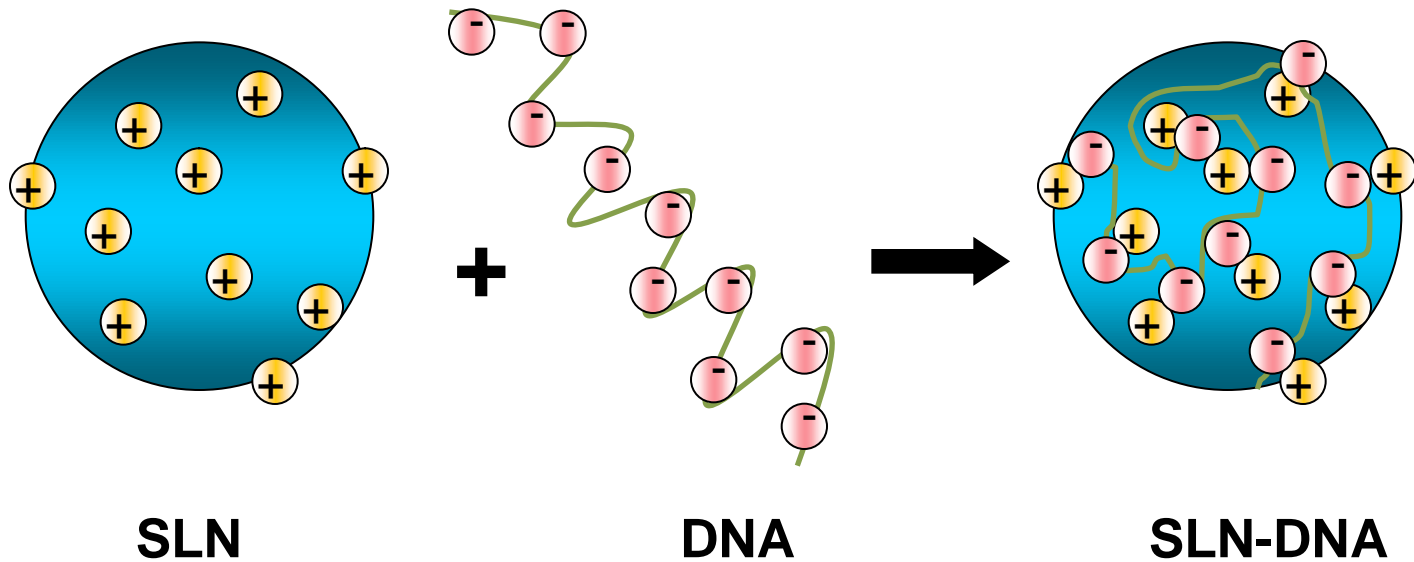
DNA administratzeko moduak:

Bektore ez biralak

- ❑ Polimeroak: PEI, Kitosanoak, poli-L-lisina
- ❑ Peptidoak
- ❑ Lipidoak:
 - Liposomak
 - Nanopartikula solido lipidikoak

DNA administratzeko moduak:

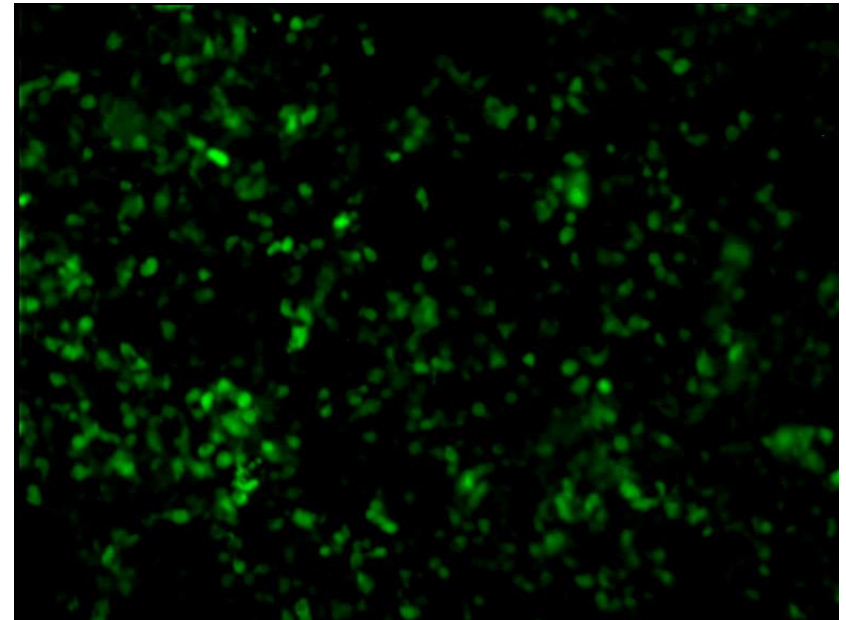
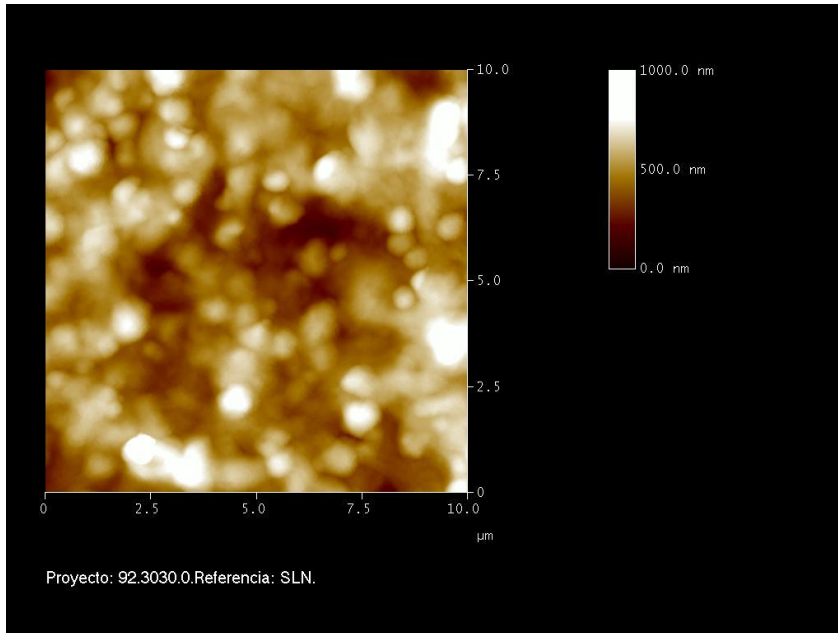
Bektore ez biralak



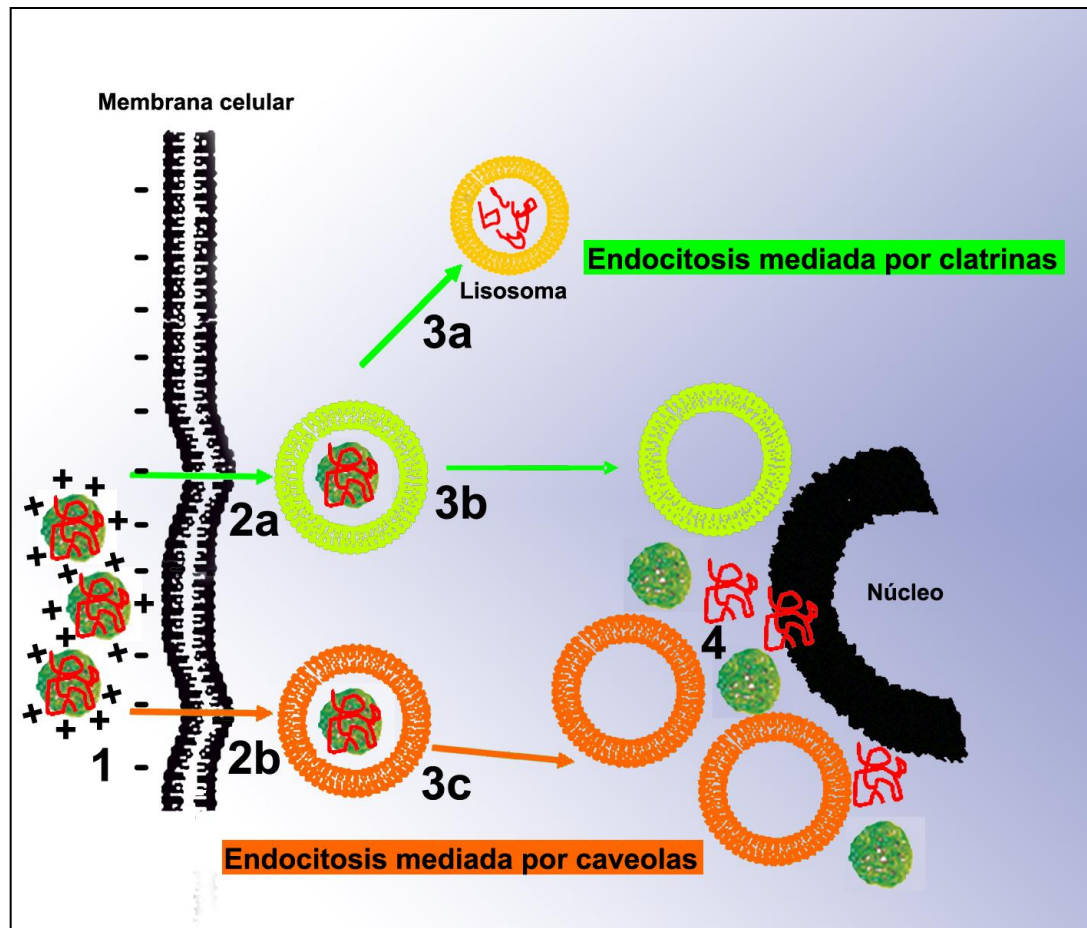
DNA administratzeko moduak:

Bektore ez biralak

GFP (*green fluorescent protein*) plasmidoa duten nanopartikula lipidikoekin
HEK-293 zelulen transfekzioa



Hartze zelularren prozesua eta zelula-barneko dispozizioa



Iturri honetatik aldatua: del Pozo A, Delgado D, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. *Int J Pharmaceut* 2008;360:177-183

Hartze zelularren prozesua eta zelula-barneko disposizioa

- Transfekzio eraginkortasuna hobetzeko estrategiak:
 - Endozitosia handitu (kitosano, zelulan barneratzeko peptidoak)
 - Endosoma ihesa erraztu (kolesterol)
 - Nukleoan sartzea erraztu (nukleo seinaleztapen sekuentziak dituzten peptidoak)

Terapia genikoaren aplikazioak

- Gaixotasun monogenikoak :
 - Immunoeskasia konbinatu larria
 - Hemofilia
 - Fibrosi kistikoa
 - Duchenne-en distrofia muskularra
 - Fabry-ren gaixotasuna

- Gaixotasun poligenikoak :
 - VIH
 - Minbizia
 - Gaixotasun kardiobaskularrak

Terapia genikoaren aplikazioak

Gene terapian egindako ikerkuntza klinikoen indikazioak

- ❑ Minbizia (gehienak)
- ❑ Gaixotasun kardiobaskularrak
- ❑ Gaixotasun infekziosoak
- ❑ Gaixotasun monogenikoak
- ❑ Begietako gaixotasun

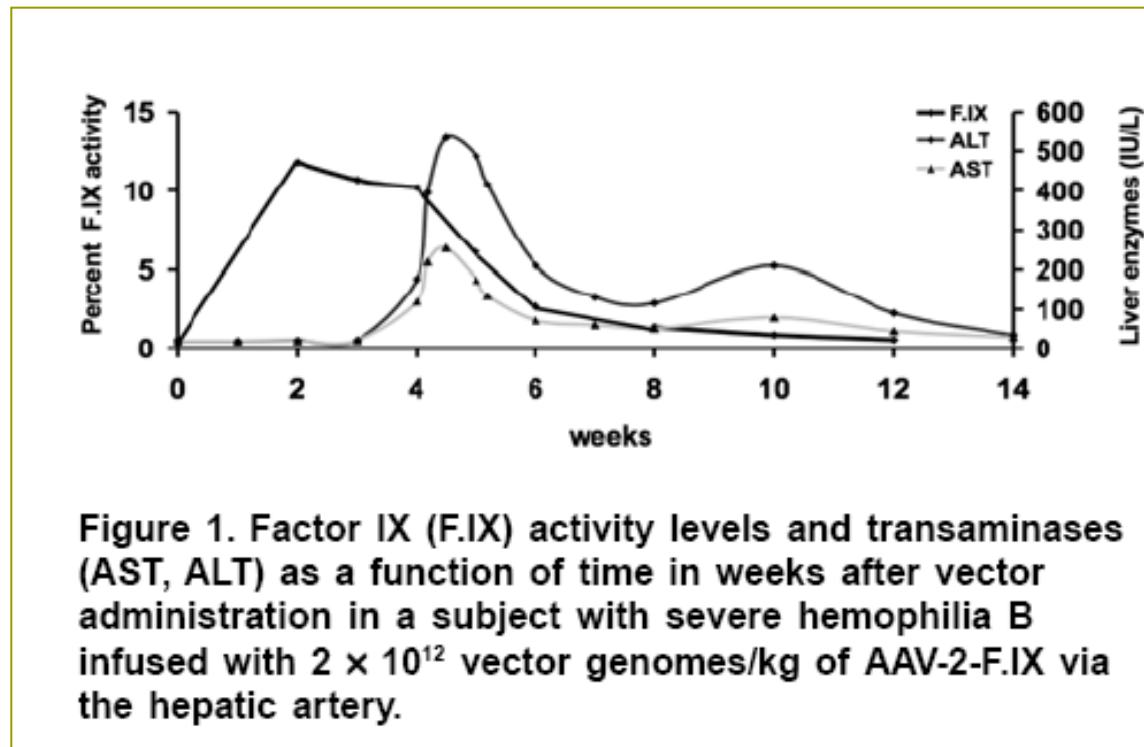
Terapia genikoaren aplikazioak

Gene terapian egindako ikerkuntza klinikoetan erabilitako gene motak

- ❑ Antigenoak
- ❑ Zitokinak
- ❑ Tumore-ezabatzaile faktoreak
- ❑ Gene suizidak
- ❑ Hazkuntza faktoreak
- ❑ Hartzaileak

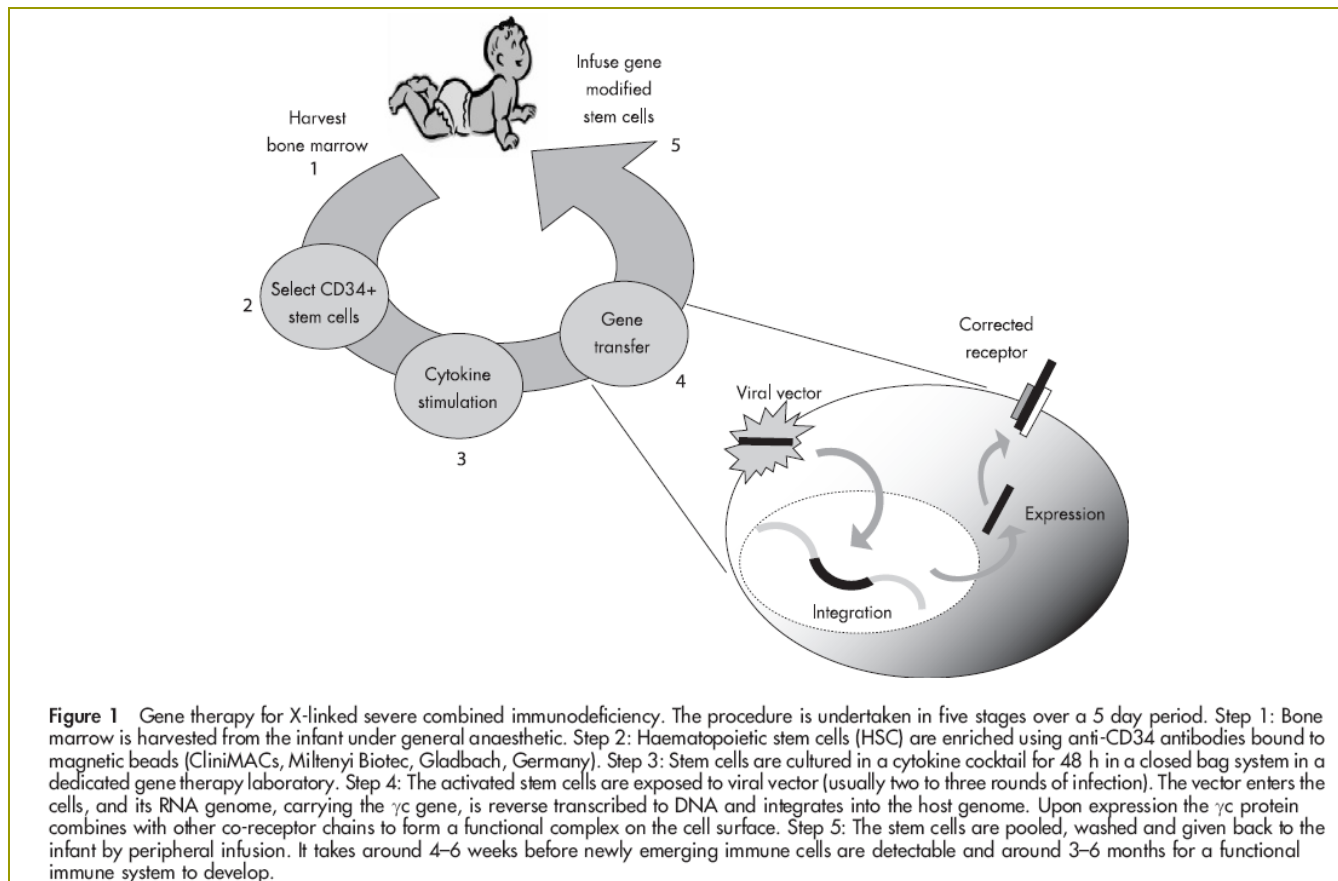
Hemofilia

- ❑ A Hemofilia: Koagulazioaren VIII. faktorearen gabezia
- ❑ B Hemofilia: Koagulazioaren IX. faktorearen gabezia



Immunoeskasia konbinatu larria

- ❑ Adenosina desaminasa (ADA-SCID) entzimaren gabezia
- ❑ “Cytokine receptor common gamma chain” (γ_c) (SCID-X1) gabezia



Gaixotasun kardiobaskularrak

- ❑ Eragin kardiobasbeslea eragin:
 - ❑ Hepatozitoen hazkuntza faktorea
- ❑ Bihotzaren uzkurkortasuna normalizatu :
 - ❑ IGF-1 (intsulinaren hazkuntza faktorea)
 - ❑ Erretikulu sarkoplasmikoaren Ca^{2+} -ATPasa (SERCA2)
 - ❑ Kaltzio proteina-finkatzailea: S100A1

Minbizia

- ❑ Zelula immuneen tumoreen aurkako aktibitatea handitu:
IL-12
- ❑ Tumorearen immunogenizitatea handitu, tumore-antigeno aktiboak erabiliz
- ❑ Antionkogeneen administrazioa
- ❑ Tumore-ezabatzaile faktoreak kodifikatzen dituzten geneak sartu: p53
- ❑ Faktore antiangiogenikoak
- ❑ Gene suizidak (timidin kinasa/ganziklovir)

Minbizia

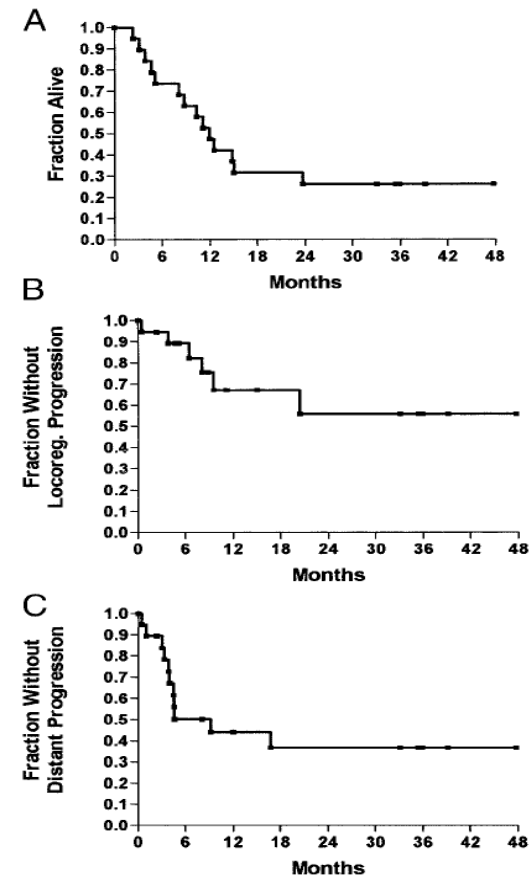
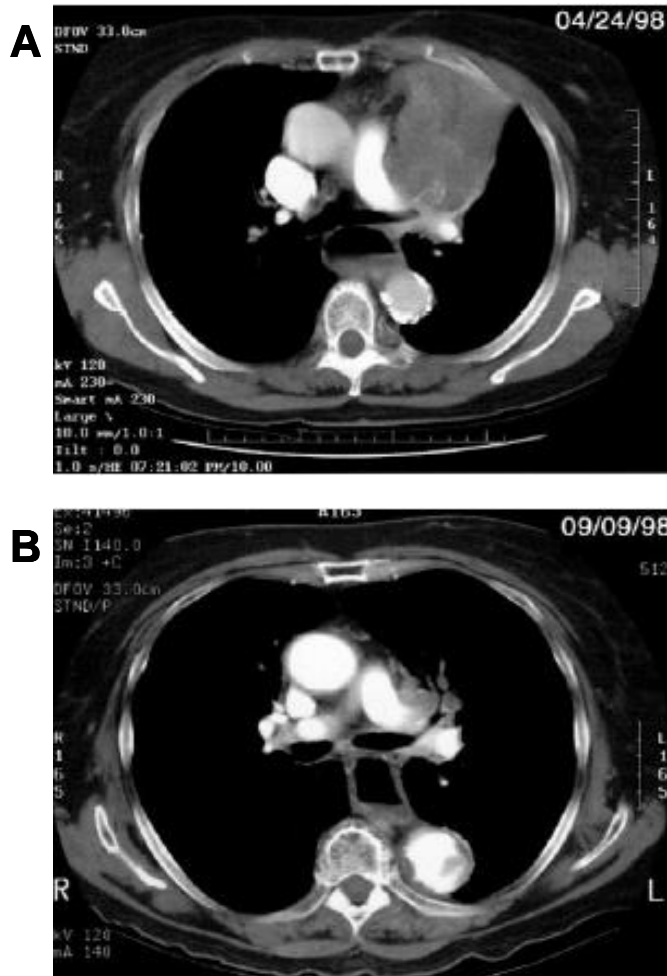


Fig. 2 A, overall survival of all patients ($n = 19$) entered on trial with Ad-p53 (INGN 201) and radiation therapy. B, locoregional time to progression of all patients ($n = 19$) entered on trial with Ad-p53 (INGN 201) and radiation therapy. C, metastatic time to progression of all patients ($n = 19$)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

Birikietako minbizia duen gaixo baten eboluzioa p53 genea zuen adenovirus batekin eta erradioterapiarekin egindako tratamenduaren ostean. A: tratamendua baino lehen. B: tratamendua amaitu eta hiru hilabetetara

Begietako terapia

Albinismoa: OA1 genean aldaketak



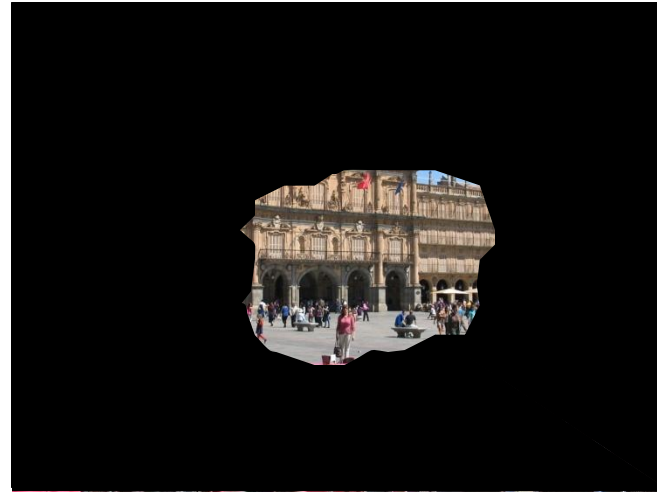
Albinismoa duen pertsona baten begiak

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

Sortzetiko Leberren Amaurosia: RPE65 genean aldaketak

Begietako terapia

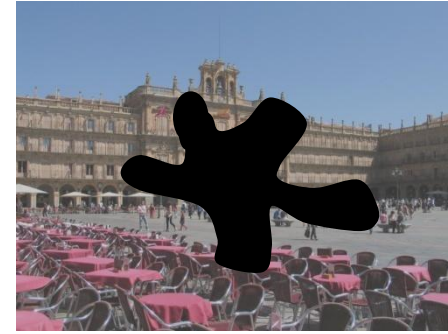
Erretinosi pigmentarioa: RPE65 genean aldaketak



Erretinosi pigmentarioa duen pertsona baten ikusmena

Begietako terapia

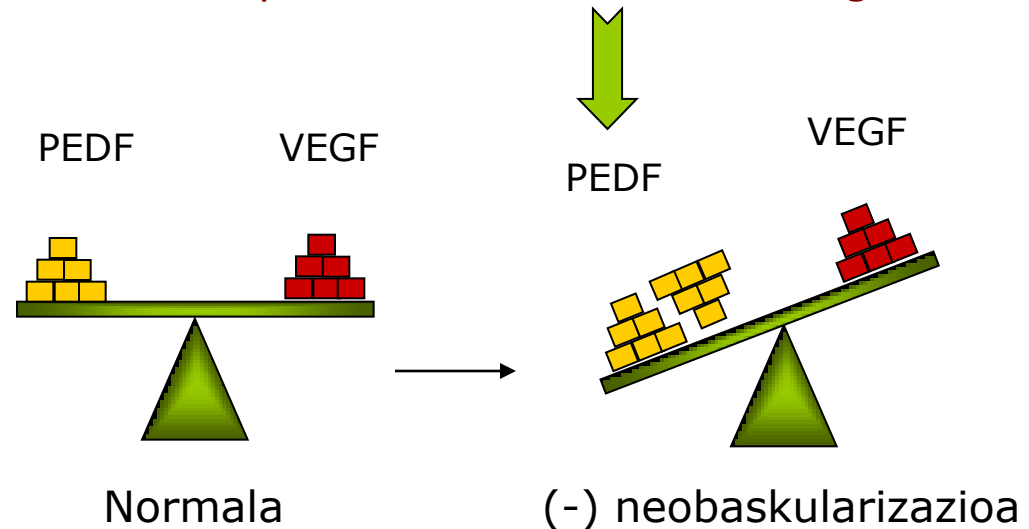
Adinarekin lotutako makula endekapena



Gaixotasuna duen paziente baten ikusmenaren eboluzioa

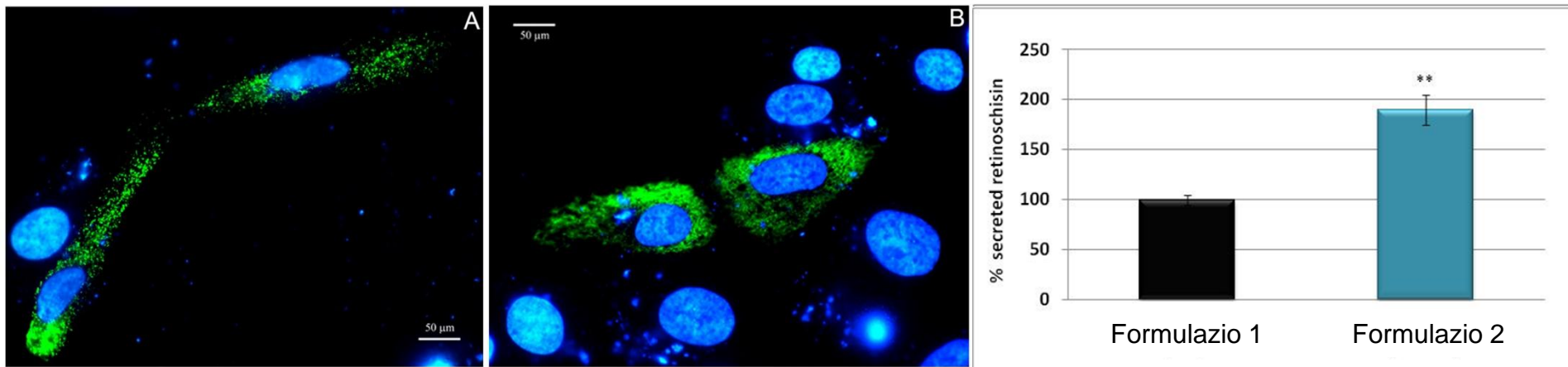
- Proteina antiangiogenikoak kodifikatzen dituzten geneak administratu (odol-hodi berrien sorrera inhibitzen dute)
- Proteina angiogenikoak kodifikatzen dituzten geneak blokeatu

PEDF proteina kodifikatzen duen genea



Begietako terapia

Kormosoma X-kin lotutako gazte-erretinoskisia: RS1 genean urritasuna, erretinoskisia proteinak gutxitasuna eragiten duelarik



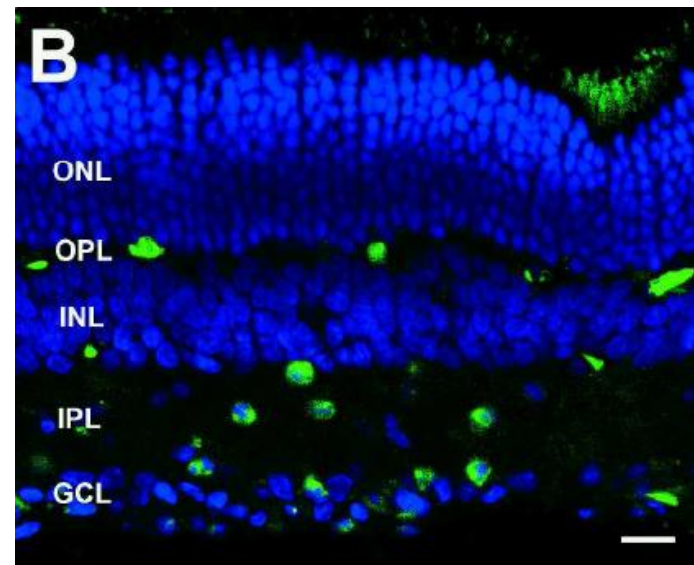
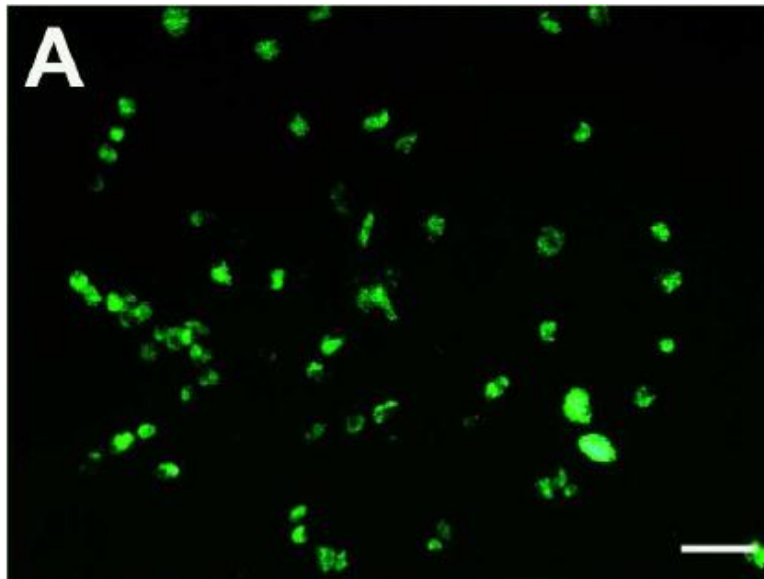
Erretinoskisinaren espresioa nanopartikula lipidikoekin prestatutako bi formulazioekin (F1 eta F2) transfektatutako ARPE19 zeluletan.

Berdea: erretinoskisia

Urdina: zelulen nukleoak eta RS1 genea (erretinoskisia espresatzen duen genea)

Begietako terapia

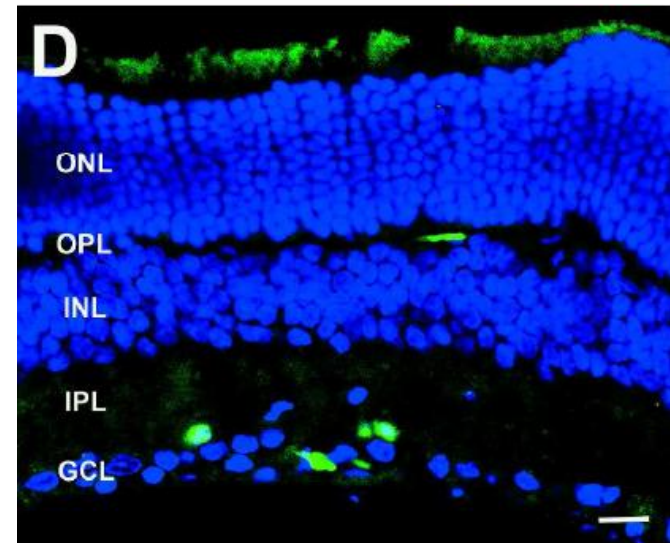
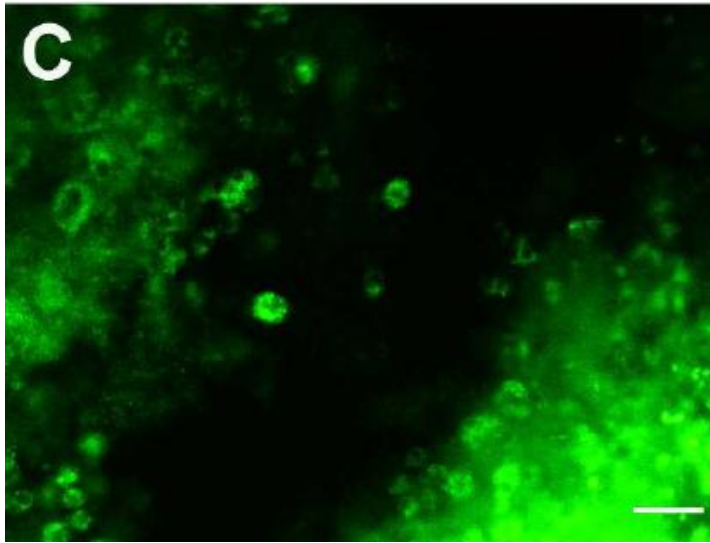
▣ Humore-beirakara barneko administrazioa



Bektorearen humore-beirakara barneko administrazioaren ondoren 72 h pasa direnean proteina berde fluoreszentearen espresioa erretinan. Gehien bat gongoil-zelulak transfektatzen dira. Urdinez: nukleoak.

Begietako terapia

□ Erretina-azpiko administrazioa



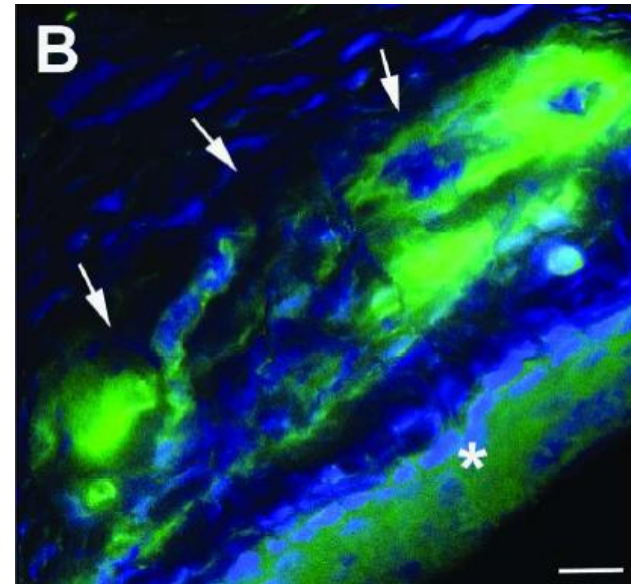
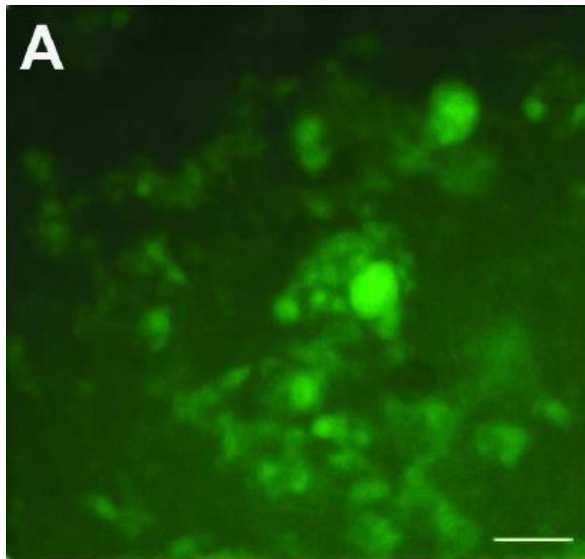
Bektorearen erretina azpiko administrazioaren ondoren 72 h pasa direnean proteina berde fluoreszentearen espresioa erretinan.

Gehien bat erretinako epitelio pigmentarioko zelulak eta fotorrezeptoreak transfektatzen dira.

Urdinez: nukleoak

Begietako terapia

□ Kornean administrazio topikoa



Proteina berde fluoreszentearen espresioa kornean bektorea administratu eta ondorengo 72 orduetan
Urdinez: nukleoak

*: kornearen epitelioa

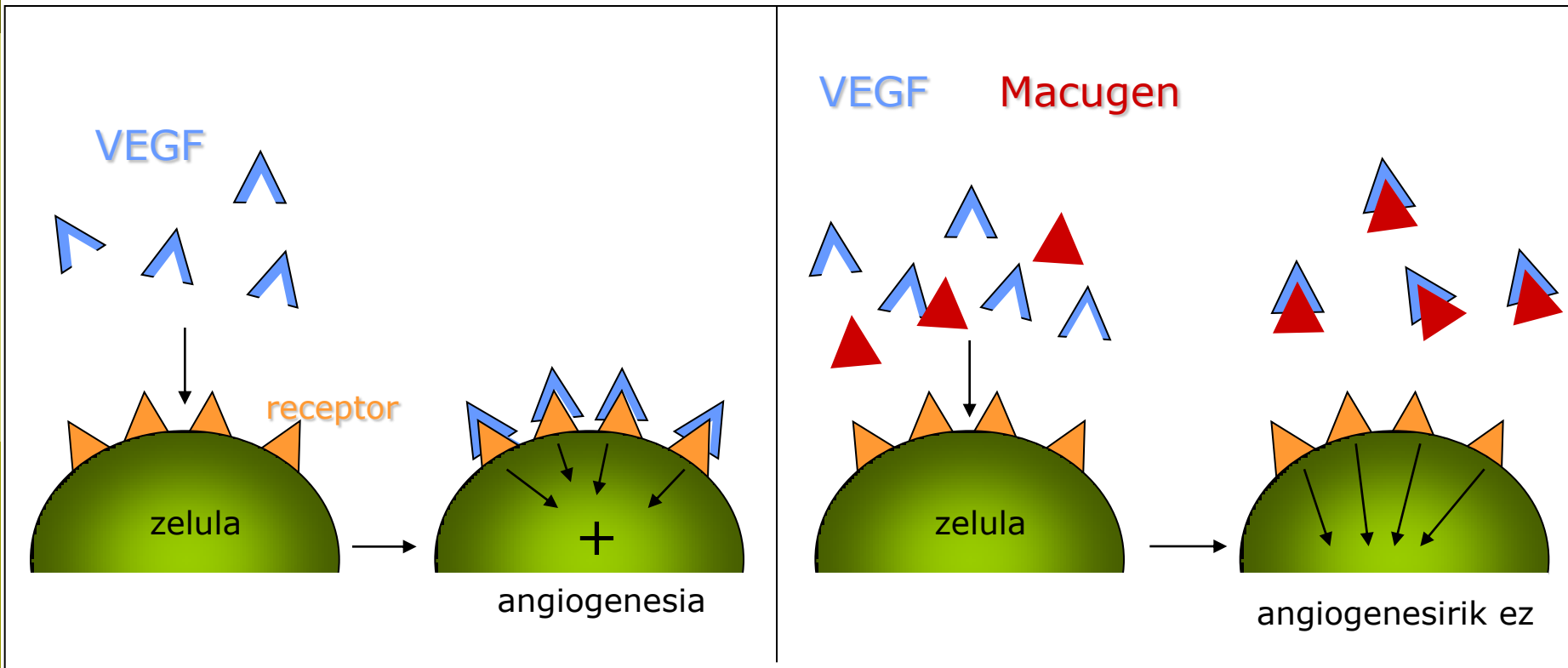
Begietako terapia

Vitravene[®]

HIESA duten gaixoetan zitomegalobirusak sortutako erretinitisa tratatzeko

Begietako terapia

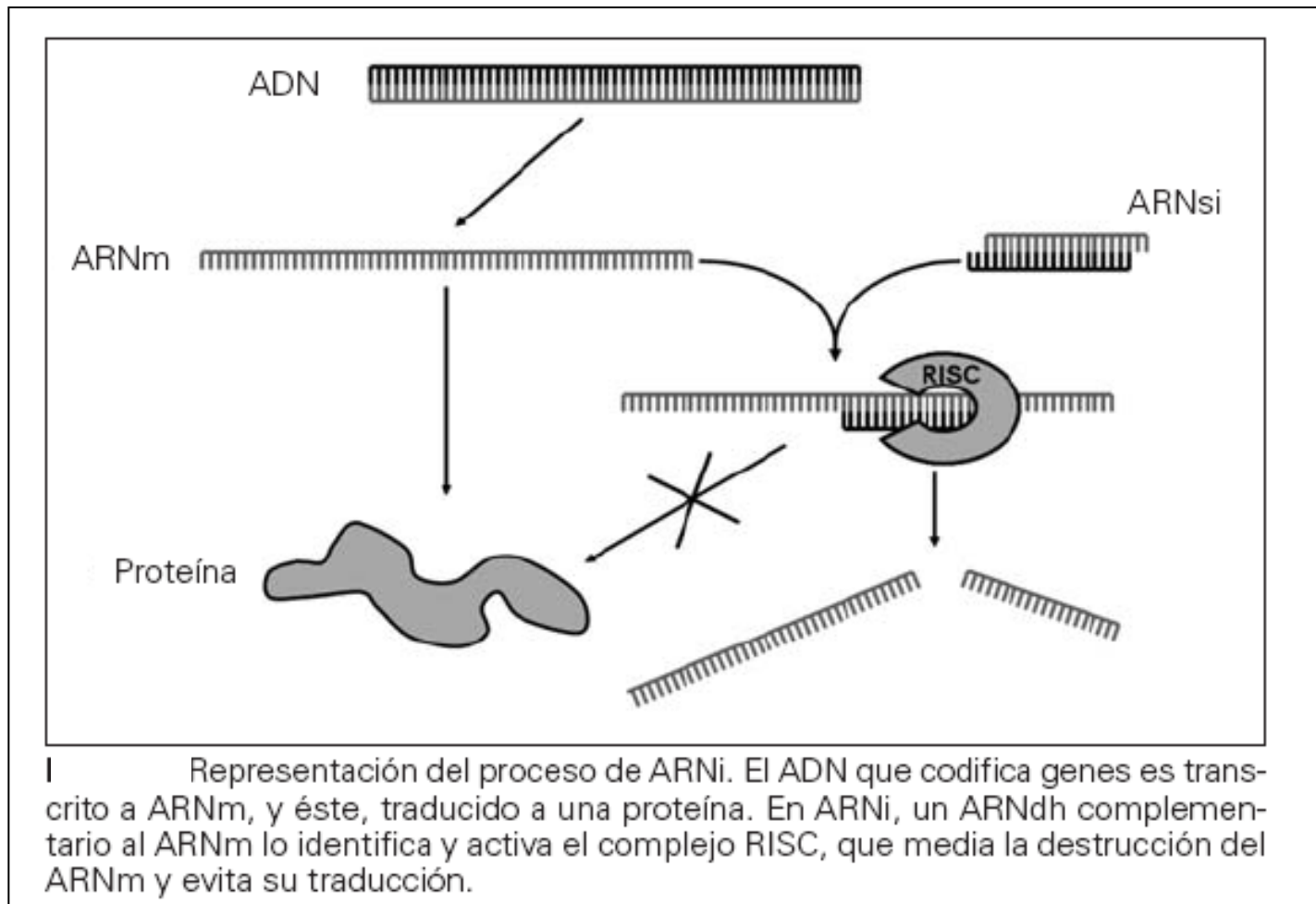
Macugen: makula-ende kapena tratatzeko



VEGF: zelularen gainazaleko hartzaileekin lotzen da eta angiogenesisia eragiten du (odol-hodien eraketa).

Macugen: VEGFrekin lotzen da, honen lotura hartzaileekin inhibitzen; horrela ez da angiogenesisia errazten.

Interferentzia RNA (siRNA)



Interferentzia RNA (siRNA)

- ❑ Onkogeneen espresioa murriztu (Bcl-2)
- ❑ Minbiziaren hasieran edo aurreratzean parte hartzen duten molekulen espresioa murriztu (p53, VEGF)
- ❑ Agente infekziosoen geneak isildu (VIH; hep C)
- ❑ Gaixotasun neurodegeneratiboak