



TERAPIA GÉNICA

Ana M. Gómez Foix

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona
08028-BARCELONA
agomezfoix@ub.edu
Barcelona, Julio 2009

INDICE

1. Definición y bases
2. Enfermedades diana y receptor
3. Tipos de intervención en terapia génica
 - 3.1. Transferencia de secuencias de DNA codificantes
 - 3.2. Transferencia de secuencias de DNA/RNA inhibidoras de la expresión génica
 - 3.3. Aptámeros
4. Descripción de las moléculas de DNA/RNA transferidas
5. Etapas limitantes de la transferencia a la célula aislada y al tejido *in vivo*
6. Tipos de administración *in vivo*
7. Los vectores de transferencia
8. Dosificación
9. Toxicidad

1. DEFINICIÓN Y BASES

1.1. ENFERMEDADES GENÉTICAS

▶ Enfermedades debidas a alteraciones de la dotación de genes

- **Genoma nuclear: cromosómico**

Dotación normal de cromosomas nucleares: 22 x 2 autosómicos + 2 sexuales (XX o XY).
Contienen ~ 20.000 - 25.000 genes funcionales.

- **Genoma mitocondrial: DNA circular**

Existen 8-10 copias por mitocondria y cientos de mitocondria por célula (~ 5000 copias en total).
Contiene 37 genes: 13 proteicos, 22 ARNt y 2 ARNr (mitocondriales).

▶ Clasificación según el número de genes alterados y origen del gen

Nucleares:

- **Enfermedades cromosómicas:** afectan a múltiples genes.
- **Enfermedades monogénicas** (~ 8.000 descritas): un único gen alterado.
- **Enfermedades poligénicas:** varios genes.

Mitocondriales:

Uno o varios genes alterados.

1.2. TERAPIA GÉNICA

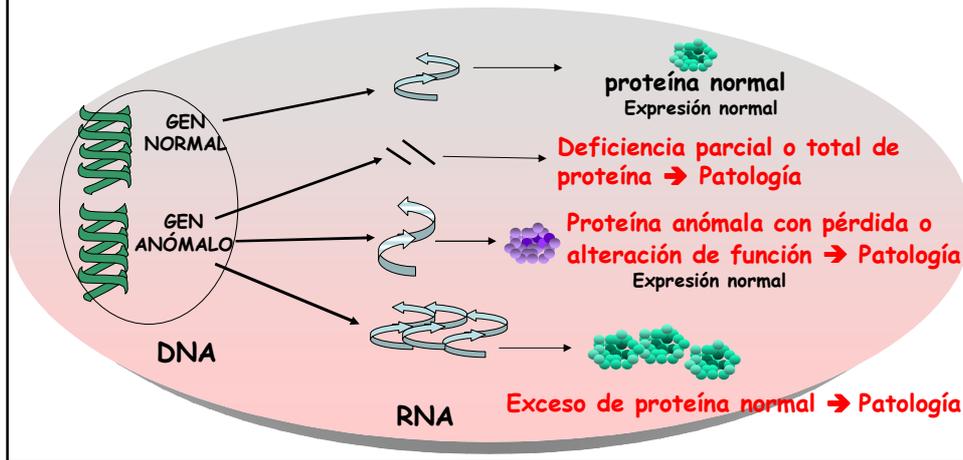
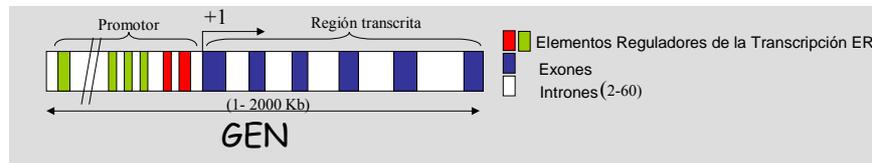
▶ Transferencia de ácidos nucleicos (DNA o RNA) a la célula con finalidad terapéutica:

- Incrementar la expresión de un gen endógeno con efecto terapéutico.
- Restaurar la expresión de un gen funcional cuando el gen endógeno es disfuncional.
- Inhibir la expresión de un gen endógeno con efectos patológicos.

▶ Se fundamenta en el conocimiento de la enfermedad a nivel celular y molecular:

- Identificación de las **células/tejido** de funcionamiento anómalo: **Patología Celular**
- Identificación de los **genes/proteínas** celulares responsables: **Genética/Patología Molecular**

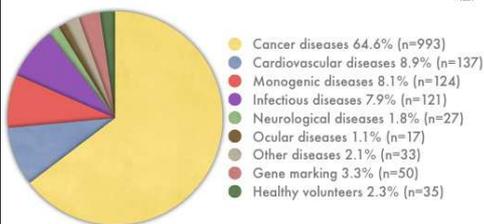
PATOLOGÍA MOLECULAR



2. ENFERMEDADES DIANA

► Enfermedades y tipos de genes ensayados en ensayos clínicos en humanos

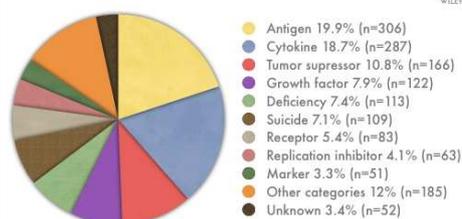
Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials



The Journal of Gene Medicine, © 2009 John Wiley and Sons Ltd

www.wiley.co.uk/genmed/clinical

Gene Types Transferred in Gene Therapy Clinical Trials



The Journal of Gene Medicine, © 2009 John Wiley and Sons Ltd

www.wiley.co.uk/genmed/clinical

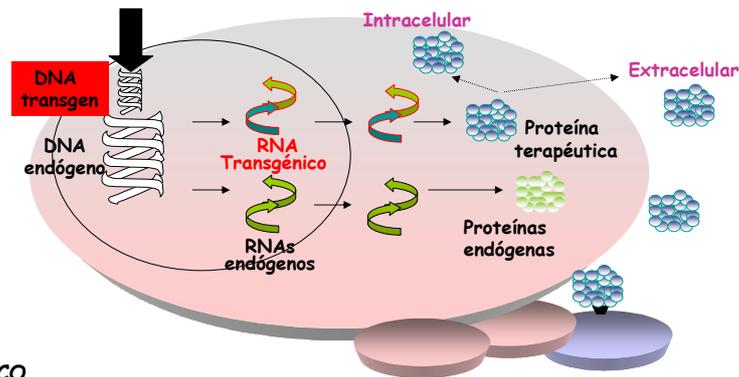
► Individuo Receptor

Adultos: experimental y aplicado en clínica humana
Embrión intrauterino: experimental en modelos animales
Células madre pluripotenciales *in vitro*: experimental

Se distingue entre la **terapia génica somática** (transferencia de DNA a tejidos normales) y **terapia génica de la línea germinal** (transferencia de DNA a células que producen ovocitos o esperma), ya que la primera se restringe al paciente tratado y no se transmite a la descendencia.

3. TIPOS DE INTERVENCION EN TERAPIA GÉNICA

3.1. Transferencia de secuencias de DNA codificantes



FÁRMACO

DNA de doble cadena que contiene una unidad transcripcional de un RNA con sentido o codificante.

APLICABILIDAD

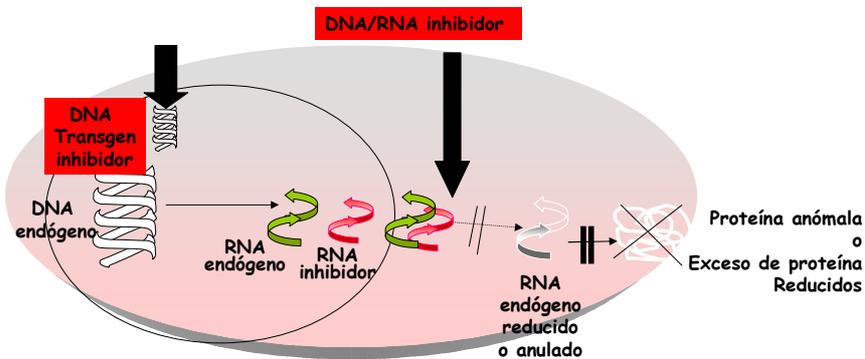
Puede reemplazar la inyección de proteínas extracelulares (ej. Insulina).

Aplicación inédita para la producción de proteínas intracelulares (ej. Deficiencias monogénicas).

Puede reemplazar la modulación de la actividad de proteínas endógenas con otros fármacos.

<http://www.aapsj.org/articles/aapsj0701/aapsj070109/aapsj070109.pdf>: <http://www.aapsj.org/articles/aapsj0701/aapsj070109/plasmid.asp>

3.2. Transferencia de secuencias inhibidoras de la expresión



FARMACO: secuencias de DNA/RNA complementarias a un mRNA endógeno que dirigen su destrucción o impiden su traducción.

- DNA de doble cadena con unidad transcripcional de un RNA
- DNA de cadena sencilla: oligonucleótido antisentido.
- RNA de doble cadena (pequeño RNA de interferencia siRNA).

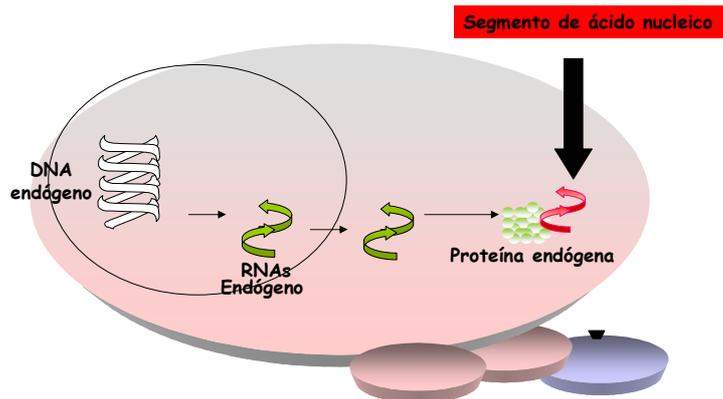
{ Antisentido
 Rbozima
 shRNA precursor de siRNA

APLICABILIDAD

Alternativa a la inhibición con otros fármacos de proteínas endógenas.

<http://www.aapsj.org/articles/aapsj0701/aapsj070109/antisense.asp>; <http://www.aapsj.org/articles/aapsj0701/aapsj070109/sirna.asp>

3.3. Transferencia de secuencias de ácidos nucleicos (aptámeros) que interactúan con una proteína



FARMACO

DNA/RNA de cadena simple o doble que interactúa con una proteína y altera su funcionalidad.

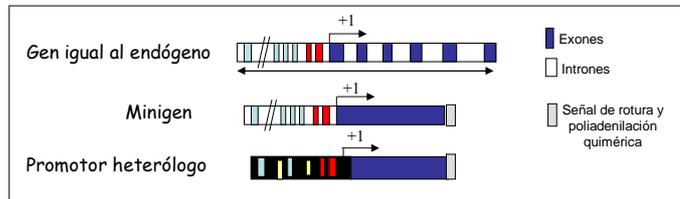
APLICABILIDAD

Alternativa a otros tipos de fármacos.

<http://www.aapsj.org/articles/aapsj0701/aapsj070109/aptamer.asp>

4.1. mRNA codificante, antisentido o ribozima

NATURALEZA: DNA de doble cadena que contiene una unidad transcripcional con un promotor que interacciona con la RNA polimerasa II.



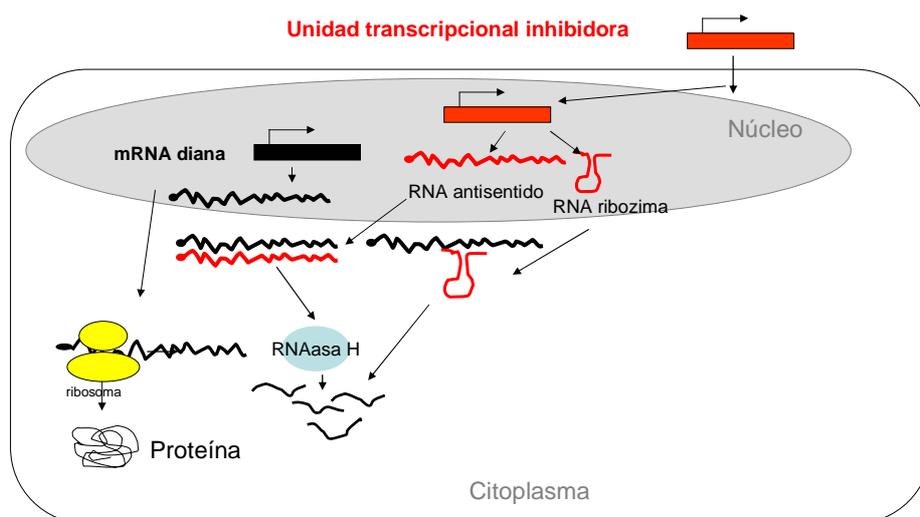
MECANISMO DE ACCION:

mRNA codificante - el transgen genera un mRNA que es traducido a una proteína.

mRNA antisentido - el transgen genera un mRNA complementario a un mRNA diana celular (de longitud inferior o igual al mRNA diana) con el que forma dímeros que se degradan.

mRNA ribozima - el transgen genera un mRNA complementario a un mRNA diana con el que forma dímeros y al cual hidroliza mediante su actividad enzimática.

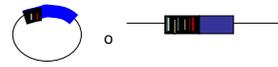
4.1. mRNA codificante, antisentido o ribozima



4.1. mRNA codificante, antisentido o ribozima

ORIGEN del DNA Lineal aislado → 

Insertado en un plásmido bacteriano
Insertado en un genoma vírico



LUGAR DE ACCIÓN:

Para ser activos deben transcribirse en el núcleo

La duración de la expresión depende de la integración en los cromosomas:

- DNA extracromosómico: inestable o transitorio (excepto si incluye elementos S/MAR) →  Tiene a degradarse y/o se pierde cuando la célula replica
- DNA integrado en los cromosomas celulares: estable →  Se mantiene después de la replicación celular

S/MARs (scaffold/matrix attached regions) son elementos del DNA genómico eucariótico que unen la cromatina a la matriz proteica del núcleo y organizan dominios de bucle que modulan la transcripción, replicación y empaquetamiento. Ligados a una unidad transcripcional son suficientes para replicar y mantener el DNA episomal.

4.1. mRNA codificante

EL PRIMER FÁRMACO GÉNICO APROBADO

Gendicine (rAdp53), adenovirus que expresa el supresor de tumor p53. Fue aprobado en China en 2003 por las agencias reguladoras de ese país.

Introgen therapeutics está en la actualidad realizando ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello.



Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. Human Gene Therapy (2005) 16:1016-1027.

4.2. Oligonucleótido

NATURALEZA: DNA de cadena sencilla de 12-15 nucleótidos.

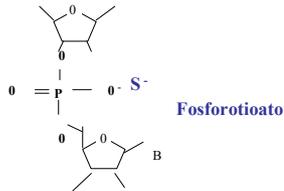
ORIGEN: Síntesis química.

ANTISENTIDO:

MECANISMO DE ACCIÓN: Forma dímeros por complementariedad de secuencia con RNAs diana endógenas favoreciendo su degradación por RNAsa H o impidiendo su traducción.

LUGAR DE ACCIÓN Y LIMITACIONES:

- ▶ Actúan en el citoplasma preferentemente y núcleo.
- ▶ Son inestables intracelularmente o en fluidos biológicos por ser susceptibles a digestión por nucleasas. Se pueden modificar químicamente (cambiar fósforo por azufre) para reducir su hidrólisis enzimática.

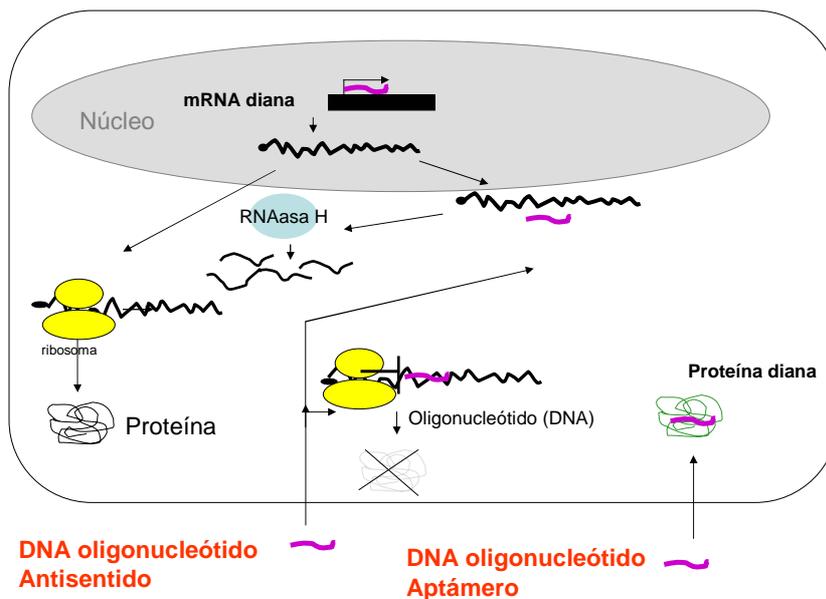


- ▶ Deben minimizarse sus posibles efectos inespecíficos por uniones directas a proteínas en el citosol o núcleo.

APTAMERO:

MECANISMO DE ACCIÓN: Forma complejos de manera específica con proteínas celulares y afecta su funcionalidad.

4.2. Oligonucleótido



4.2. Oligonucleótido

EL PRIMER OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO QUE HA LLEGADO AL MERCADO

Vitravene (ISIS) es un inhibidor antisentido. Inhibe la replicación del citomegalovirus CMV, el cual causa retinitis. Esta infección afecta a pacientes de SIDA y causa ceguera. Se aprobó en 1998 por la FDA. Vitravene, se administra localmente en el ojo por inyección intravítrea.



EL PRIMER OLIGONUCLEÓTIDO APTÁMERO QUE HA LLEGADO AL MERCADO

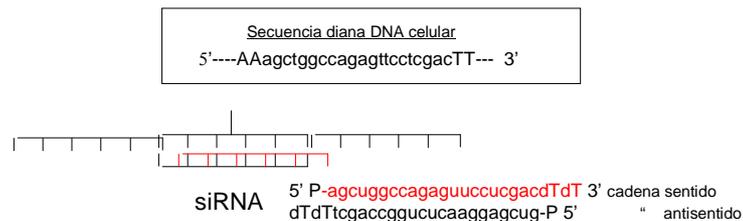
Macugen® (pegaptanib) diseñado para tratar la mácula degenerativa, una enfermedad ocular. Es un oligonucleótido pegilado que se une e inhibe el VEGF (*vascular endothelium growth factor*) que tiene efectos angiogénicos y proinflamatorios que contribuyen a la patología. Se administra por inyección intravítrea. Fue desarrollado por Eyetech Pharmaceuticals, Inc. y Pfizer lo comercializa desde Diciembre 2004.



4.3. RNAs de interferencia (siRNA y shRNA)

NATURALEZA: molécula de RNA de doble cadena corta (~ 25 pares de bases).

MECANISMO DE ACCIÓN: una de las cadenas es complementaria a un mRNA diana con el que forma dímeros y promueve su degradación a través del complejo de nucleasas RISC.



ORIGEN: ► Síntesis química (siRNA)



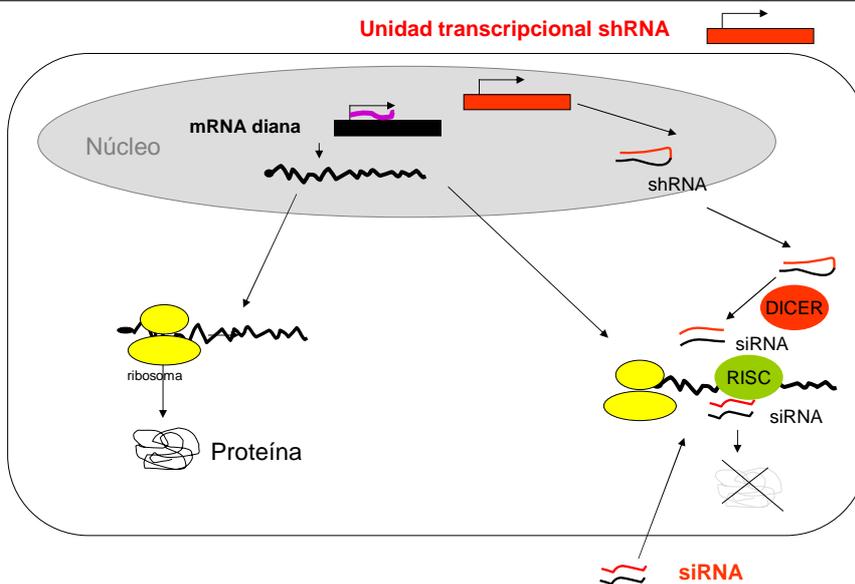
► Transcripción *in vitro* o *in vivo* (promotor transcrito por RNAPolimerasa III) de RNAs precursores de horquilla (shRNA) que son procesados en la célula diana



LUGAR DE ACCIÓN Y LIMITACIONES:

- Los siRNAs actúan en el citoplasma, los shRNAs se transfieren como DNA de doble cadena en unidades de transcripción y necesitan situarse en el núcleo para ser transcritos.
- Los siRNAs son mucho más eficientes que los oligonucleótidos antisentido o ribozimas, aunque también pueden tener efectos inespecíficos.
- Los siRNAs son inestables en fluidos biológicos por ser susceptibles a digestión por nucleasas.

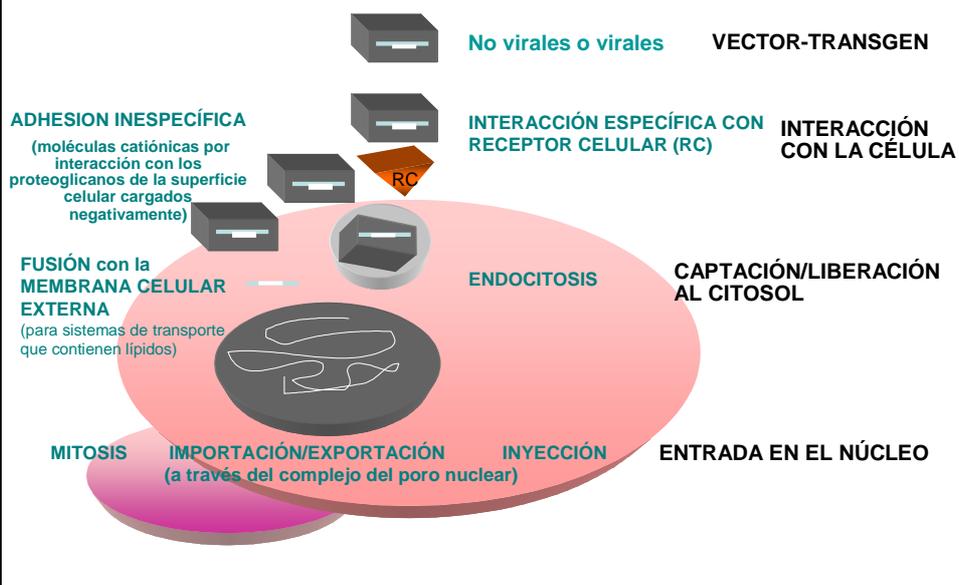
4.3. RNAs de interferencia (siRNA y shRNA)



DICER: ribonucleasa que corta los dsRNA en fragmentos de 20–25 pares de bases (siRNA).
RISC: RNA-induced silencing complex, la cadena complementaria del siRNA al mRNA se integra en este complejo y cuando se forma el dímero el complejo RISC actúa como una RNasa y/o impide la traducción

5.1. Etapas limitantes de la transferencia a la célula aislada

5.1.1. Interacción con la célula, captación y liberación al citosol



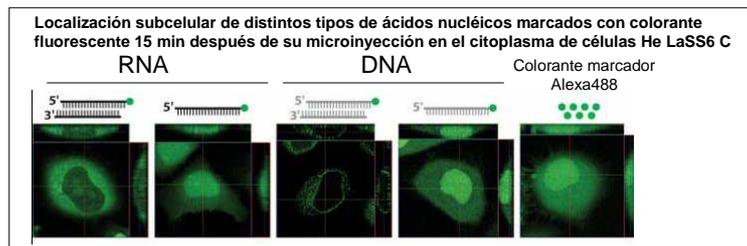
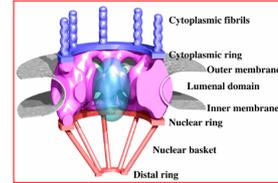
5.1.2. Entrada al núcleo

A. MITOSIS

cuando las células se dividen la membrana nuclear se rompe y el vector/DNA accede a los cromosomas. Es el mecanismo utilizado por los vectores oncoretrovirales.

B. PASO A TRAVÉS DEL COMPLEJO DEL PORO NUCLEAR

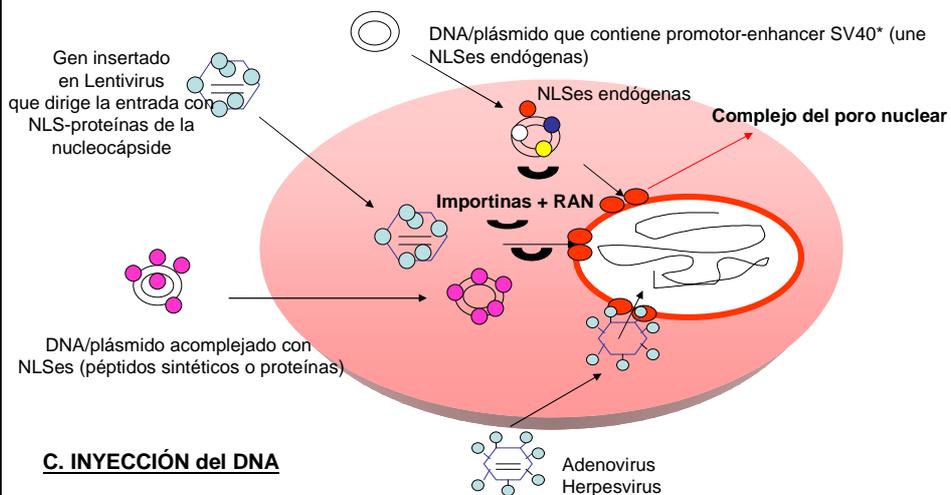
- Difusión:** las moléculas de cadena simple de DNA y RNA difunden desde el citoplasma al núcleo a través del complejo del poro nuclear de manera rápida sin necesitar la interacción con factores citosólicos.
- Importación:** Las moléculas de DNA de doble cadena (> 250 pb) deben entrar al núcleo por transporte activo a través del complejo del poro nuclear y su entrada está favorecida por su interacción con proteínas que contienen señales de translocación al núcleo. La translocación está mediada por importinas.



In situ fluorescence analysis demonstrates active siRNA exclusion from the nucleus by Exportin 5. Nucleic Acids Res. 2006 34:1369-80.

5.1.2. Entrada al núcleo

B.2. IMPORTACIÓN el DNA interacciona con proteínas que contienen señales de translocación al núcleo (NLS), unen importinas, y median la entrada a través del complejo del poro nuclear



5.2. Etapas limitantes de la transferencia al tejido *in vivo*

Farmacocinética: propiedades de distribución de sustancias administradas externamente a un organismo vivo

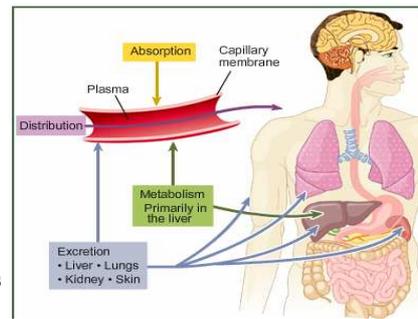
Liberación: abandono de la forma farmacéutica

Absorción: entrada en circulación desde administración no sistémica (poco frecuente DNA/RNA)

Distribución: paso del líquido vascular al extravascular (volumen de distribución y adsorción)

Metabolismo: transformación en compuestos más fácilmente eliminables

Excreción: eliminación del organismo



5.2. Etapas limitantes de la transferencia al tejido *in vivo*

Factores que influyen en la farmacocinética del DNA/vector

Distribución

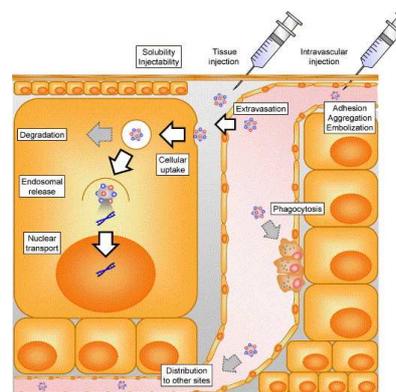
- Epitelio vascular
- Membranas conectivas

Metabolismo

- Unión a proteínas con carga: positiva para DNA desnudo y negativa para complejos DNA-policationes.
- Proteasas/nucleasas que degradan el vector/DNA
- Captación celular inespecífica

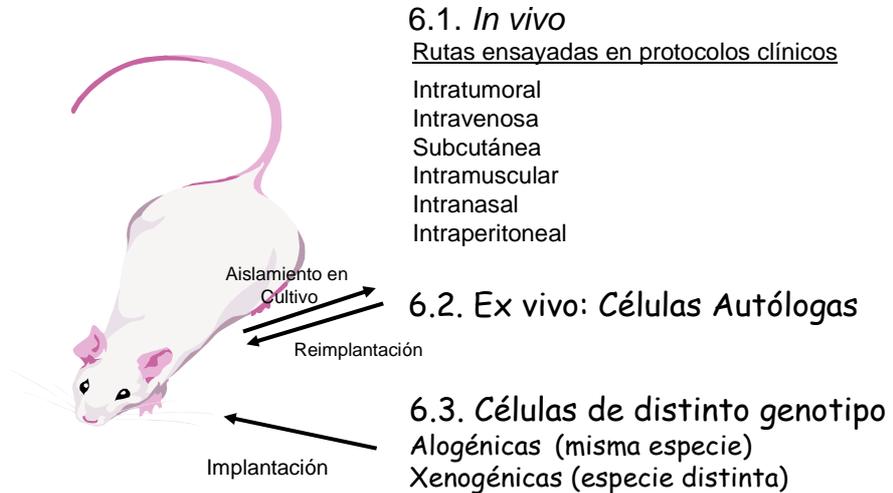
Excreción

- Filtración en el glomérulo renal de moléculas pequeñas <50 kDa y eliminación en la orina (oligonucleótidos, siRNAs)

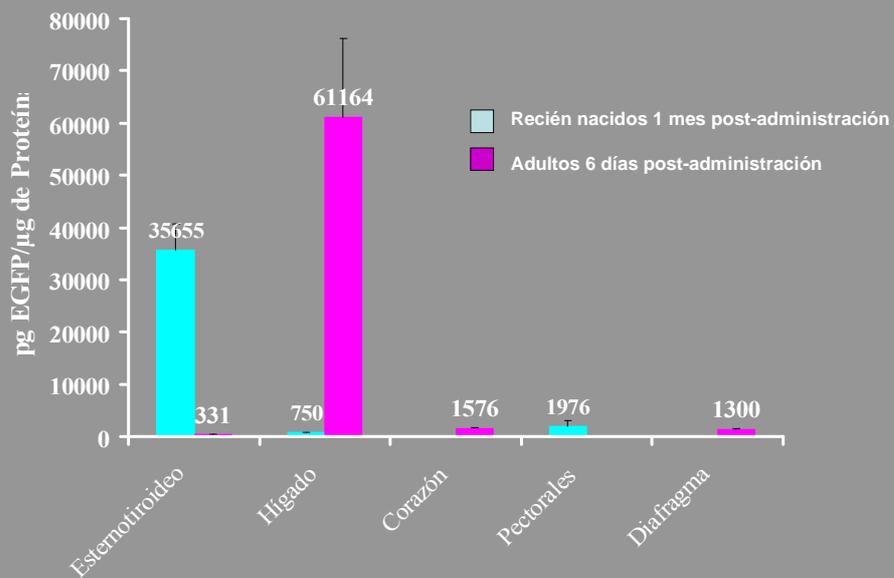


Nishikawa et al. Theoretical considerations involving the pharmacokinetics of plasmid DNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*, volume 57, Issue 5, 5 (2005)

6. TIPO DE ADMINISTRACIÓN

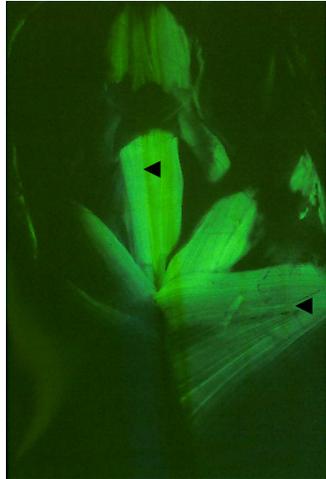


Administración IntraVascular en ratones, recién nacidos o adultos, del gen GFP
Inyección en la vena ocular de Adenovirus AdCMV-GFP
Cuantificación de la proteína en los tejidos después de la transferencia



IMÁGENES DE BIODISTRIBUCIÓN

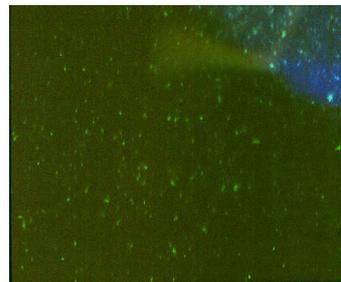
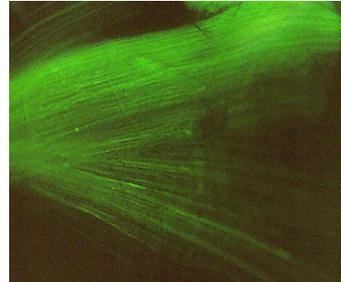
Administración IntraVascular en ratones neonatos (vena ocular)
de un adenovirus que transporta el gen marcador de la proteína verde
fluorescente (AdCMV-GFP)



esternóideo

pectoralis

Hígado ▶



7. LOS VECTORES DE TRANSFERENCIA

TIPOS

NO VIRALES

Liposomas
Policationes
Pistola de DNA
Electroporación

VIRALES (principales virus)

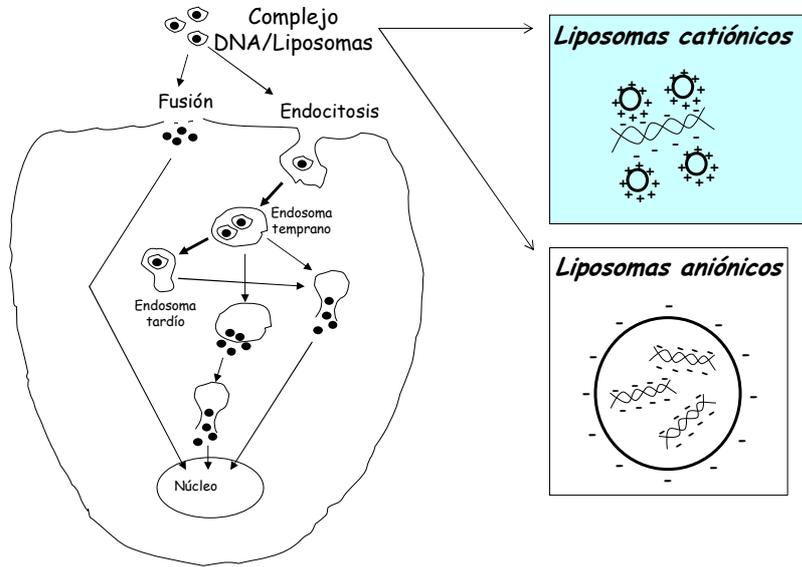
Retrovirus
oncoretrovirus
lentivirus
Adenovirus
Virus adenoasociados

LIMITACIONES

Capacidad de transporte
Capacidad de reconocimiento celular específico
Capacidad de captación celular y liberación al citosol
Capacidad de transporte al núcleo
Farmacocinética

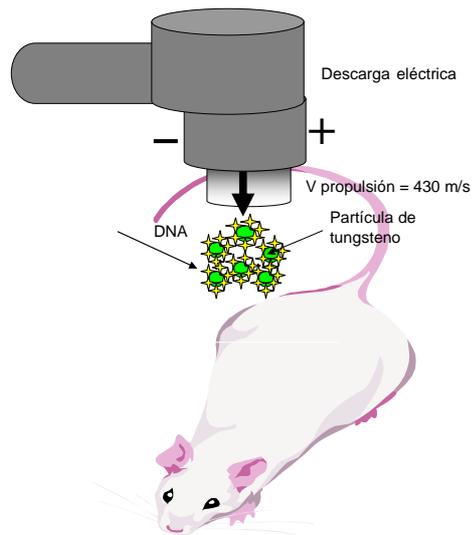
7. LOS VECTORES DE TRANSFERENCIA

Liposomas



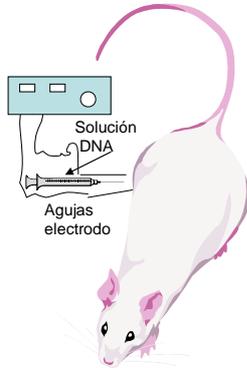
7. LOS VECTORES DE TRANSFERENCIA

Pistola de DNA



7. LOS VECTORES DE TRANSFERENCIA

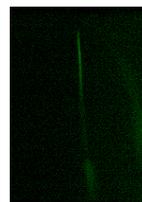
Electroporación de DNA



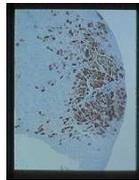
Visualización de la transferencia del gen de la GFP a ratones adultos por inyección i.m. de un plásmido

Electroporación+ Inyección

Inyección



Observación en lupa de la fluorescencia del músculo tratado 6 días post-administración



Immunolocalización de la GFP en secciones de músculo

7. LOS VECTORES DE TRANSFERENCIA

Vectores virales:

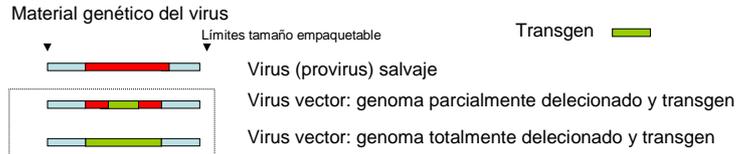
Características

- Un virus es un biosistema elemental que empaqueta ácidos nucleicos (DNA o RNA de cadena doble o simple) e interacciona con células hospedadoras.
- Los virus vectores son virus deficientes: a los que se ha eliminado una parte o todo su genoma (si es posible) para evitar que completen el ciclo de vida en cualquier célula hospedadora.
- Los genes virales eliminados, si son indispensables, son proporcionados de manera separada (en *trans*) a células cultivadas en el laboratorio. En estas células se multiplican los ácidos nucleicos virales y se encapsidan formando partículas víricas.
- Los virus vectores llevan insertado el gen a transferir flanqueado por los mínimos elementos de DNA/RNA necesarios para replicar el ácido nucleico y empaquetarlo en la cápside proteica.

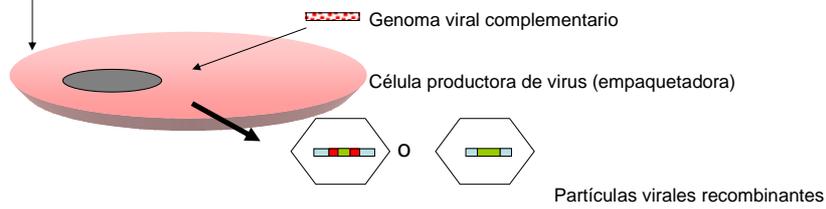
Etapas en la transferencia con vectores víricos



1. Construcción del genoma viral recombinante (DNA doble cadena) con el transgen (corte y ligación o recombinación)



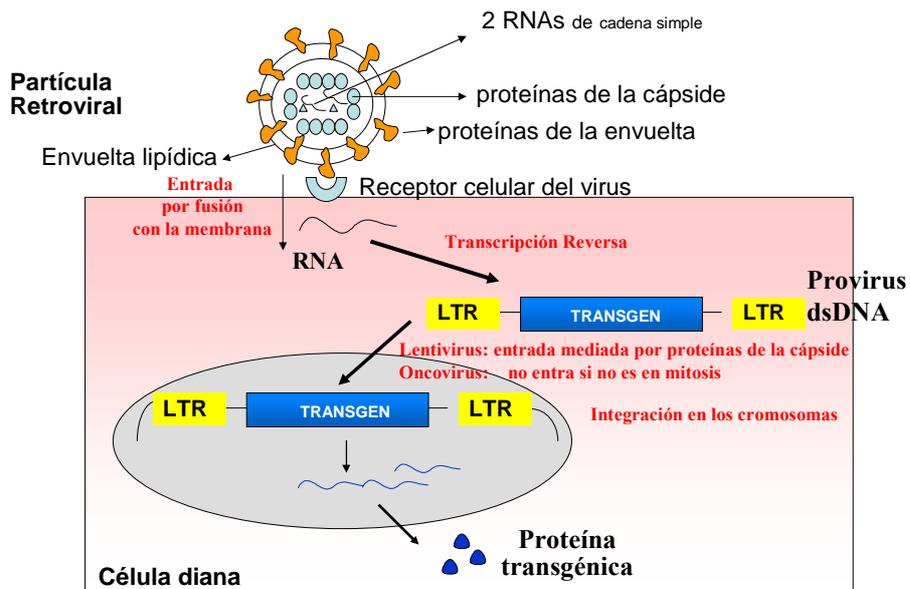
2. Producción de virus en células cultivadas que incluyan genes víricos complementarios



3. Transducción de la célula (tejido) diana con las partículas de virus vectores (los virus salvajes infectan los vectores virales transducen, esto es entran en la célula pero no se replican o propagan)

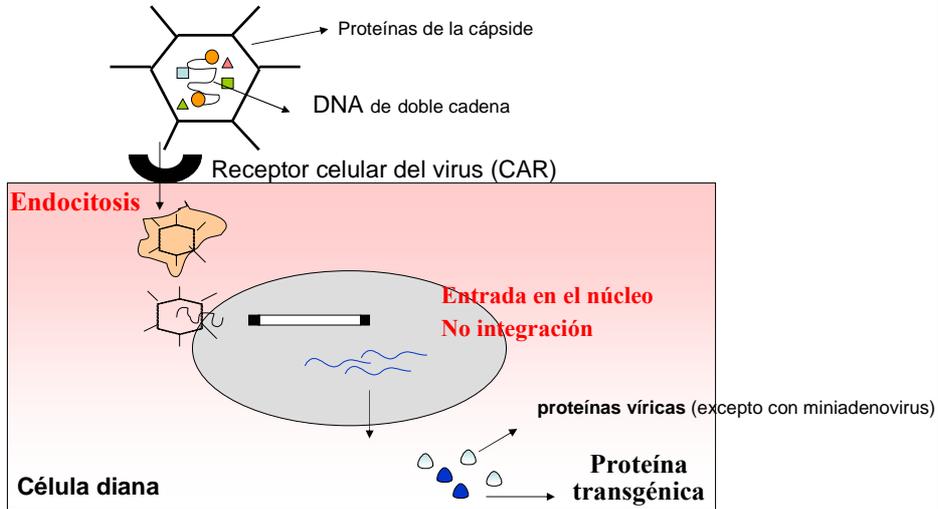
7. LOS VECTORES DE TRANSFERENCIA

Retrovirus: oncovirus y lentivirus



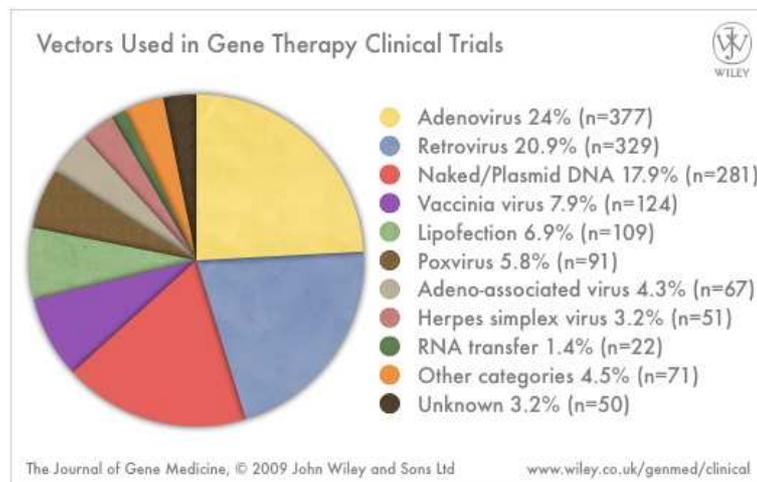
7. LOS VECTORES DE TRANSFERENCIA

Adenovirus

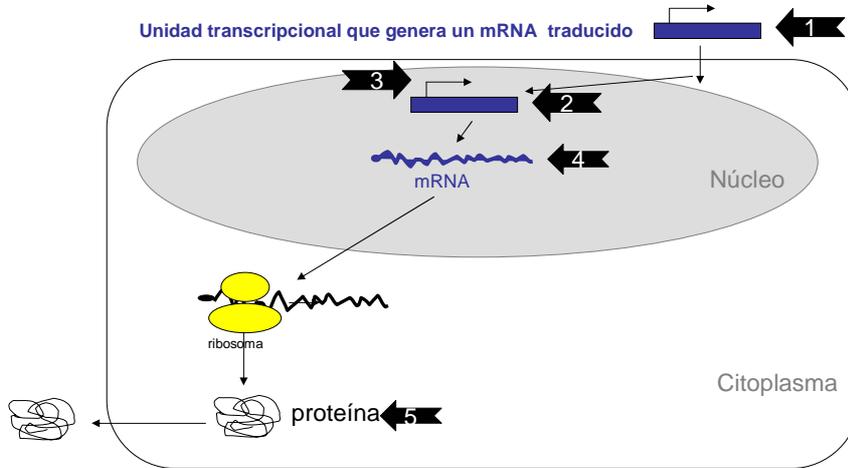


7. LOS VECTORES DE TRANSFERENCIA

APLICABILIDAD DE LOS VECTORES EN PROTOCOLOS CLÍNICOS DE TERAPIA GÉNICA



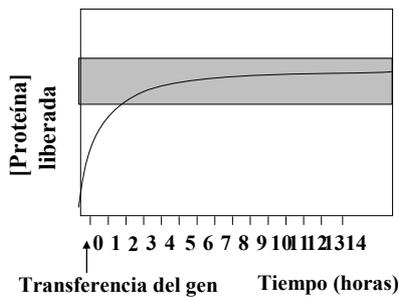
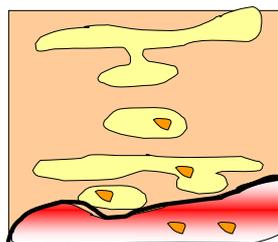
8. DOSIFICACIÓN: FACTORES RELACIONADOS CON LA UNIDAD TRANSCRIPCIONAL



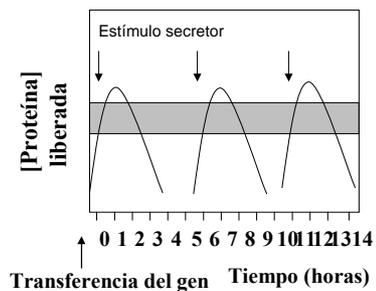
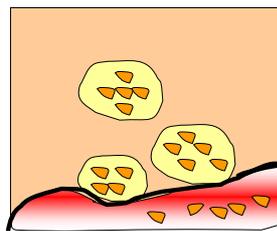
- 1 Número de moléculas de DNA administradas
- 2 Número de moléculas de DNA intactas en el citoplasma o núcleo
- 3 Control transcripcional
- 4 mRNA estabilidad
- 5 Estabilidad de la proteína, localización intracelular o extracelular (secreción) y rango terapéutico

Vías y mecanismos de secreción de la proteína

Secreción constitutiva
Todas las células

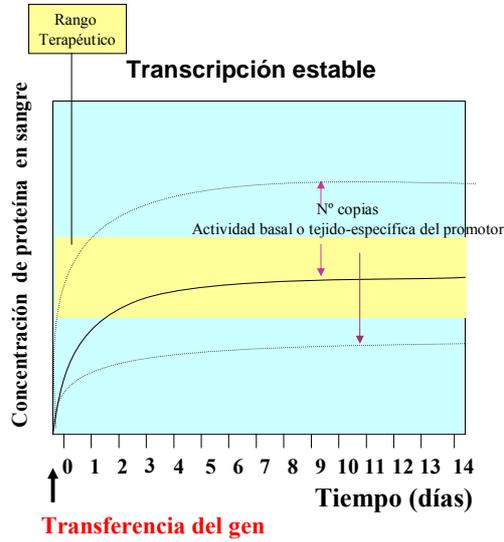


Secreción regulable
Células especializadas con vesículas secretoras

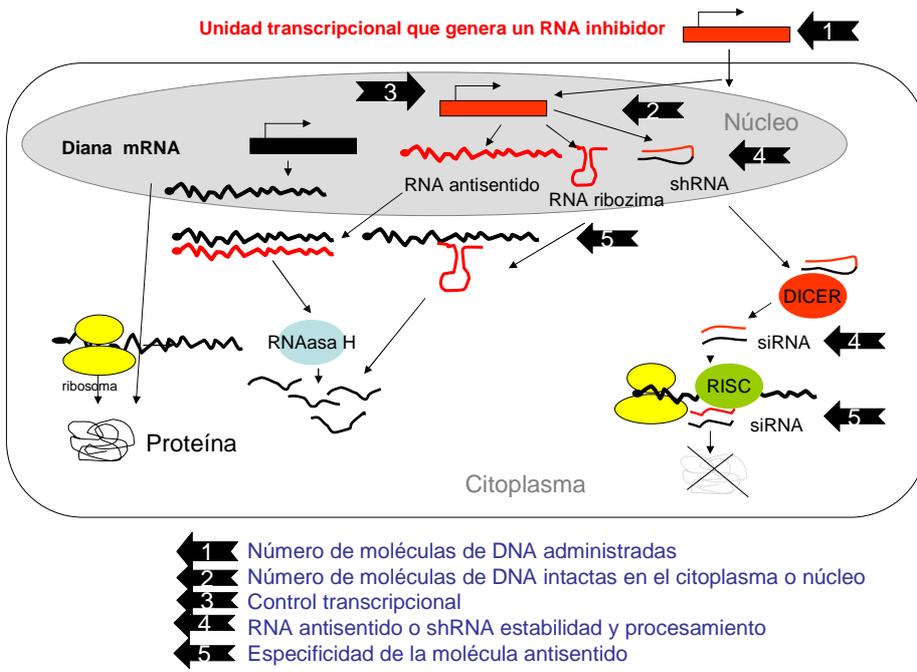


8. DOSIFICACIÓN

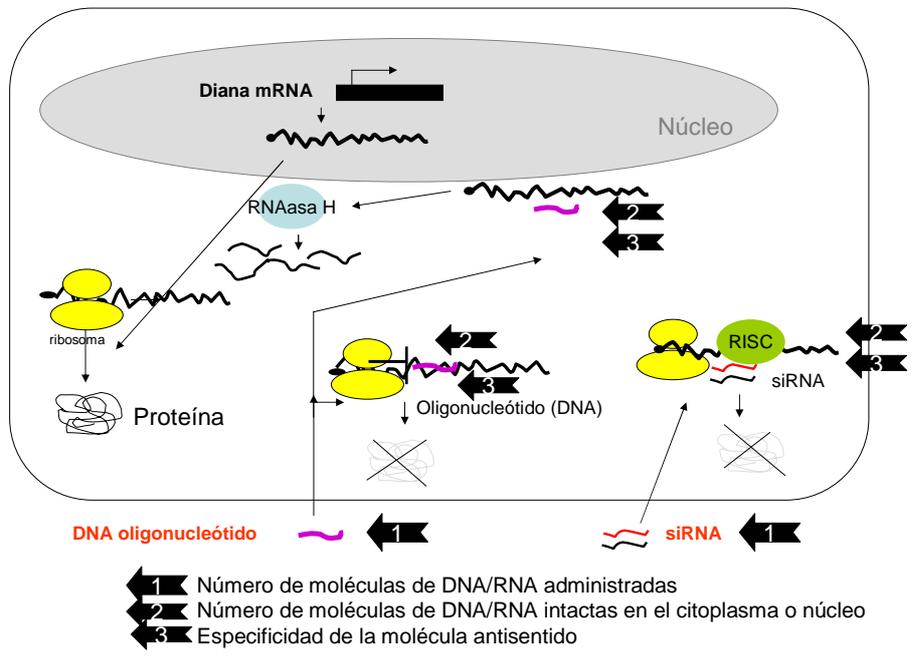
Rango terapéutico de la proteína



8. DOSIFICACIÓN: FACTORES RELACIONADOS CON LA UNIDAD TRANSCRIPCIONAL



8. DOSIFICACIÓN: FACTORES RELACIONADOS CON MOLÉCULAS ANTISENTIDO NO TRANSCRITAS



9. TOXICIDAD

- Toxicidad celular del vector.

- Inmunogenicidad e inflamación en administraciones *in vivo*.

Innata: plásmidos con motivos CpG no metilados y cápsides proteicas de virus (adenovirus y virus adenoasociados).

Adaptativa: cápsides proteicas de adenovirus y virus adenoasociados, proteínas víricas expresadas en adenovirus o el transgen si es un neoantígeno.

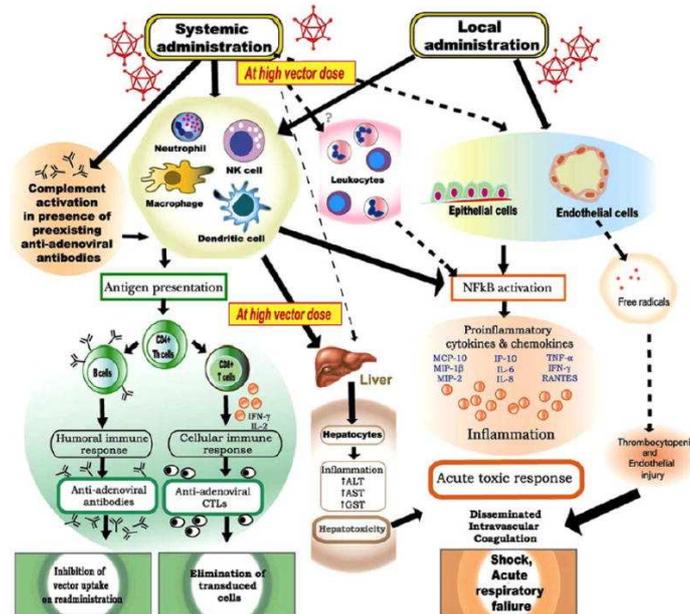
La respuesta inmune lleva a la destrucción de la célula que expresa el transgen, los anticuerpos neutralizantes impiden la readministración y la respuesta inflamatoria tiene efectos perjudiciales.

- Genotoxicidad: la inserción del DNA administrado en el genoma puede modificar la expresión de genes celulares y causar la transformación celular.

- Fenotoxicidad: producción de RNAs codificantes o inhibidores que modifican el fenotipo celular.

9. TOXICIDAD

First inoculation with an adenoviral vector



Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity. *Curr Gene Ther.* 2006 Apr;6(2):215-26.

BASES DE DATOS DE TERAPIA GÉNICA

- Human genome project information.

http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/genetherapy.shtml#status

-The Journal of Gene Medicine: Gene therapy clinical trials worldwide

<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

REVISTAS ESPECIALIZADAS EN TERAPIA GÉNICA

- * Human Gene Therapy
- * Gene Therapy
- * Cancer Gene Therapy
- * Current Gene Therapy
- * The Journal of Gene Medicine

SOCIEDADES CIENTÍFICAS DE TERAPIA GÉNICA

- * Sociedad española de terapia génica (/www.uv.es/SETG/)
- * EWGT: European Society of Gene Therapy
- * The American Society of Gene Therapy