

Vectores virales para usos de Terapia Génica

Manel Cascalló, Ph.D.

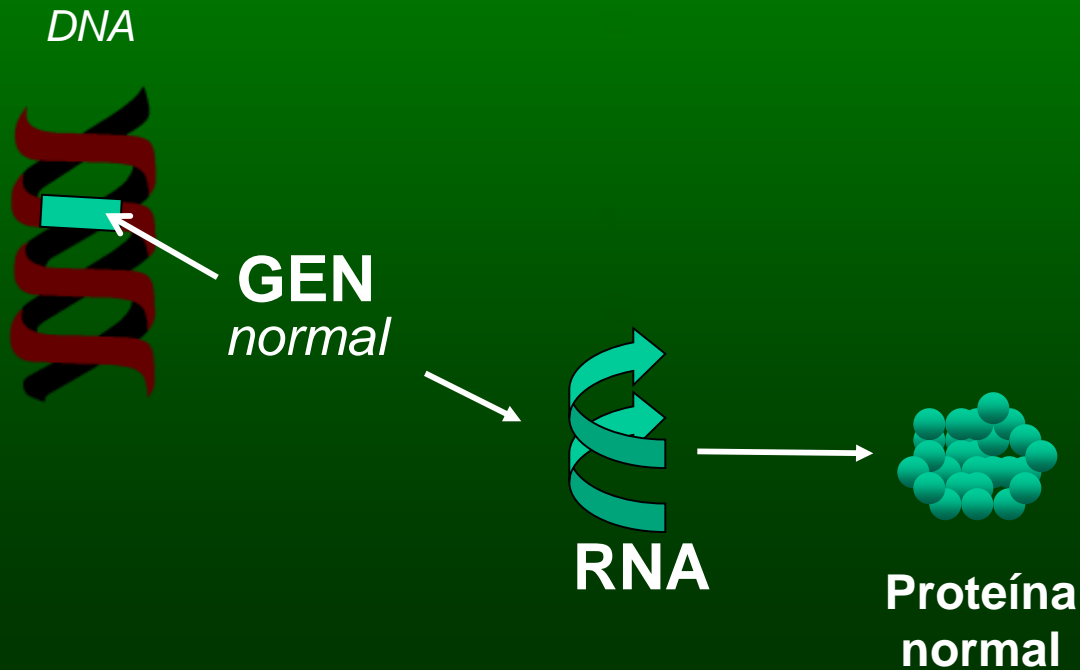


**Grup de Terapia Gènica
Laboratorio de Investigación Translacional
Hospital Duran i Reynals**

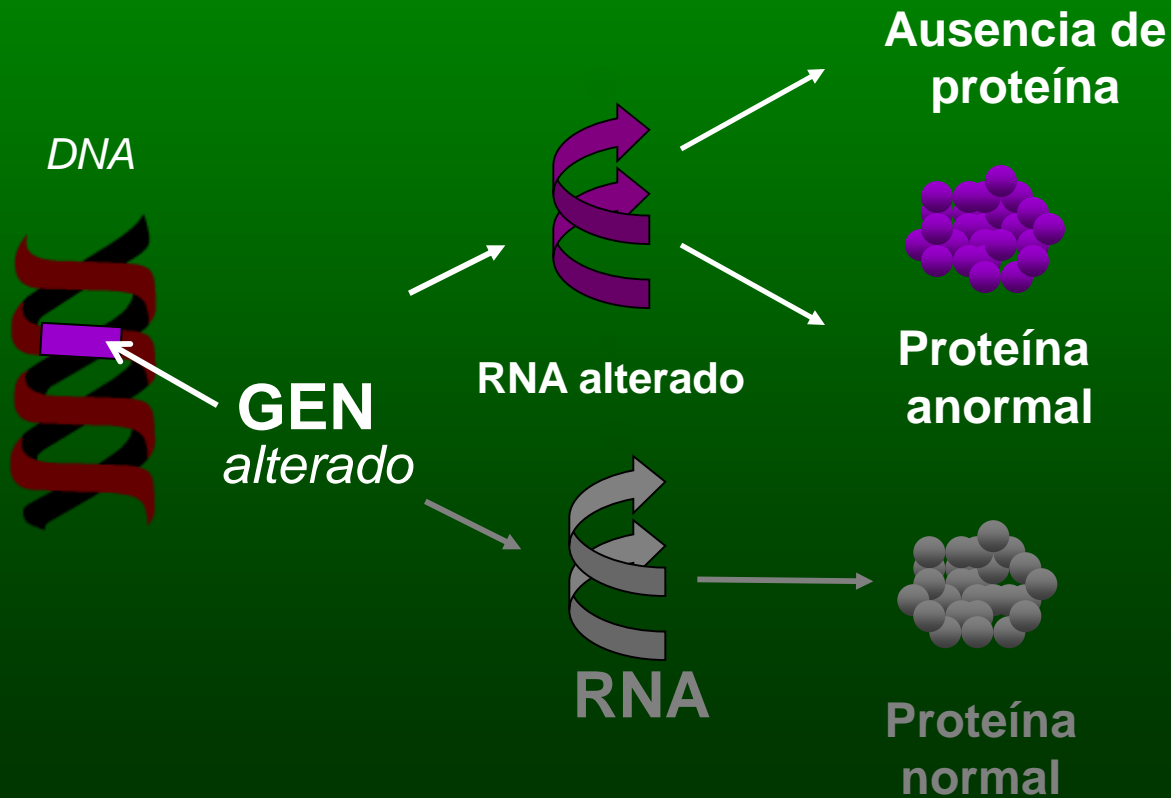
Terapia génica: definición

Reintroducción de material genético capaz de curar o atenuar la progresión de una enfermedad.

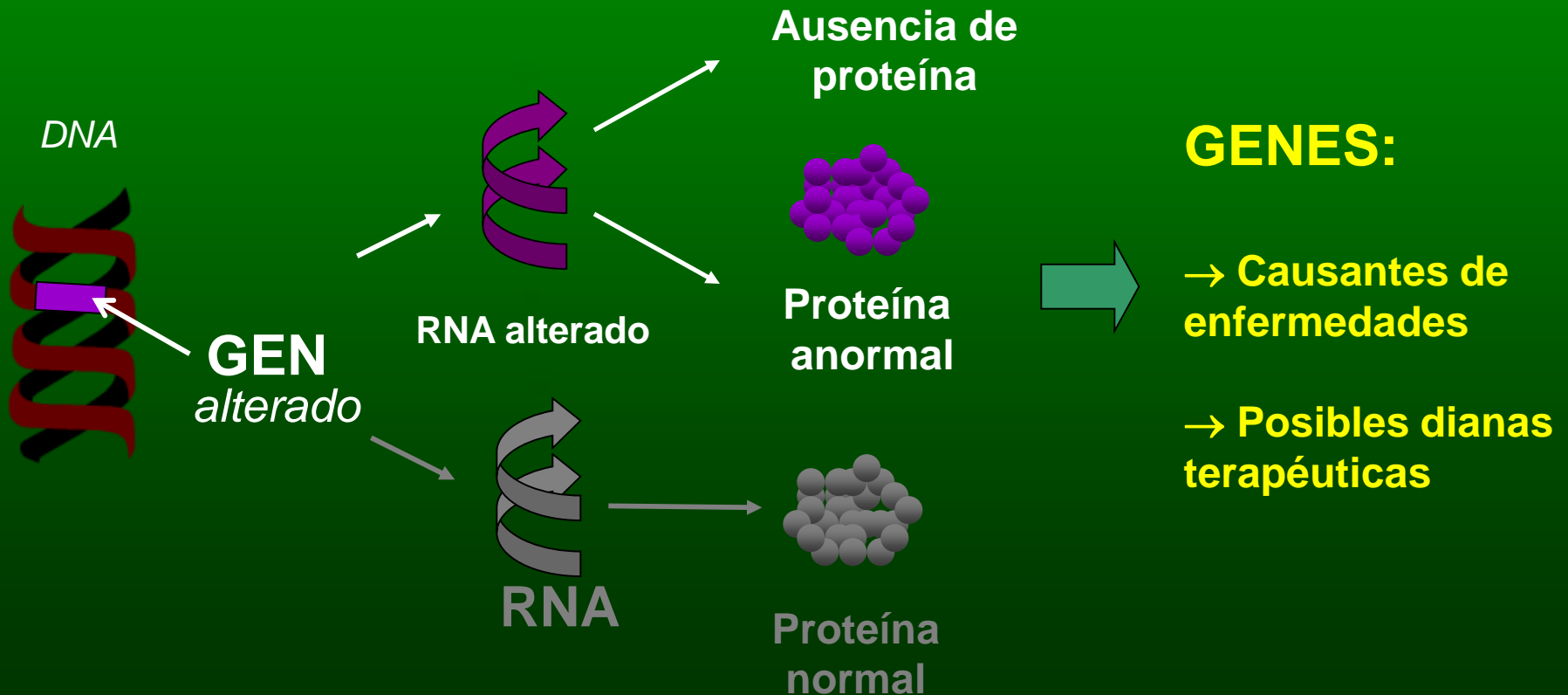
Terapia génica: definición



Terapia génica: definición



Terapia génica: definición



Terapia génica: definición

Reintroducción de material genético capaz de curar o atenuar la progresión de una enfermedad.

→ mayor especificidad de acción

Terapia génica: definición

Reintroducción de material genético capaz de curar o atenuar la progresión de una enfermedad.

→ mayor especificidad de acción

→ mayor potencial terapéutico, al inducir cambios fundamentales en los parámetros fenotípicos de la enfermedad

Terapia génica: avances tecnológicos

**Aislamiento e
identificación de
genes terapéuticos**

**Desarrollo de
vectores de
transferencia**

Terapia génica: barreras extracelulares

BARRERAS DE TEJIDO

- * Membranas conectivas
- * Epitelio vascular
- * Membrana hemato-encefálica
- * Mielina

PROTEÍNAS INACTIVADORAS

- * Proteínas séricas de carga positiva
- * Proteasas/nucleasas

BARRERAS INMUNOLÓGICAS

- * Respuesta inmune celular
- * Anticuerpos
- * Complemento

Terapia génica: barreras intracelulares

Vector-transgen



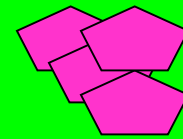
Interacción



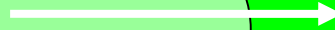
*Liberación DNA/
Transporte al núcleo*



Proteína transferida



*Localización
transgen*



Direccionalidad de la transcripción

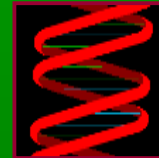
Características del vector ideal

- **expresión prolongada del transgén**
- **inmunológicamente inerte**
- **expresión regulable**
- **selectividad hacia el tipo celular deseado**
- **capacidad del transgén a incorporar**
- **fácil producción y a títulos elevados**
- **integración**
- **baja transmisibilidad a células germinales**

Vectores usados en terapia génica

1.- no virales

- DNA “desnudo”



- liposomas catiónicos



- condensados de DNA



- electroporación

- pistolas de DNA

sistemas “físicos”

Vectores usados en terapia génica

1.- *no virales*

- DNA “desnudo”
- liposomas catiónicos
- condensados de DNA
- electroporación
- pistolas de DNA

2.- *virales* → clasificables en base a:

- capacidad integrativa
- capacidad replicativa

Vectores usados en terapia génica

1.- no virales

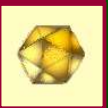
- DNA “desnudo”
- liposomas catiónicos
- condensados de DNA
- electroporación
- pistolas de DNA

2.- virales → clasificables en base a:

- capacidad integrativa
- capacidad replicativa

Integrativos:

- retrovirus
- lentivirus
- virus adenoasociados



no integrativos

- adenovirus
- *Herpes simplex virus*



Vectores usados en terapia génica

1.- *no virales*

- DNA “desnudo”
- liposomas catiónicos
- condensados de DNA
- electroporación
- pistolas de DNA

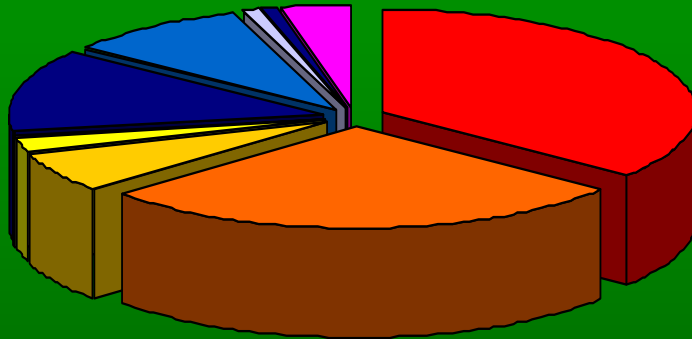
2.- *virales* → clasificables en base a:

- capacidad integrativa
- capacidad replicativa

vectores replicativos

vectores no replicativos

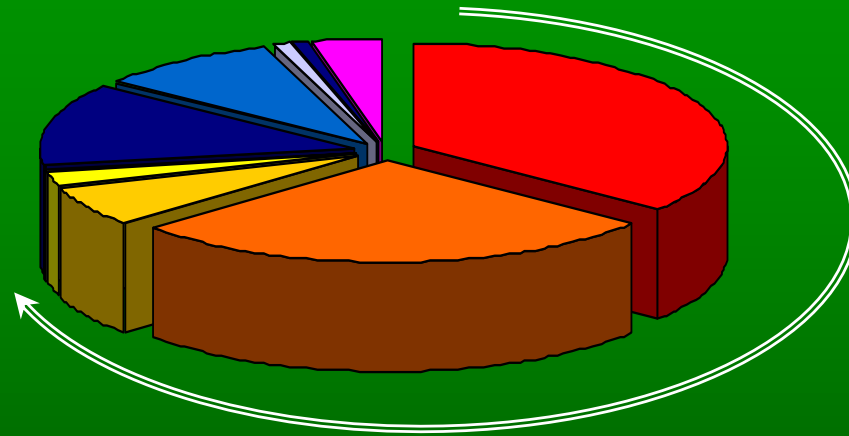
Terapia génica: vectores usados en protocolos clínicos



Número
de protocolos

■ <i>Retrovirus</i>	212	35,8 %
■ <i>Adenovirus</i>	164	27,7 %
■ <i>Pox-virus</i>	37	6,2 %
■ <i>Virus Adeno-asociados</i>	13	2,2 %
■ <i>Herpes simplex virus</i>	5	0,5 %
■ <i>Lipofección</i>	77	13,0 %
■ <i>DNA desnudo</i>	55	9,3 %
■ <i>Transferencia de RNA</i>	5	0,8 %
■ <i>Pistola de DNA</i>	5	0,8 %
■ <i>N/C</i>	22	3,7 %

Terapia génica: vectores usados en protocolos clínicos



Número de protocolos

72,4 %

■ <i>Retrovirus</i>	212	35,8 %
■ <i>Adenovirus</i>	164	27,7 %
■ <i>Pox-virus</i>	37	6,2 %
■ <i>Virus Adeno-asociados</i>	13	2,2 %
■ <i>Herpes simplex virus</i>	5	0,5 %
■ <i>Lipofección</i>	77	13,0 %
■ <i>DNA desnudo</i>	55	9,3 %
■ <i>Transferencia de RNA</i>	5	0,8 %
■ <i>Pistola de DNA</i>	5	0,8 %
■ <i>N/C</i>	22	3,7 %

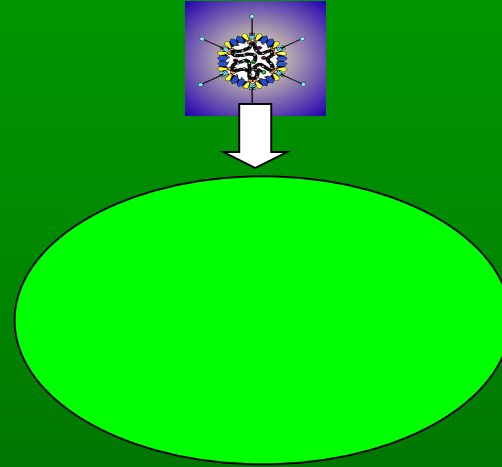
Del virus al vector vírico: ciclo viral

1.- INFECCIÓN

2.- REPLICACIÓN

Del virus al vector vírico: ciclo viral

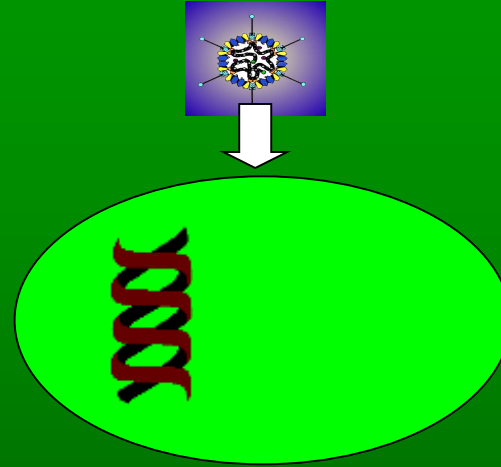
1.- INFECCIÓN



2.- REPLICACIÓN

Del virus al vector vírico: ciclo viral

1.- INFECCIÓN

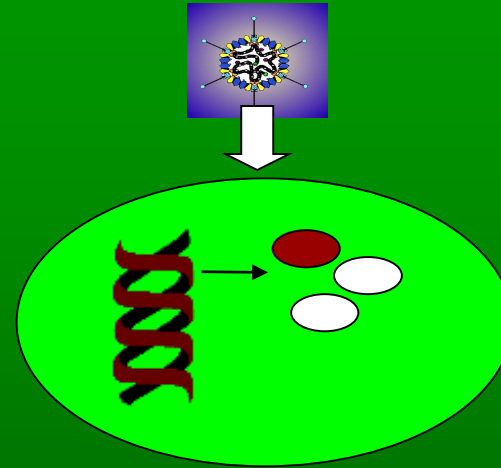


*introducción
del genoma viral*

2.- REPLICACIÓN

Del virus al vector vírico: ciclo viral

1.- INFECCIÓN



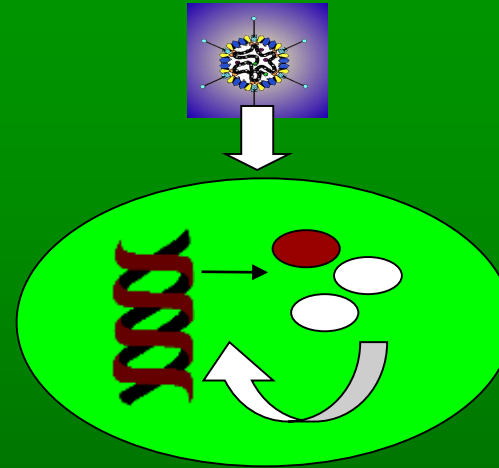
*introducción
del genoma viral*

*expresión
de proteínas
tempranas
reguladoras*

2.- REPLICACIÓN

Del virus al vector vírico: ciclo viral

1.- INFECCIÓN



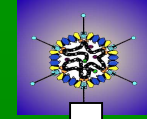
*introducción
del genoma viral*

*expresión
de proteínas
tempranas
reguladoras*

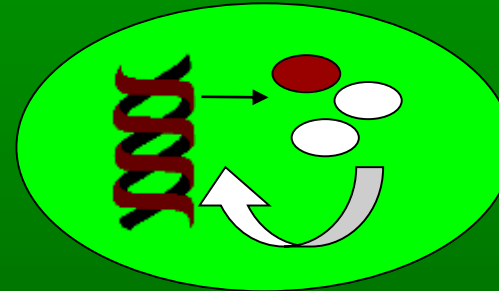
2.- REPLICACIÓN

Del virus al vector vírico: ciclo viral

1.- INFECCIÓN

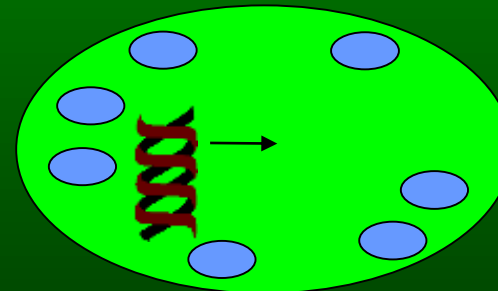


*introducción
del genoma viral*



*expresión
de proteínas
tempranas
reguladoras*

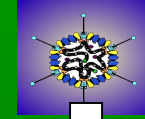
2.- REPLICACIÓN



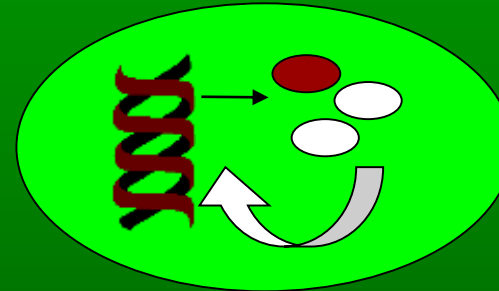
*expresión
de proteínas
estructurales*

Del virus al vector vírico: ciclo viral

1.- INFECCIÓN

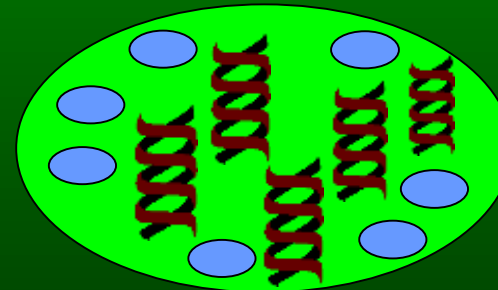


*introducción
del genoma viral*



*expresión
de proteínas
tempranas
reguladoras*

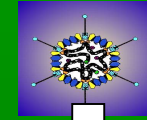
2.- REPLICACIÓN



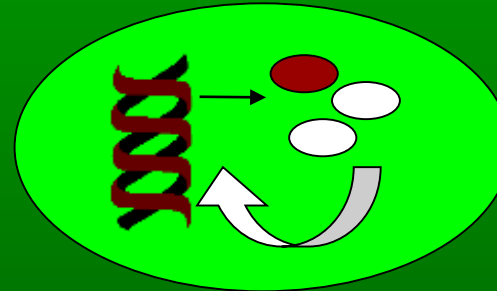
*expresión
de proteínas
estructurales
+
replicación
del DNA*

Del virus al vector vírico: ciclo viral

1.- INFECCIÓN

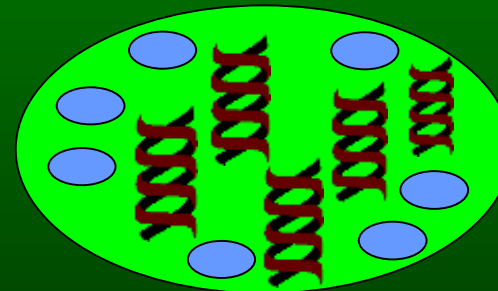


*introducción
del genoma viral*

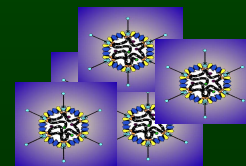


*expresión
de proteínas
tempranas
reguladoras*

2.- REPLICACIÓN

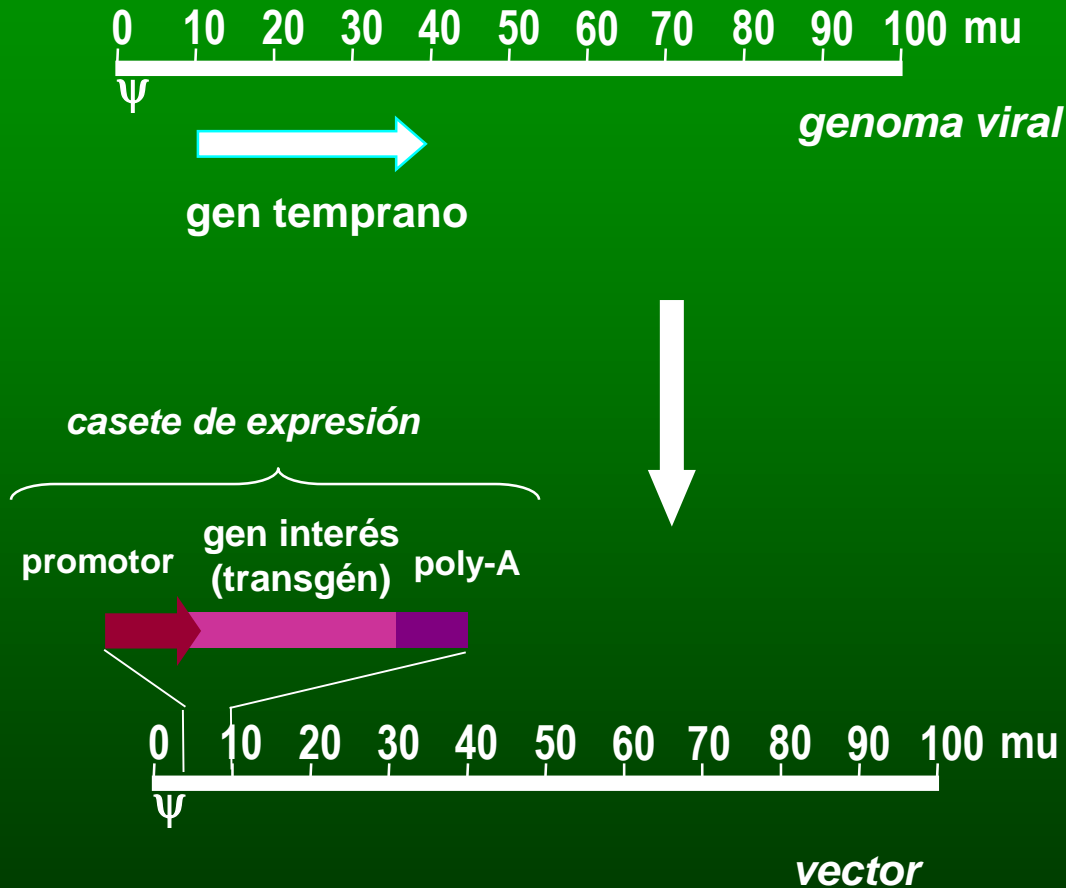


*expresión
de proteínas
estructurales
+
replicación
del DNA*

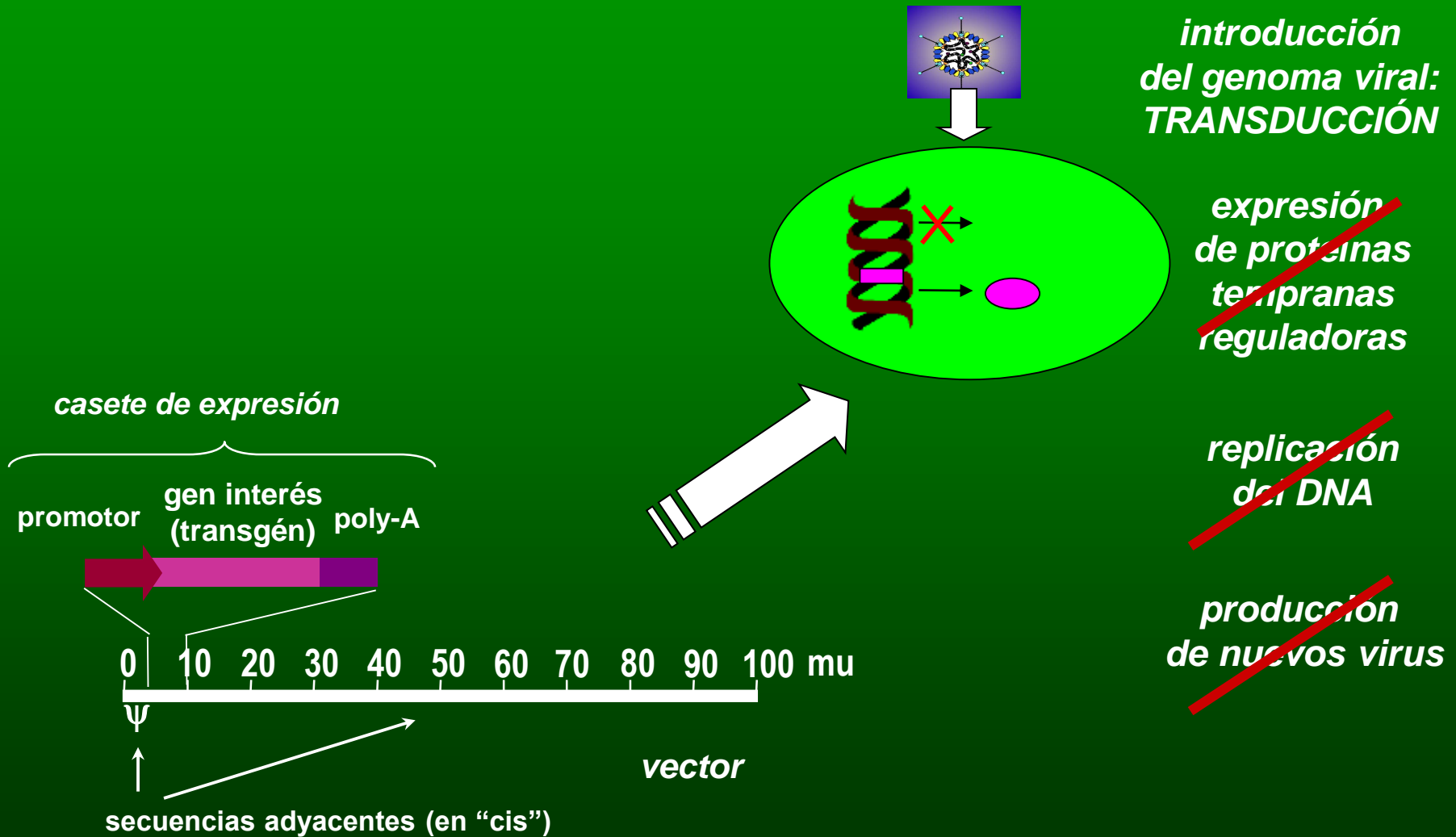


*producción
de nuevos virus*

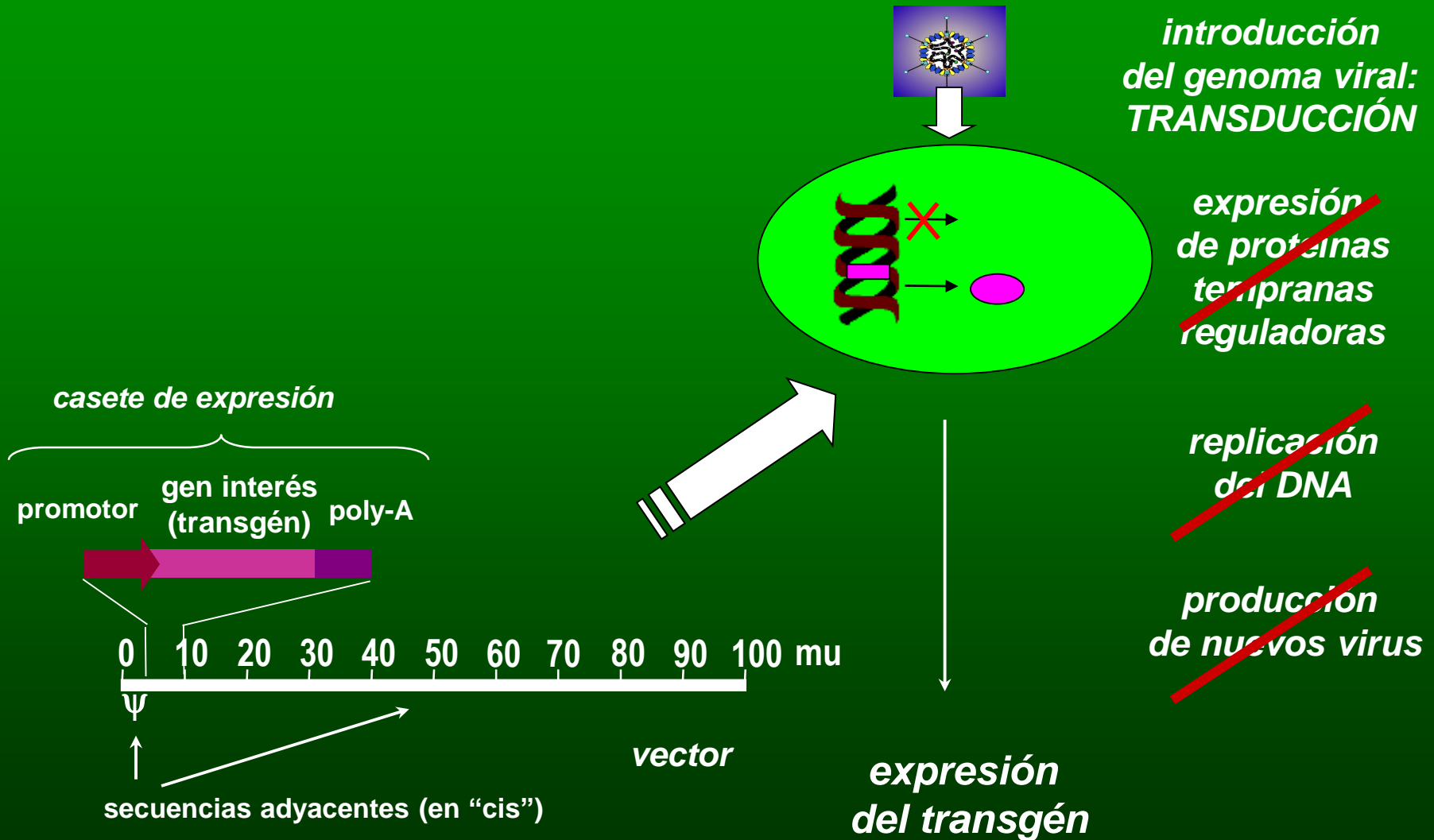
Del virus al vector vírico: construcción de vectores



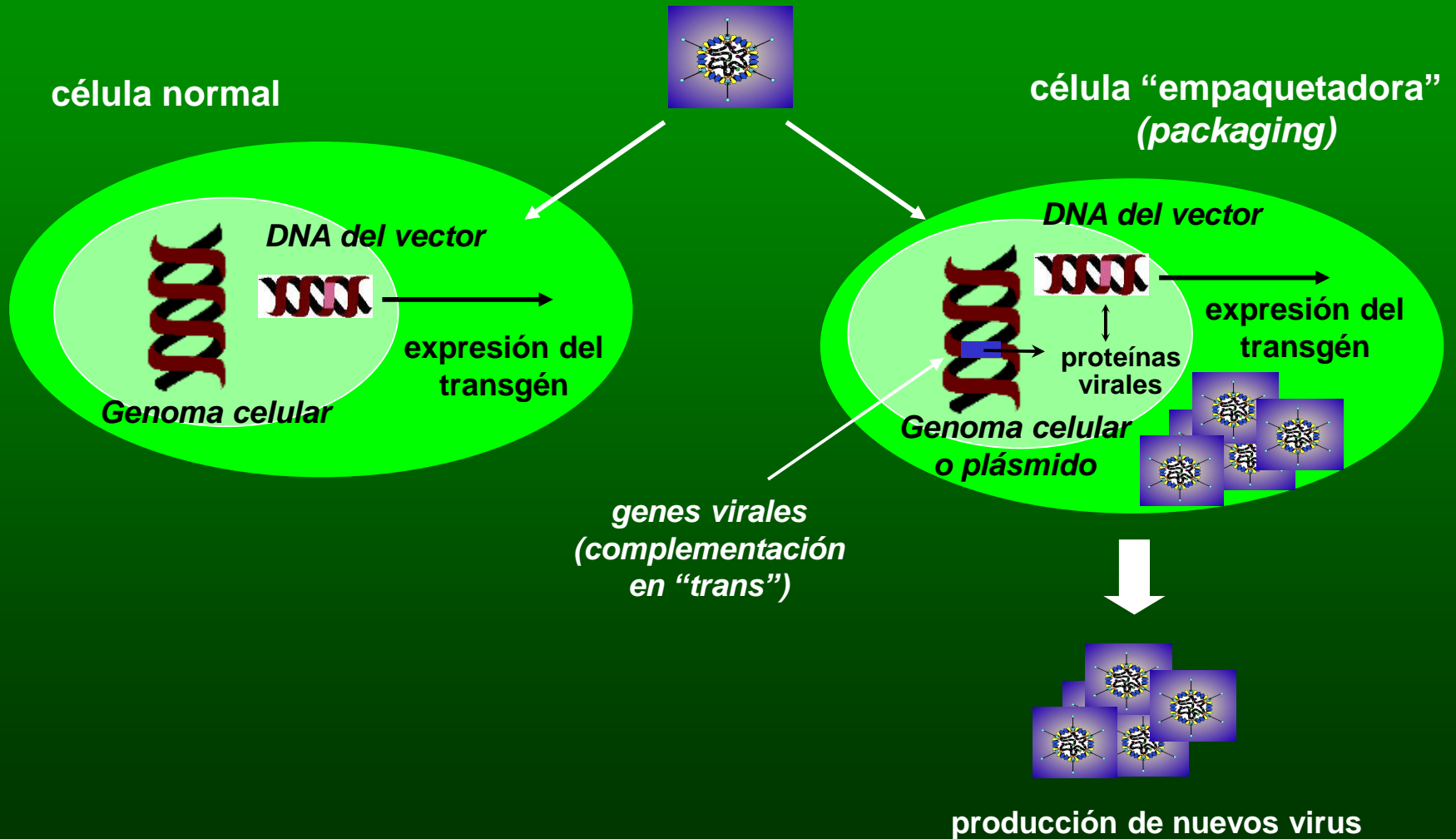
Del virus al vector vírico: construcción de vectores



Del virus al vector vírico: construcción de vectores



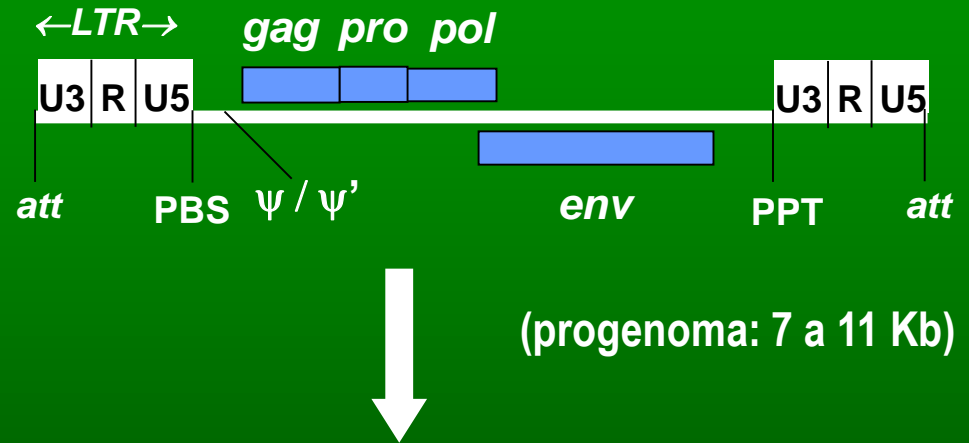
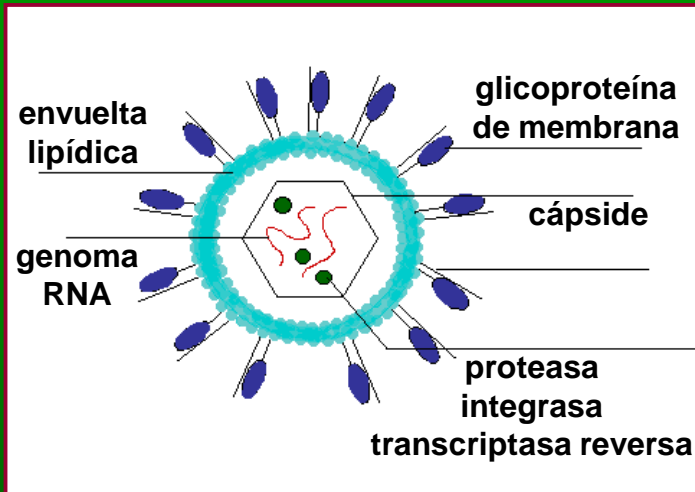
Del virus al vector vírico: construcción de vectores



Problemática de la construcción de vectores

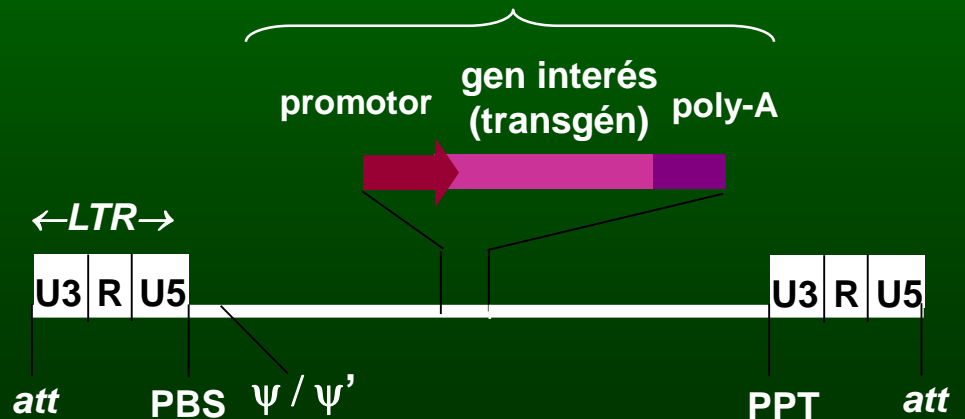
- probabilidad de recombinación entre genomas para generación de partículas competentes para replicación (RCV)
- complejidad del genoma viral: desbalance de la producción en “cis” y en “trans”
- retención de proteínas virales en los vectores que actúan como inmunógenas
- toxicidad de las proteínas virales en las células empaquetadoras
- difícil escalado de los procesos

Vectores retrovirales (Rv)



(progenoma: 7 a 11 Kb)

casete de expresión



Vectores retrovirales (Rv): propiedades

Capacidad máxima del inserto: 8 kb

Integración al azar en el genoma huésped (progenoma)

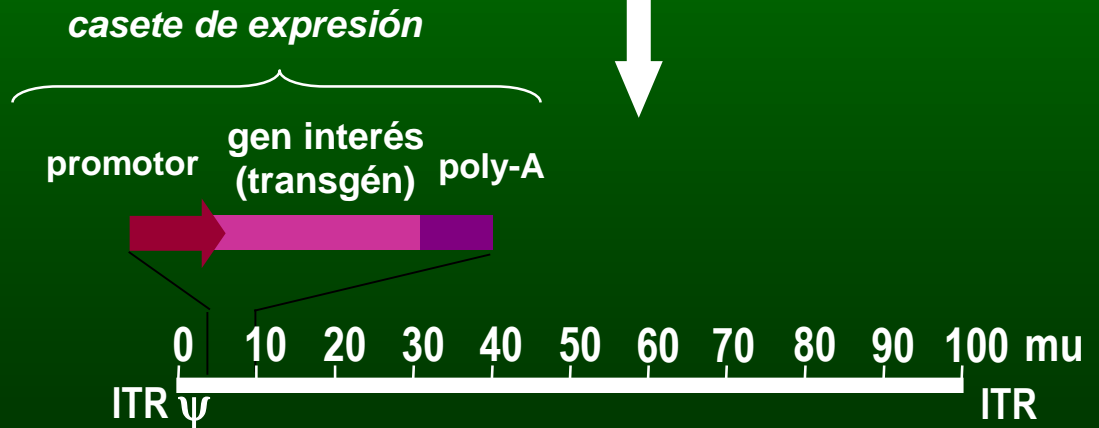
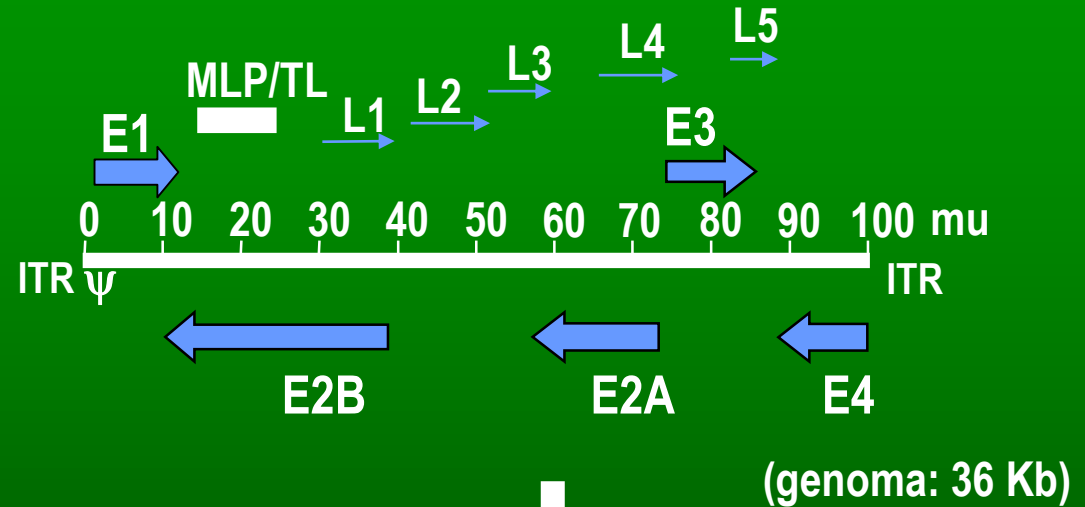
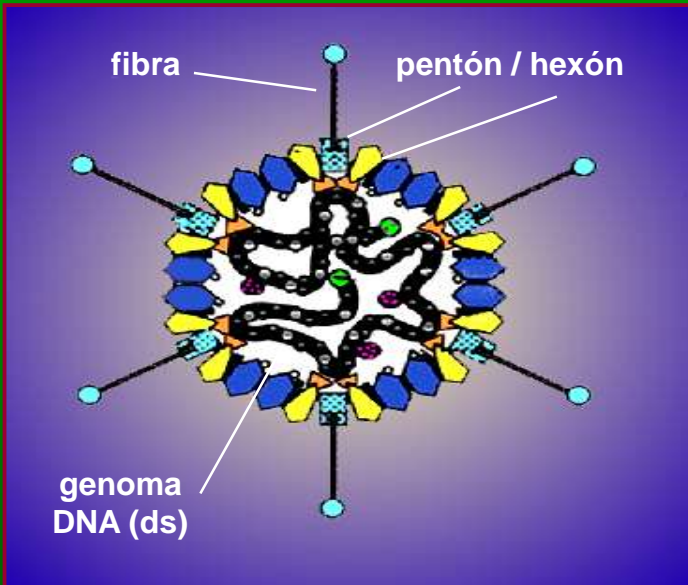
Necesidad de división celular para una transducción efectiva
(excepción: familia de los lentivirus)

Poco inmunogénicos

Mucha experiencia clínica

Ejemplos: Familia oncotrópicos: M-MLV
Familia lentivirus: HIV-1, SIV

Vectores adenovirales (Ad)



Vectores adenovirales (Ad): propiedades

Capacidad máxima del inserto: 8 kb

No integración: se mantiene de forma episómica

Se pueden obtener con altos títulos ($>1.10^{13}$ vp/ml)

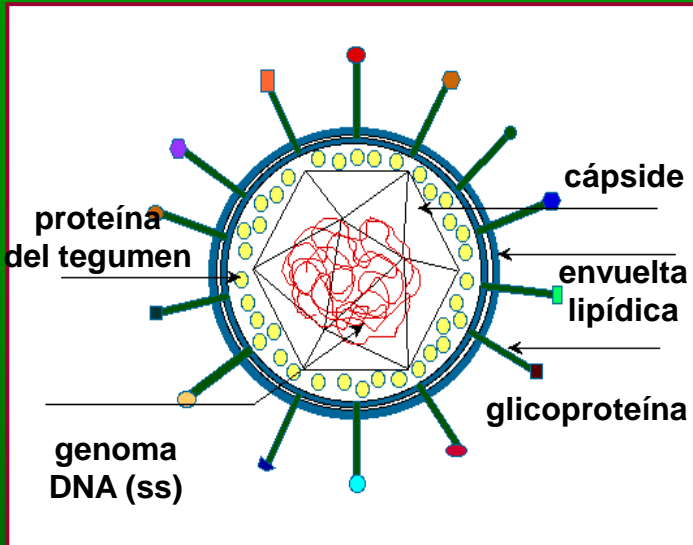
Muy inmunogénicos

Tropismo para células de origen epitelial, a las que infectan con alta eficiencia

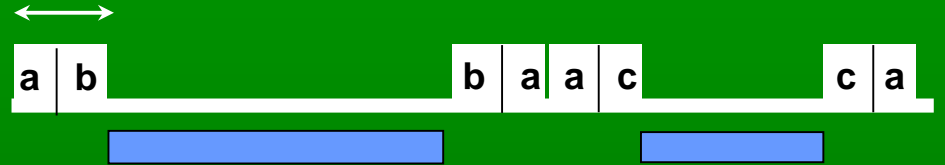
Altamente bio-seguros

Ejemplos: Ad-2
Ad-5

Vectores derivados de *Herpes simplex* (HSV)



Elementos repetidos
invertidos flanqueantes



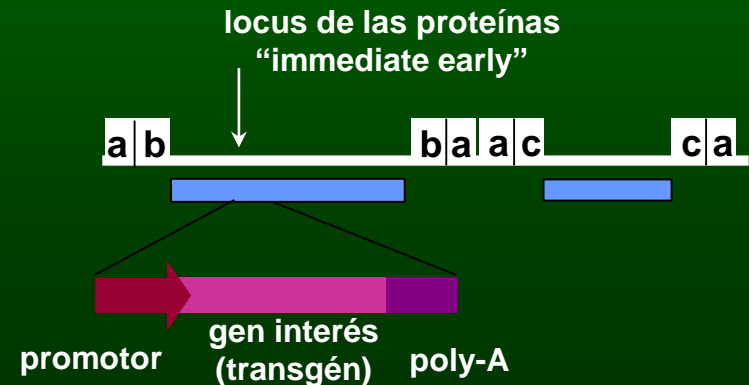
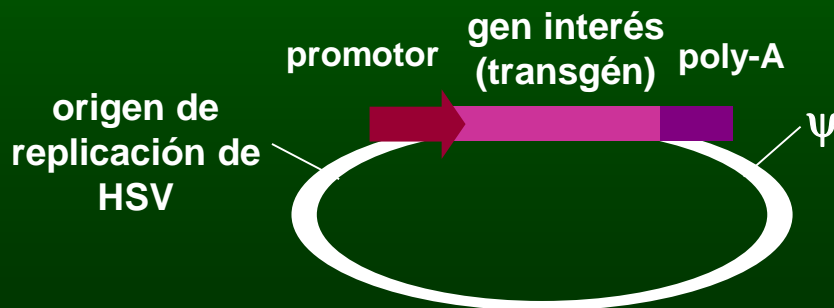
U_L : "unique long"

U_S : "unique short"

(genoma: 152 Kb)

vectores tipo
"amplicones"

vectores derivados
del genoma entero



Vectores derivados de *Herpes simplex* (HSV): propiedades

Capacidad máxima del inserto: hasta 30 kb

Se mantienen en forma de ciclo lisogénico (infección latente)

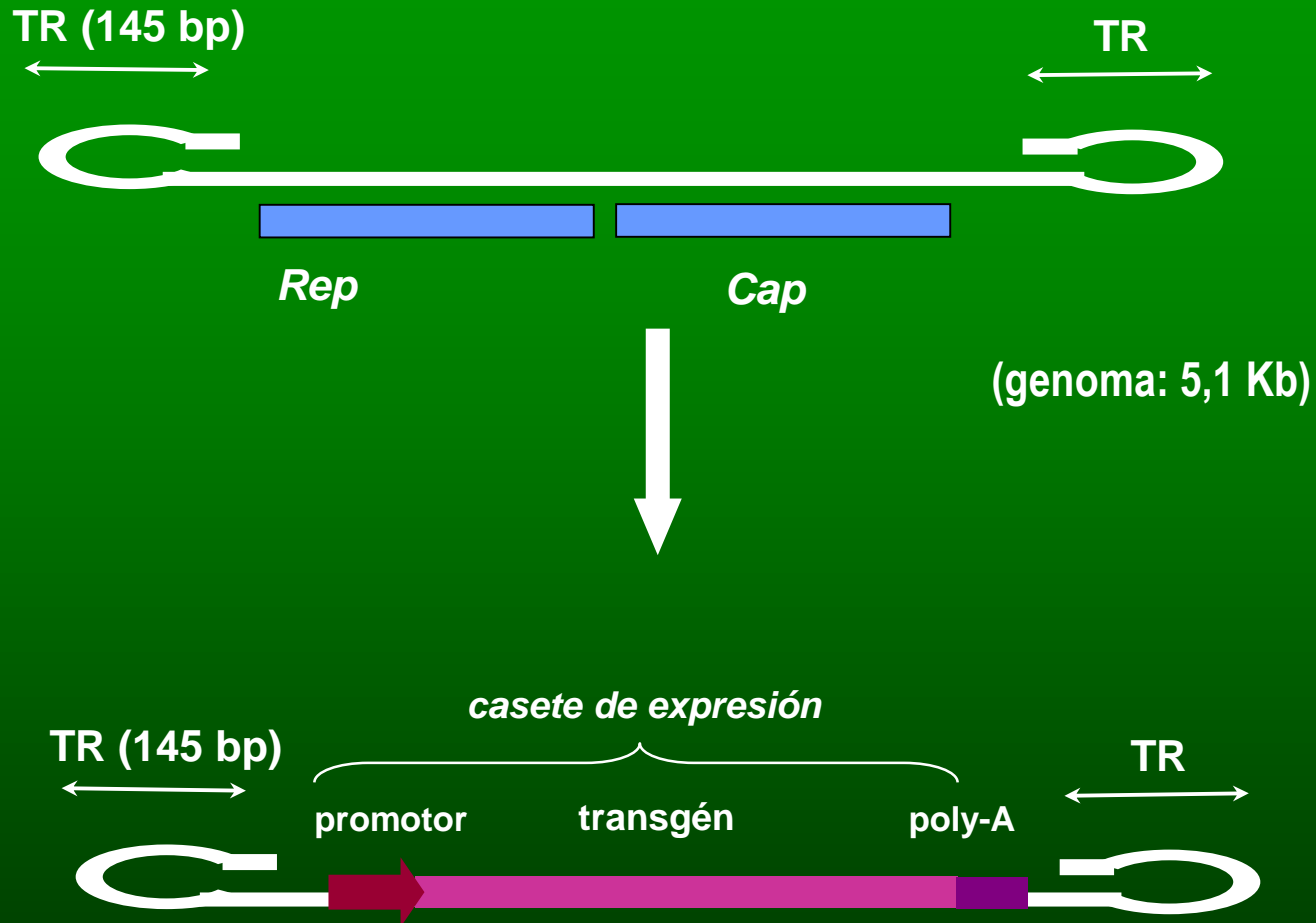
Dan lugar a una expresión del transgén prolongada

Tropismo para células neuronales

Poca experiencia clínica

Ejemplos: HSV-1
 HSV-2

Vectores derivados de virus adenoasociados (AAV)



Vectores derivados de virus adenoasociados (AAV): propiedades

Capacidad máxima del inserto: 4,5 kb

Integrativos al azar

Dan lugar a una expresión del transgén prolongada (hasta 2 años)

Forman concaténmeros, lo que permite aumentar el tamaño del inserto que pueden contener

Poca respuesta inmunológica

Bio-seguros

Ejemplos: AAV-2
 AAV-5

Comparación entre vectores virales

	<u>PROBLEMA</u>	<u>ALTERNATIVA</u>
retrovirus	Requerimiento de división Mutagénesis insertacional Obtención de títulos bajos	Vectores lentivirales Uso de proteínas de envoltorio de otros virus
lentivirus	Bio-seguridad	Vectores híbridos con no-humanos
adenovirus	Alta inmunogenicidad	Vectores “gutless” Direccionamiento del vector (“targeting”)
<i>Herpes simplex</i>	Toxicidad de la proteínas en “trans” en cél. empaquetadoras	Nuevas delecciones
Adeno-asociados	Poco tamaño del inserto Producción difícil	Uso de los concaténmeros

Vectores virales: nuevas estrategias (1)

Vectores híbridos

Vectores “mezcla” que intentan combinar propiedades de más de un vector

Ejemplos: - pseudo-tipado (substitución de una partícula de la cápside viral por otra de un virus distinto)

Ej. vectores retrovirales con la prot G del VSV

- combinación de vectores adenovirales y AAV, para obtener la capacidad integrativa

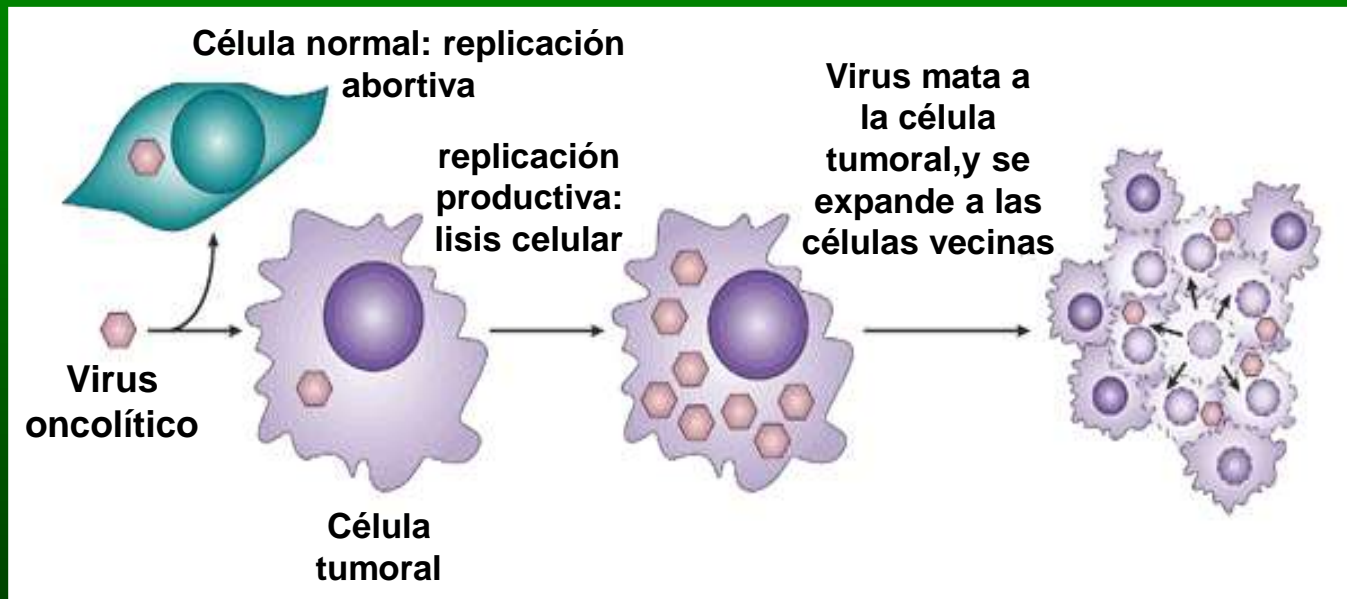
- encapsulación de genomas retrovirales en un virus adenoviral

Vectores virales: nuevas estrategias (2)

Vectores replicativos condicionales (CRV)

Vectores mutantes que actúan como virus salvajes en células con determinadas características genéticas, llevando a su muerte.

Utilidad en la terapia génica del cáncer



Ejemplos: *Adenovirus (CRA)* : ONYX-015, Ad Δ 24
Herpes virus : G207