

Ingeniería Genética II

Unidad XIV

Terapia génica in vivo y ex vivo

Todos los organismos pueden ver afectado su estado de salud (fenotipo estándar para su especie) por factores exógenos y endógenos.



ENFERMEDAD

La **enfermedad** es el **proceso patológico** originado por **diversas fuentes** o etiologías (gérmenes, agentes ambientales, factores endógenos y sus complejas interacciones que incluyen la dimensión social y cultural en los humanos), que **compromete funciones vitales** de los organismos pudiendo causar su muerte.

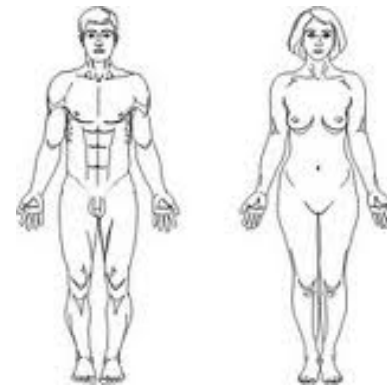
ENFERMEDAD



FITOPATOLOGÍA



VETERINARIA



MEDICINA

Ciencias que la abordan

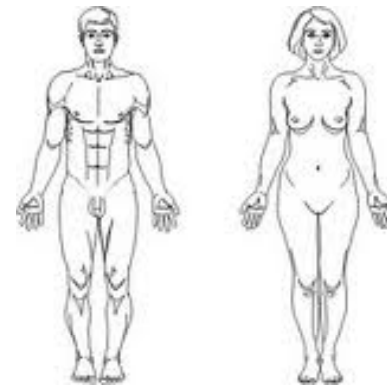
ENFERMEDAD



FITOPATOLOGÍA



VETERINARIA



MEDICINA

Ciencias que la abordan

ENFERMEDAD en humanos y otros animales



GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



Carga genética



Microbios
Tóxicos
Dieta, etc.



ENFERMEDAD

ENFERMEDAD en humanos y otros animales



GENOTIPO + **AMBIENTE** = **FENOTIPO**



Carga genética



Microbios
Tóxicos
Dieta, etc.



ENFERMEDAD



Objeto de
intervención
de la
biomedicina



Objeto de
intervención
de la medicina
tradicional



Búsqueda de
llevar el fenotipo
a su condición
estándar

Abordajes médicos y veterinarios

Tratamiento de enfermedades

ENFERMEDAD

- Estrategias **diagnósticas**



- Estrategias de **prevención**



- Estrategias **terapéuticas**



Abordajes médicos y veterinarios

Tratamiento de enfermedades

ENFERMEDAD

- Estrategias **diagnósticas**

Evaluación de signos y síntomas, identificación de marcadores genéticos, identificación de marcadores proteicos, cuantificación de metabolitos, análisis de estructuras, aislamiento de gérmenes, etc.

- Estrategias de **prevención**



- Estrategias **terapéuticas**



Abordajes médicos y veterinarios

Tratamiento de enfermedades

- Estrategias **diagnósticas**



ENFERMEDAD

- Estrategias de **prevención**

Higiene, dieta equilibrada, práctica de ejercitación física, no ingesta de tóxicos, desarrollo de vacunas, desarrollo de inmuno-estimuladores, etc.

- Estrategias **terapéuticas**



Abordajes médicos y veterinarios

Tratamiento de enfermedades

ENFERMEDAD

- Estrategias **diagnósticas**



- Estrategias de **prevención**



- Estrategias **terapéuticas**

Desarrollo de fármacos (analgésicos, antiinflamatorios, correctores de desórdenes metabólicos, antibióticos, antivirales, antitumorales, etc.), intervenciones quirúrgicas (corrección de estructuras dañadas, reemplazo de estructuras dañadas, etc.), desarrollo de proteínas terapéuticas, terapia génica, etc.

Abordajes médicos y veterinarios

Tratamiento de enfermedades: Aportes de la Ingeniería genética



ENFERMEDAD

● Estrategias diagnósticas

Evaluación de signos y síntomas, **identificación de marcadores genéticos**, **identificación de marcadores proteicos**, cuantificación de metabolitos, análisis de estructuras, aislamiento de gérmenes, etc.

● Estrategias de prevención

Higiene, dieta equilibrada, práctica de ejercitación física, no ingesta de tóxicos, **desarrollo de vacunas**, desarrollo de inmuno-estimuladores, etc.

● Estrategias terapéuticas

Desarrollo de fármacos (analgésicos, antiinflamatorios, correctores de desórdenes metabólicos, antibióticos, antivirales, antitumorales, etc.), intervenciones quirúrgicas (corrección de estructuras dañadas, reemplazo de estructuras dañadas, etc.), **desarrollo de proteínas terapéuticas**, **terapia génica**, etc.

***¿Cómo podemos definir a la
Terapia génica?***



Abordajes médicos y veterinarios

Tratamiento de enfermedades: Terapia Génica

TERAPIA GÉNICA



La **European Medicine Agency** (EMA) la define como un **producto medicinal biológico** que:

- a) Contiene una **sustancia activa** formada por un **ácido nucleico recombinante** que **regula, repara, reemplaza, suma o deleciona** una **secuencia endógena**,
- b) Y que sus **efectos terapéuticos, profilácticos o diagnósticos derivan del ácido nucleico recombinante**.

Abordajes médicos y veterinarios

Tratamiento de enfermedades: Terapia Génica

TERAPIA GÉNICA



La **Food and Drugs Administration** (FDA) la define como un **producto medicinal biológico** que:

*media sus **efectos** por medio de la **transcripción y/o traducción** de **material genético transferido y/o integrado** en el genoma del hospedador y que son **administrados** como **ácidos nucleicos, virus o microorganismos genéticamente modificados**. Los productos pueden ser usados para modificar células **in vivo**, o transferidas a células **ex vivo**.*

Abordajes médicos y veterinarios

Tratamiento de enfermedades: Terapia Génica

TERAPIA GÉNICA

A blue rectangular box with a black border and a light blue fill. Inside the box, the text "TERAPIA GÉNICA" is written in bold, black, uppercase letters. Below the box, a large blue arrow points downwards, indicating a flow or definition.

Transferencia horizontal de material genético a las células deseadas de un organismo, *in vivo* o *ex vivo*, con el fin de alterar su fenotipo

Abordajes médicos y veterinarios

Tratamiento de enfermedades: Terapia Génica

TERAPIA GÉNICA



Transferencia horizontal de material genético a las células deseadas de un organismo, *in vivo* o *ex vivo*, con el fin de alterar su fenotipo



SOMÁTICA



GERMINAL

Abordajes médicos y veterinarios

Tratamiento de enfermedades

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



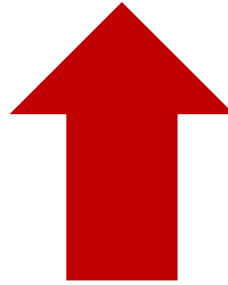
ENFERMEDAD

La **enfermedad**, como cualquier otro fenotipo, es el resultado de la **compleja interacción** entre la **carga genética individual** y el **ambiente**. La corrección de dicho estado puede ser abordado desde cualquiera de sus dos componentes centrales (genotipo y ambiente).

Abordajes médicos y veterinarios

Tratamiento de enfermedades: Terapia Tradicional

GENOTIPO + AMBIENTE = ENFERMEDAD



SALUD

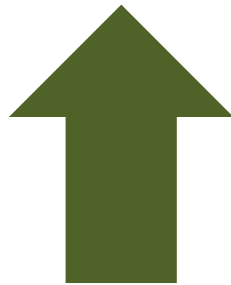
**Intervención desde el
ambiente: fármacos,
cambios de hábitos**

La **medicina tradicional** busca **modificar el fenotipo** para restaurar el estado de salud, mediante una **intervención directa sobre el ambiente**. Esto incluye desde los **hábitos de vida** (dieta, ejercitación, ingesta de tóxicos, etc.) hasta el **suministro de fármacos** adecuados.

Abordajes médicos y veterinarios

Tratamiento de enfermedades: Terapia Génica

GENOTIPO + AMBIENTE = ENFERMEDAD



SALUD

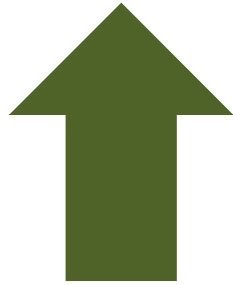
Intervención génica:
introducción de información
genética

La **biomedicina** busca **modificar el fenotipo** para restaurar el estado de salud, mediante una **intervención directa sobre el genotipo**. Esto involucra la **introducción de genes terapéuticos** en las células que así lo requieran.

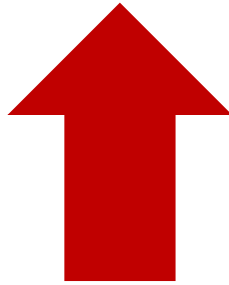
Abordajes médicos y veterinarios

Tratamiento de enfermedades: Terapias Futuras

GENOTIPO + AMBIENTE = ENFERMEDAD



**Intervención
génica**



**Intervención
desde el
ambiente**



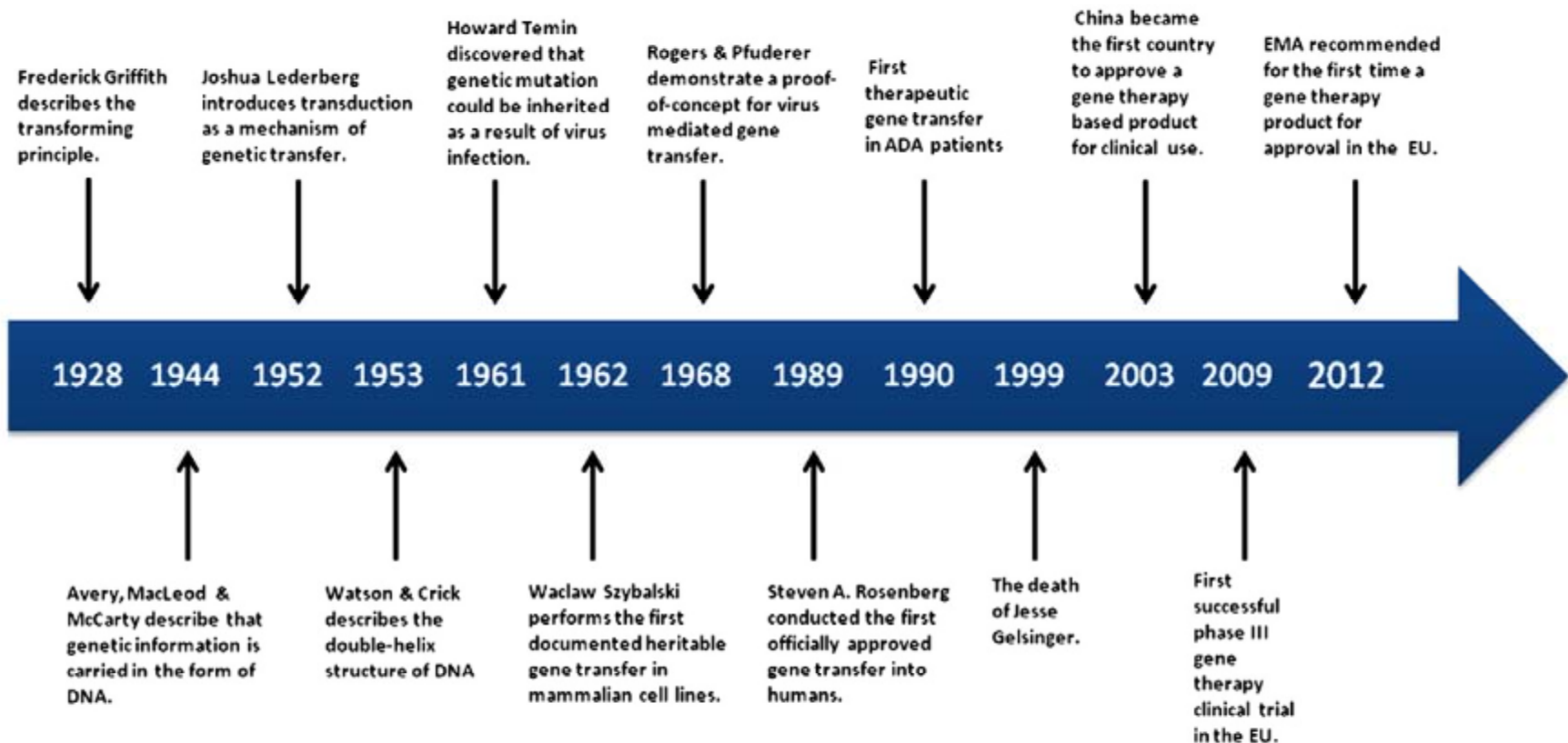
SALUD

En el **futuro**, la **medicina** abordará cada **enfermedad** desde su **doble componente** casuístico (genotipo, ambiente). De este modo, la doble intervención debería acelerar los tiempos de recuperación de la salud.

Abordajes médicos y veterinarios

Tratamiento de enfermedades: Terapia Génica

TERAPIA GÉNICA



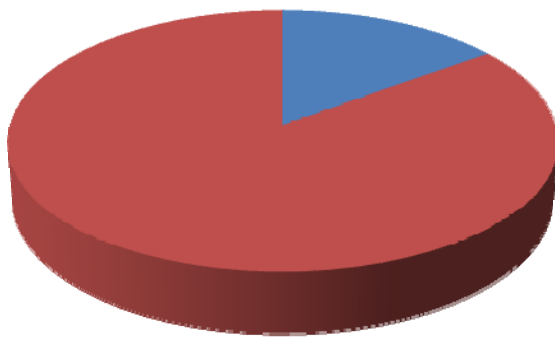
***¿Qué enfermedades pueden
ser abordadas desde la
Terapia génica?***



Terapia Génica

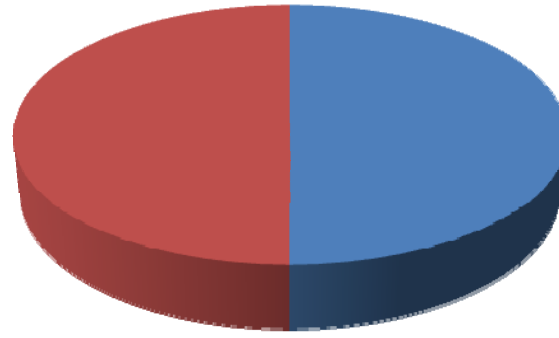
Enfermedades diana para su abordaje

ENFERMEDADES



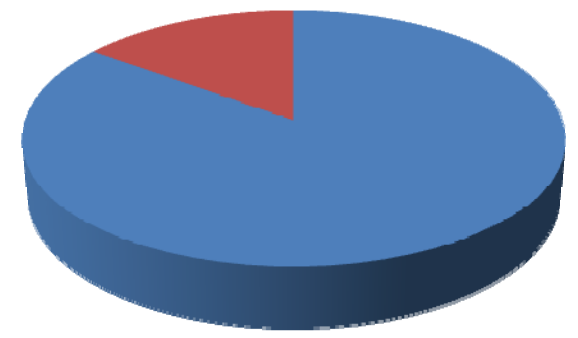
de origen ambiental

Infecciosas
Intoxicaciones
Etc.



de origen multifactorial

Cáncer
Alzheimer
Etc.



de origen genético

Mendelianas
Epigenéticas
Etc.

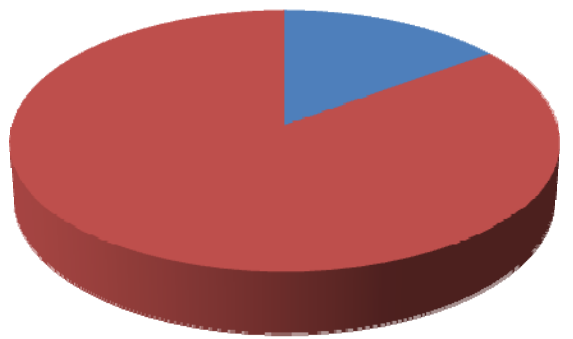
 Componente ambiental

 Componente genético

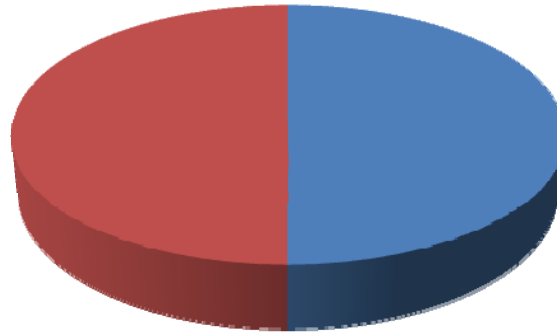
Terapia Génica

Enfermedades diana para su abordaje

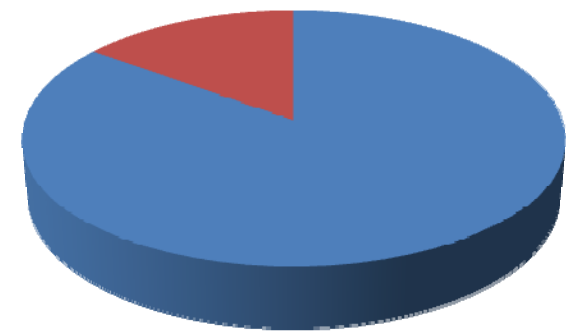
ENFERMEDADES



de origen ambiental



de origen multifactorial



de origen genético

La terapia génica resulta como un complemento importante en el tratamiento de enfermedades multifactoriales, y como el tratamiento principal para aquellas de origen genético.

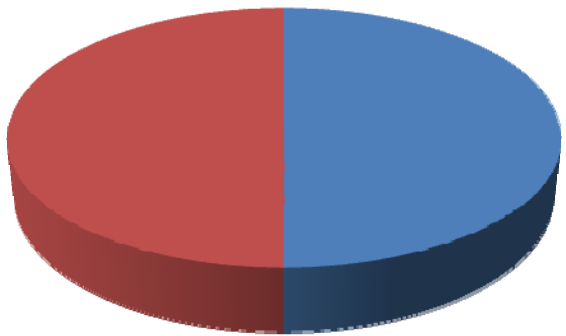
 Componente ambiental

 Componente genético

Terapia Génica

Enfermedades diana para su abordaje

ENFERMEDADES



de origen multifactorial

En las **enfermedades de origen multifactorial**, el componente genético es importante para el desarrollo de la patología.

Un **tratamiento** basado en **terapia tradicional + terapia génica** permitiría enfrentar sus causales y acelerar los tiempos de recuperación.

Por ejemplo, la combinación de hábitos saludables, el suministro de algunos fármacos, más la reparación genética de las células productoras de insulina podrían funcionar como solución a varios tipos de Diabetes.

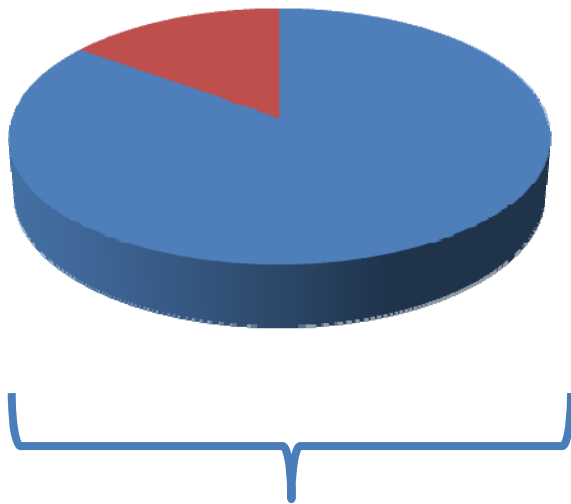
 Componente ambiental

 Componente genético

Terapia Génica

Enfermedades diana para su abordaje

ENFERMEDADES



de origen genético

En las **enfermedades de origen genético**, el genotipo es el factor desencadenante de la patología.

El **tratamiento** más útil para enfrentarlas involucraría a la **terapia génica**.

Por ejemplo, las graves consecuencias físicas de la fibrosis quística (enfermedad causada por una mutación en el gen *cftr*) podrían ser solucionadas mediante la introducción de una copia “sana” del gen involucrado en las células donde se hace manifiesta esta patología.

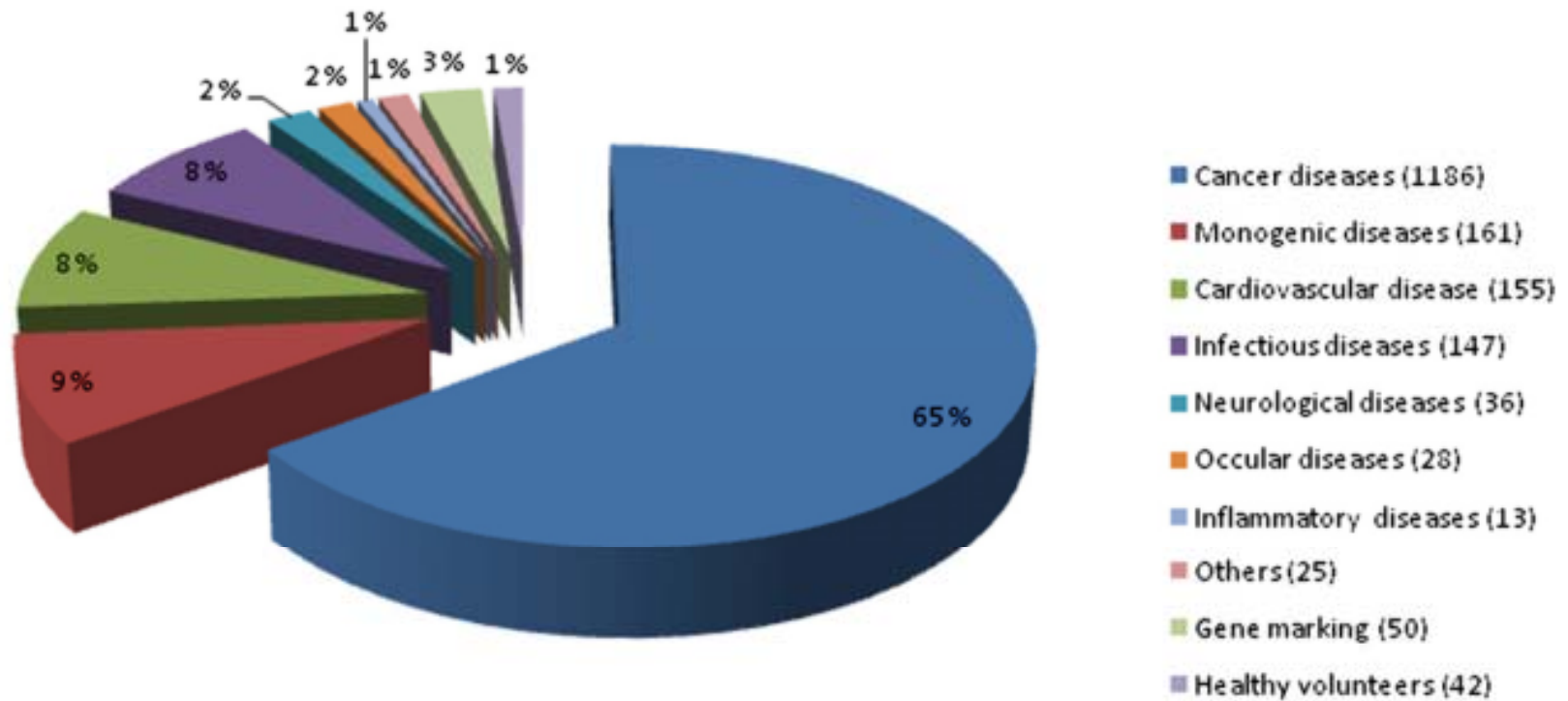
 Componente ambiental

 Componente genético

Terapia Génica

Enfermedades diana para su abordaje

ENFERMEDADES abordadas



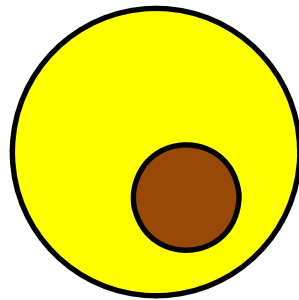
Terapia Génica

Enfermedades diana para su abordaje

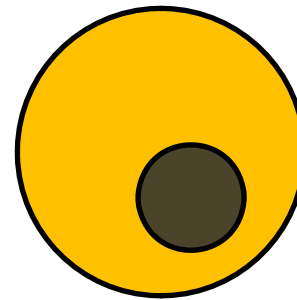
- En una **terapia génica** se pretende **introducir genes terapéuticos** dentro de una **célula enferma**.
- Estos **genes terapéuticos** buscan **reemplazar o sumar actividades** que se encontraban afectados en dicha célula, para así establecer parámetros estándares para su normal función.
- En ciertas patologías como el **cáncer**, los **genes terapéuticos** no pretenden “curar” a la célula tumoral, sino más bien llevarla a la **muerte**. De este modo, podría ser un complemento a la radioterapia y a la quimioterapia.

Terapia Génica

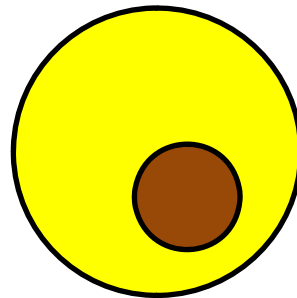
Enfermedades diana para su abordaje



Célula normal

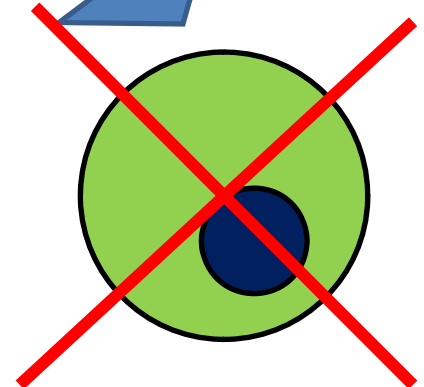


Célula enferma



Célula curada

**TERAPIA
GÉNICA**

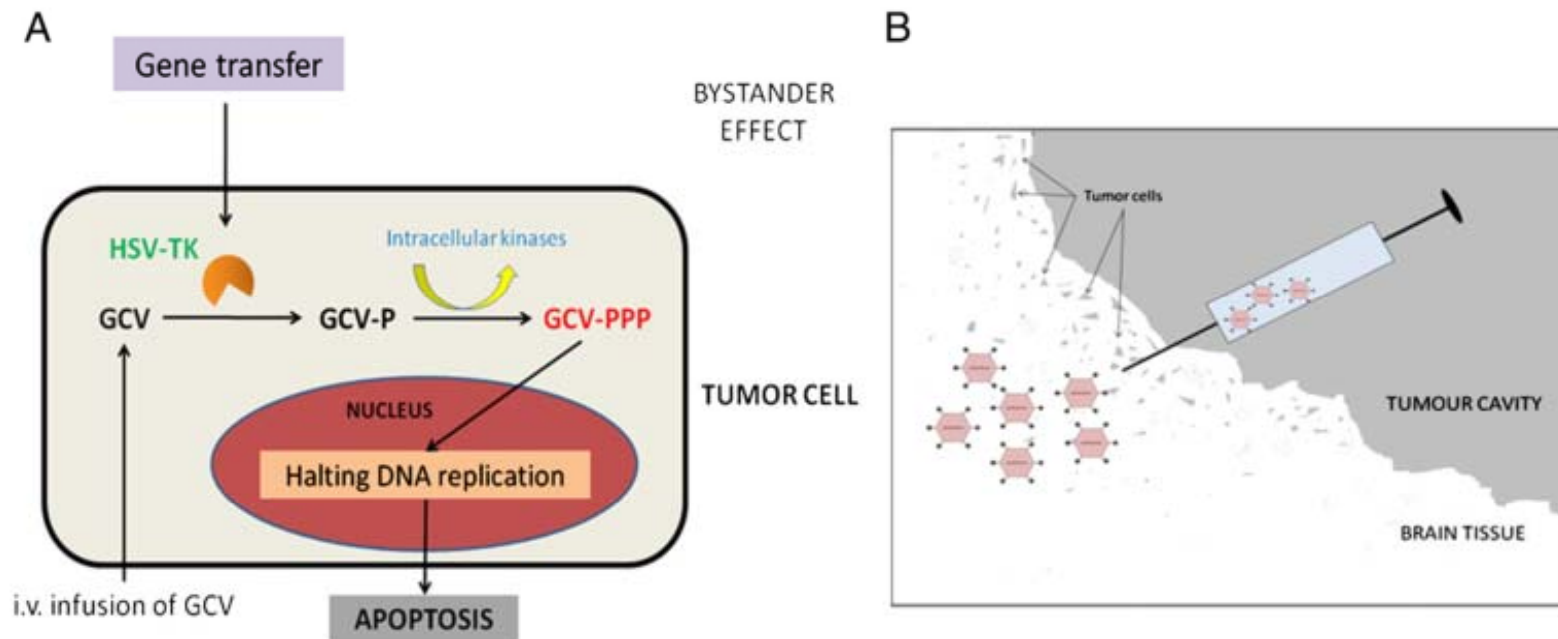


Célula muerta

Terapia Génica

Enfermedades diana para su abordaje

Ejemplo de terapia antitumoral



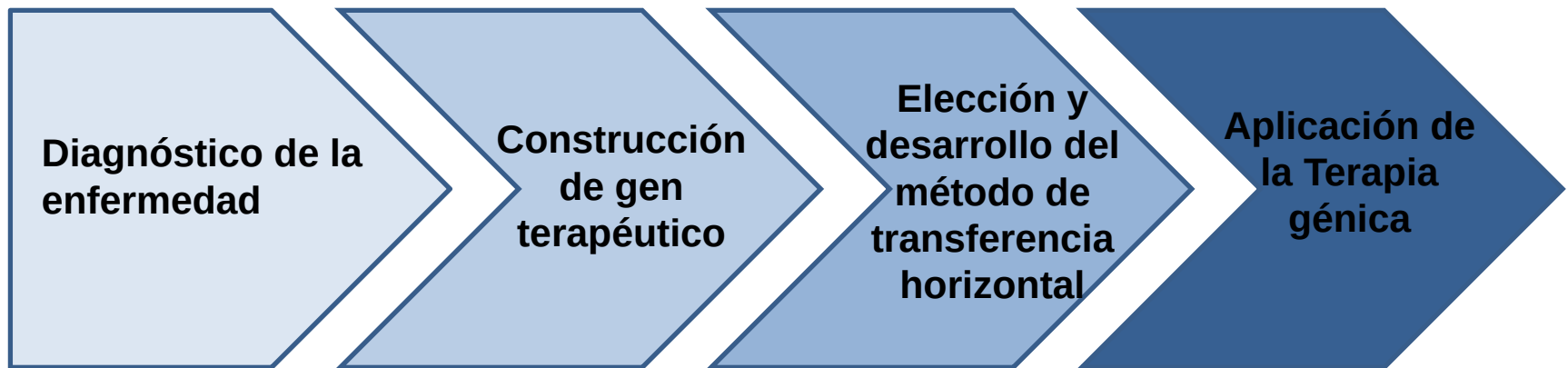
¿Cuáles son las etapas de una terapia génica somática?



Terapia Génica

Etapas de su desarrollo y aplicación

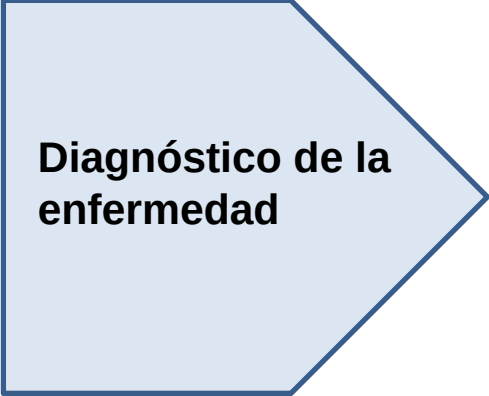
- Una vez identificados los casos donde la **Terapia génica** puede ser útil, es vital identificar cuáles son los pasos involucrados en su aplicación.



Terapia Génica

Etapas de su desarrollo y aplicación: Diagnóstico

- En primer lugar, es necesario conocer **cuáles** son las **modificaciones genéticas** en las células afectadas para así saber como intentar superar las consecuencias fenotípicas del problema genotípico.



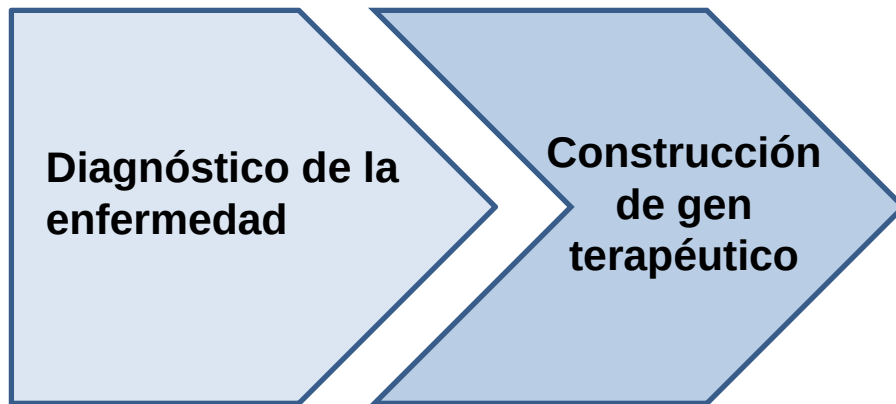
Diagnóstico de la enfermedad

- Es preciso reconocer cuál es el **gen/es afectado/s**.
- Para ello, debe aplicarse alguna **metodología** que permita identificar esas secuencias.
- Entre ellas, la **PCR** o cualquier otra **NAT** resultan útiles para tales fines.

Terapia Génica

Etapas de su desarrollo y aplicación

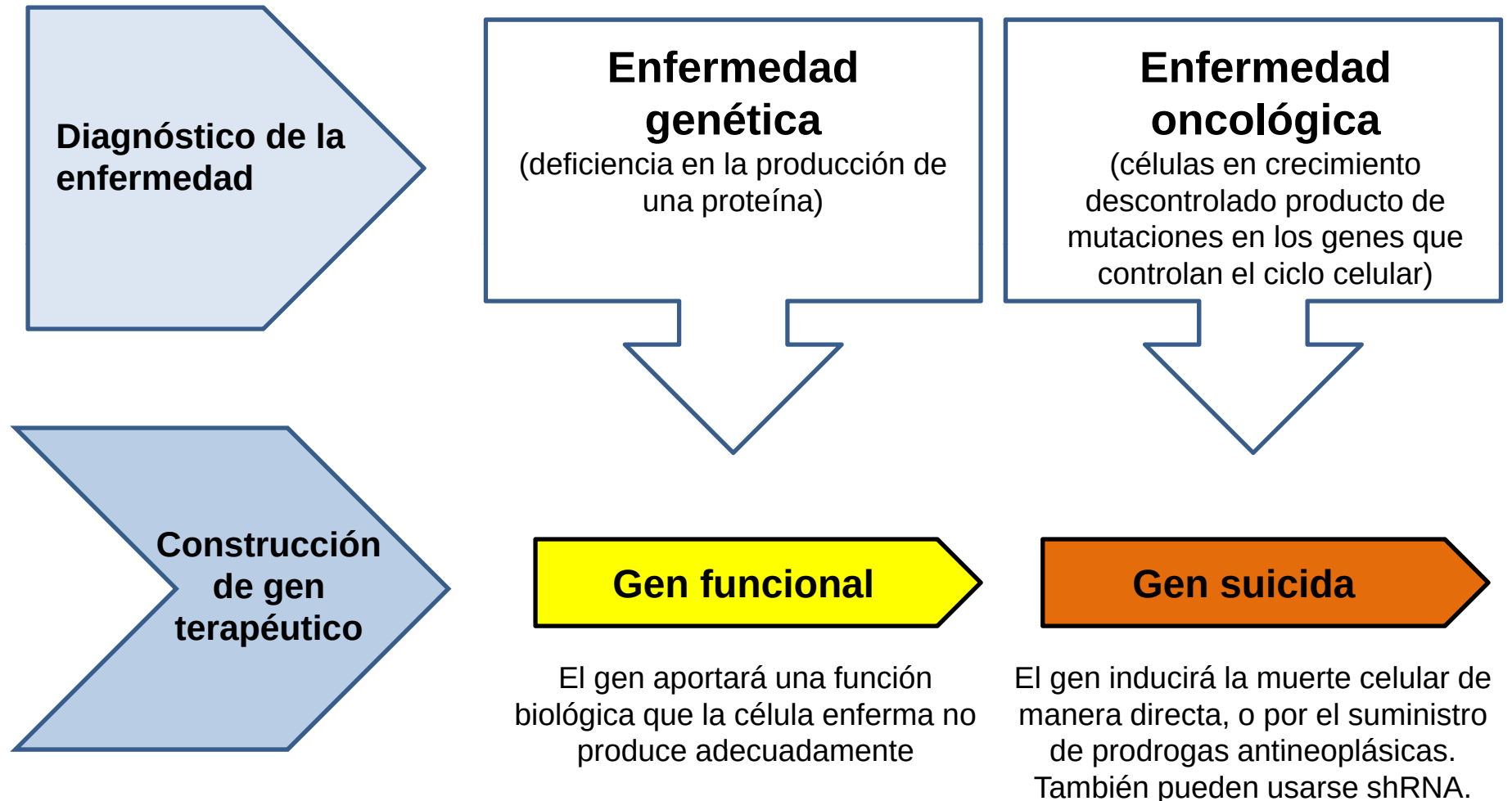
- Una vez identificadas las secuencias genéticas involucradas, debe construirse el **gen terapéutico** en función del **objetivo deseado** (“curación” de la célula o muerte celular).



- En cualquier caso, es preciso realizar una **construcción genética** que contenga la **información deseada**.
- Para ello, se utilizan las **herramientas del clonado molecular**.

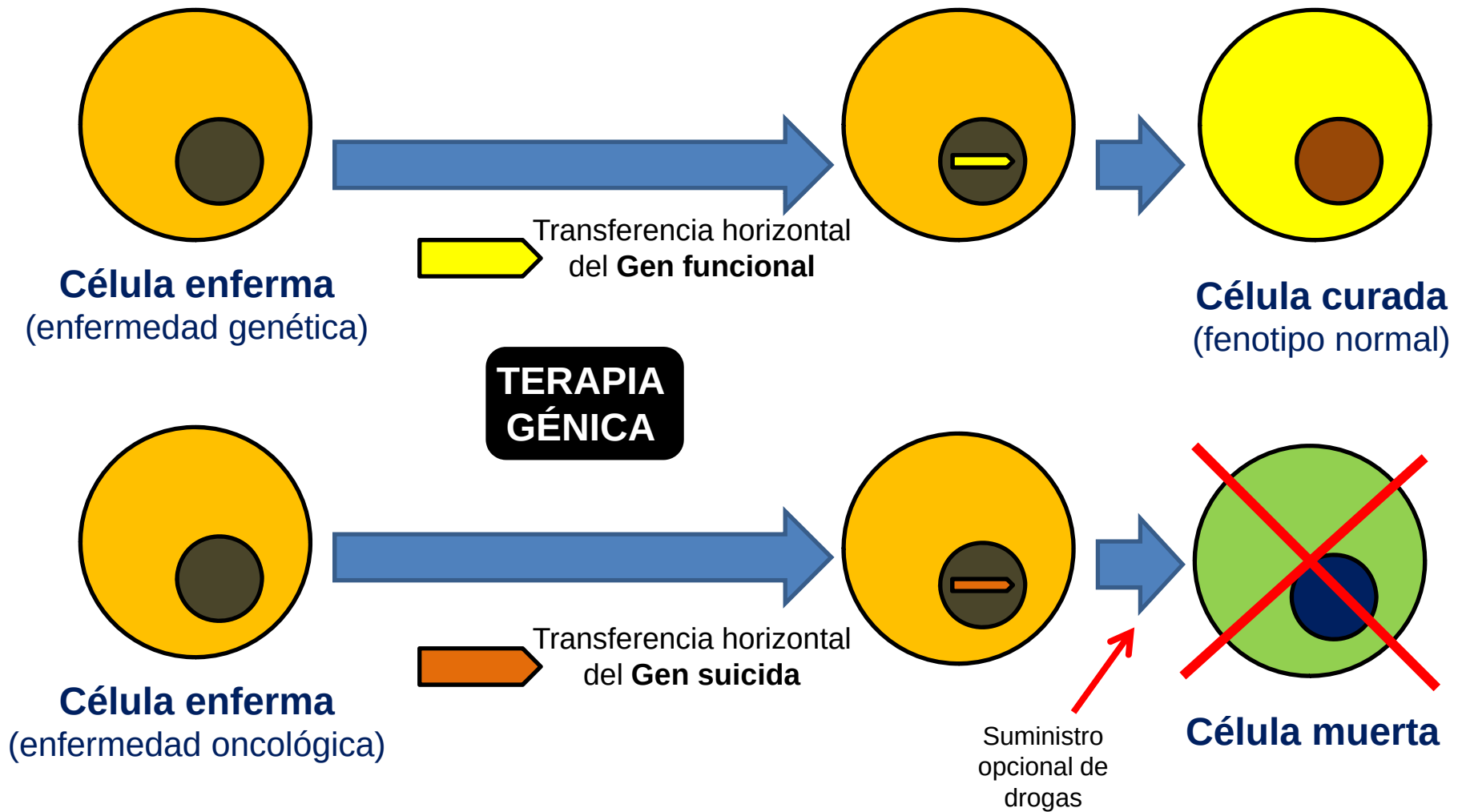
Terapia Génica

Etapas de su desarrollo y aplicación



Terapia Génica

Etapas de su desarrollo y aplicación



Terapia Génica

Etapas de su desarrollo y aplicación

Gen funcional

El gen aportará una función biológica que la célula enferma no produce adecuadamente



EJEMPLOS

Gen suicida

El gen inducirá la muerte celular de manera directa, o por el suministro de prodrogas antineoplásicas



Enfermedad	Gen
Fibrosis quística	<i>cfr</i>
Tay Sachs	<i>de la subunidad alfa de la hexosaminidasa A</i>
Fenilcetonuria	<i>de la enzima fenilalanina hidroxilasa</i>
Distrofia muscular de Duchenne	<i>distrofina</i>

Enfermedad	Gen
	<i>citocine deaminase</i> (Prodroga: 5-fluorocitosina)
Cáncer metastásico de mal pronóstico	<i>carboxipeptidasa G2</i> (Prodroga: agentes alquilantes)
	<i>purine nucleoside phosphorylase</i> (Prodroga: fosfato de fludarabina)

Terapia Génica

Etapas de su desarrollo y aplicación

- **Construido el gen terapéutico**, es necesario identificar el **método de transferencia horizontal** que se aplicará para dirigir la construcción al destino celular apropiado.



Terapia Génica

Etapas de su desarrollo y aplicación



Elección y
desarrollo del
método de
transferencia
horizontal

- Las opciones de **transferencia horizontal** a las células necesitadas incluye hacerlo ***in vivo*** (dentro del cuerpo del paciente), o ***ex vivo*** (modificando las células afectadas fuera del cuerpo del laboratorio para luego reinsertarlas).
- En la **terapia génica *in vivo*** es importante seleccionar un **vehículo** para transportar los **genes terapéuticos** a las células destino, entre los que se encuentran los **sistemas virales** y los **no virales**.
 - En la **terapia génica *ex vivo*** es preciso obtener y cultivar *in vitro* células del paciente, para así introducir los **genes terapéuticos** mediante métodos de **transfección** o **transducción**.

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

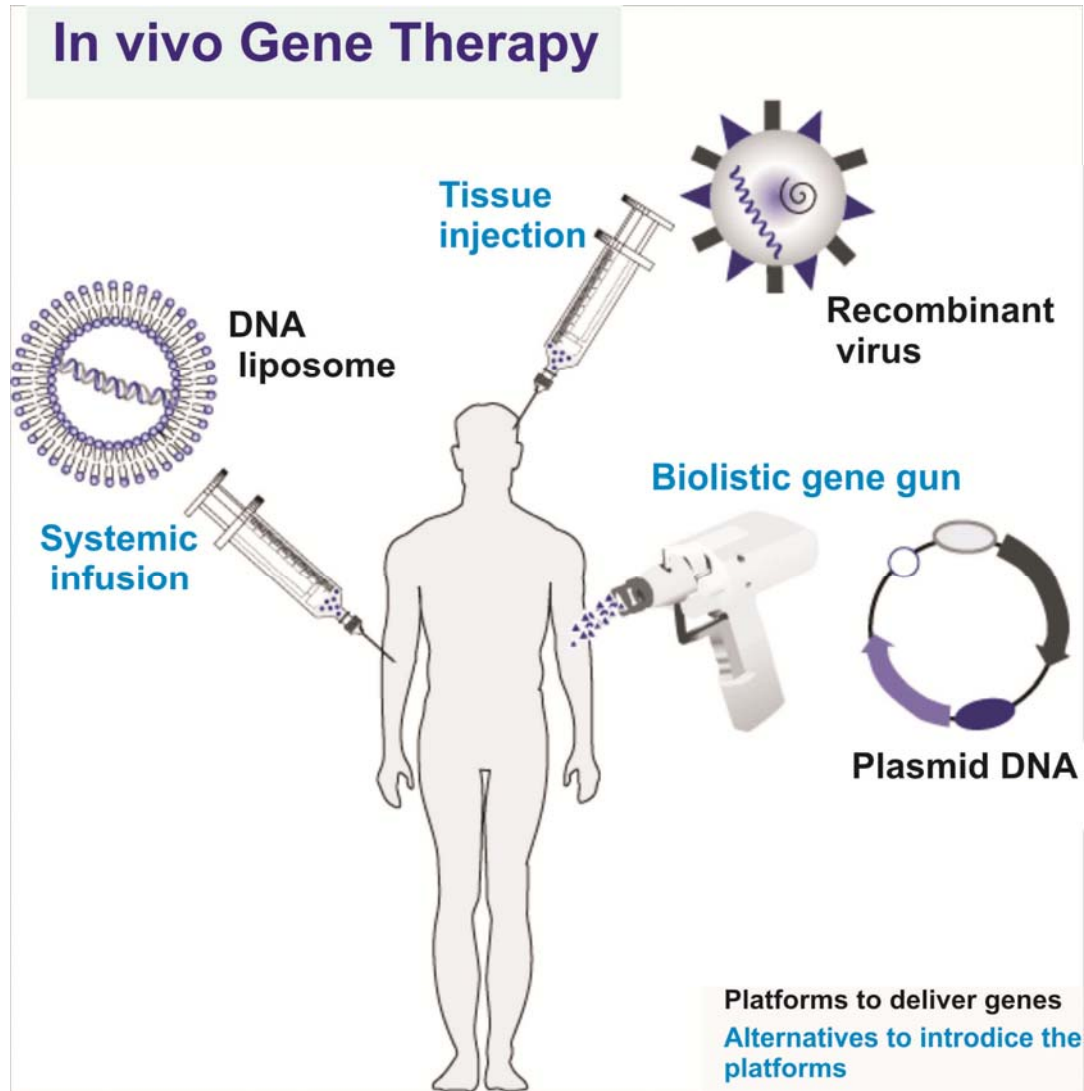


¿Cuáles son los vehículos o métodos para el transporte de genes terapéuticos dentro del cuerpo de un paciente?

La **terapia génica *in vivo*** sirve tanto para matar células de manera selectiva, como para reparar el fenotipo de células enfermas por defectos genéticos.

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación



Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Gen terapéutico contenido en...	DNA inmerso en...	Vías de administración
Plásmido	Liposomas	Inyección
Plásmido	---	Revolver génico/inyección
Genoma viral	Cápside y/o envoltura viral	Inyección/Spray /vía oral


CONSTRUCCIÓN
GENÉTICA


VEHÍCULO


SISTEMATIZACIÓN

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

VEHÍCULO	Ventajas	Desventajas
Ninguno	Ausencia de efectos secundarios	Tropismo celular
Liposomas	Administración	Tropismo celular Toxicidad
Virus	Administración Tropismo celular	Respuesta inmune Tamaño del gen terapéutico

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

- Los diferentes **vehículos** que pueden utilizarse para introducir en las células afectadas al **gen terapéutico**, presentan ventajas y desventajas que hacen que cada enfermedad particular pueda requerir un tratamiento diferente.
- Otro punto a considerar tiene que ver con la **duración** del **efecto terapéutico** en las células tratadas. Si la construcción genética generada (plásmido o genoma viral) no se integra en el genoma de la célula, las consecuencias fenotípicas pueden ser transitorias (requiriéndose nuevas administraciones).
- Las **sucesivas administraciones** de los **genes terapéuticos** pueden ocasionar problemas de **rechazo**, sobre todo cuando los vehículos son partículas virales.

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

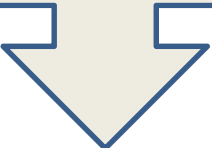


- Los **tejidos** reciben la **construcción genética** mediante su **inyección** o **bombardeo con partículas de oro**.
- **Todas las células** del área impactada **podrán internalizar el plásmido**.
- Para **controlar** la **especificidad** en la transcripción y traducción del gen terapéutico, el **promotor** utilizado debe ser **funcional** sólo en las **células de interés**.

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Liposomas como vehículo:
Inyección de los complejos
DNA/lípidos



- Existen **diferentes formulaciones de lípidos** en estudio, los cuales deben formar **liposomas estables** conteniendo el **DNA**.
- Es importante asegurar un **tamaño parejo** de los liposomas, dado que su **acumulación** en el torrente sanguíneo podría derivar en la formación de **trombos**.
- Dependiendo de las formulaciones lipídicas puede existir una **biodistribución diferencial** en el cuerpo. De cualquier modo, es crucial controlar la transcripción del **gen terapéutico** utilizando **promotores tejido específico**.
- Los liposomas **ingresan** por **endocitosis**. Algunas **formulaciones** presentan alta **toxicidad**.

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Virus como vehículo:
Simular una infección natural



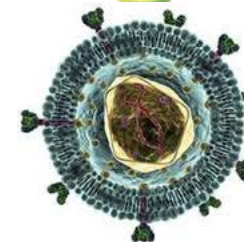
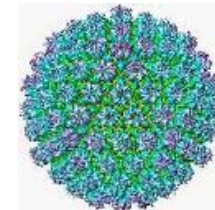
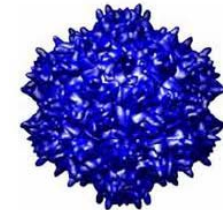
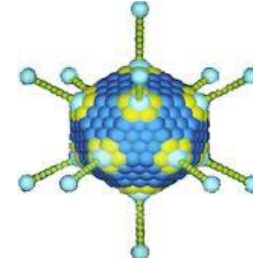
- Los **virus** tienen la **capacidad natural** de **reconocer células específicas** y allí **ingresar su material genético**.
- Los **genomas virales** pueden ser **modificados** de modo de insertarles genes terapéuticos.
- Valiéndose de lo anterior, es posible **modificar virus animales** (eliminéndoles genes propios para impedir el ciclo infectivo, agregándoles los genes terapéuticos) para su aplicación en humanos.
- Para poder **producirlos**, es preciso modificar **líneas celulares** para posibilitar su multiplicación *in vitro*.

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

**Virus
utilizados**

- Adenovirus
- Virus Adenoasociados
- Herpes Virus
- Baculovirus
- Retrovirus



Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Virus utilizados

- **Adenovirus**

Cápside proteica icosaédrica. Genoma de dsDNA lineal (35-40 kpb). Infecta células del sistema respiratorio, digestivo y otras mucosas.

- **Virus Adenoasociados**

- **Herpes Virus**

- **Baculovirus**

- **Retrovirus**

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Virus utilizados

- **Adenovirus**

Cápside proteica icosaédrica. Genoma de dsDNA lineal (35-40 kpb). Infecta células del sistema respiratorio, digestivo y otras mucosas.

- **Virus Adenoasociados**

Cápside proteica. Genoma de ssDNA lineal (4,5 kb). Requiere de adenovirus para su multiplicación. Pueden integrar su genoma al genoma celular.

- **Herpes Virus**

- **Baculovirus**

- **Retrovirus**

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Virus utilizados

- **Adenovirus**

Cápside proteica icosaédrica. Genoma de dsDNA lineal (35-40 kpb). Infecta células del sistema respiratorio, digestivo y otras mucosas.

- **Virus Adenoasociados**

Cápside proteica. Genoma de ssDNA lineal (4,5 kb). Requiere de adenovirus para su multiplicación. Pueden integrar su genoma al genoma celular.

- **Herpes Virus**

Cápside proteica más envoltura lipídica. Genoma de dsDNA lineal (120-250 kpb). Infecta células de mucosas, epidermis y sistema nervioso. Pueden quedar latentes.

- **Baculovirus**

- **Retrovirus**

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Virus utilizados

- **Adenovirus**

Cápside proteica icosaédrica. Genoma de dsDNA lineal (35-40 kpb). Infecta células del sistema respiratorio, digestivo y otras mucosas.

- **Virus Adenoasociados**

Cápside proteica. Genoma de ssDNA lineal (4,5 kb). Requiere de adenovirus para su multiplicación. Pueden integrar su genoma al genoma celular.

- **Herpes Virus**

Cápside proteica más envoltura lipídica. Genoma de dsDNA lineal (120-250 kpb). Infecta células de mucosas, epidermis y sistema nervioso. Pueden quedar latentes.

- **Baculovirus**

Cápside proteica más envoltura lipídica. Genoma de dsDNA circular (80-180 kpb). Sólo infecta insectos. Es capaz de transducir células humanas y animales.

- **Retrovirus**

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Virus utilizados

- **Adenovirus**

Cápside proteica icosaédrica. Genoma de dsDNA lineal (35-40 kpb). Infecta células del sistema respiratorio, digestivo y otras mucosas.

- **Virus Adenoasociados**

Cápside proteica. Genoma de ssDNA lineal (4,5 kb). Requiere de adenovirus para su multiplicación. Pueden integrar su genoma al genoma celular.

- **Herpes Virus**

Cápside proteica más envoltura lipídica. Genoma de dsDNA lineal (120-250 kpb). Infecta células de mucosas, epidermis y sistema nervioso. Pueden quedar latentes.

- **Baculovirus**

Cápside proteica más envoltura lipídica. Genoma de dsDNA circular (80-180 kpb). Sólo infecta insectos. Es capaz de transducir células humanas y animales.

- **Retrovirus**

Cápside proteica más envoltura lipídica. Genoma de ssRNA lineal (8,5 kb). Dentro de la célula, posee un intermediario de dsDNA y se integra al genoma celular.

Terapia Génica *in vivo*

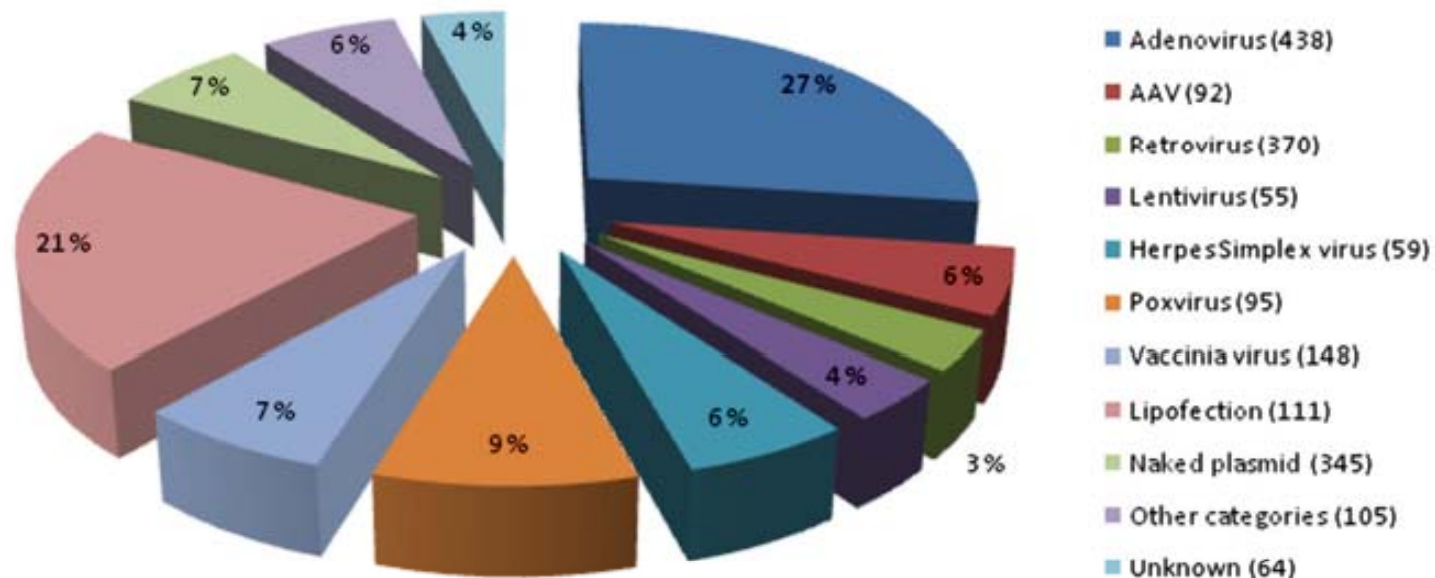
Etapas de su desarrollo y aplicación

- La **construcción** de los **vectores virales** conteniendo los **genes terapéuticos** requiere del **desarrollo previo** de sistemas de **clonado molecular**, utilizando como plataformas a los genomas de esos virus.
- En general, estos sistemas permiten la **replicación** de **intermediarios** de los genomas virales en ***Escherichia coli*** para así poder realizar las construcciones genéticas deseadas.
- Luego, es necesario contar con **líneas celulares animales** donde **transfectar** las **construcciones anteriores**. Estas líneas deben permitir la replicación del genoma viral y la correcta encapsidación de los mismos.
- Los **virus** así **producidos** tienen la capacidad de **adsorción específica** e **introducción del genoma** en las **células diana**, pero no son capaces de multiplicar y completar un ciclo de infección.

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

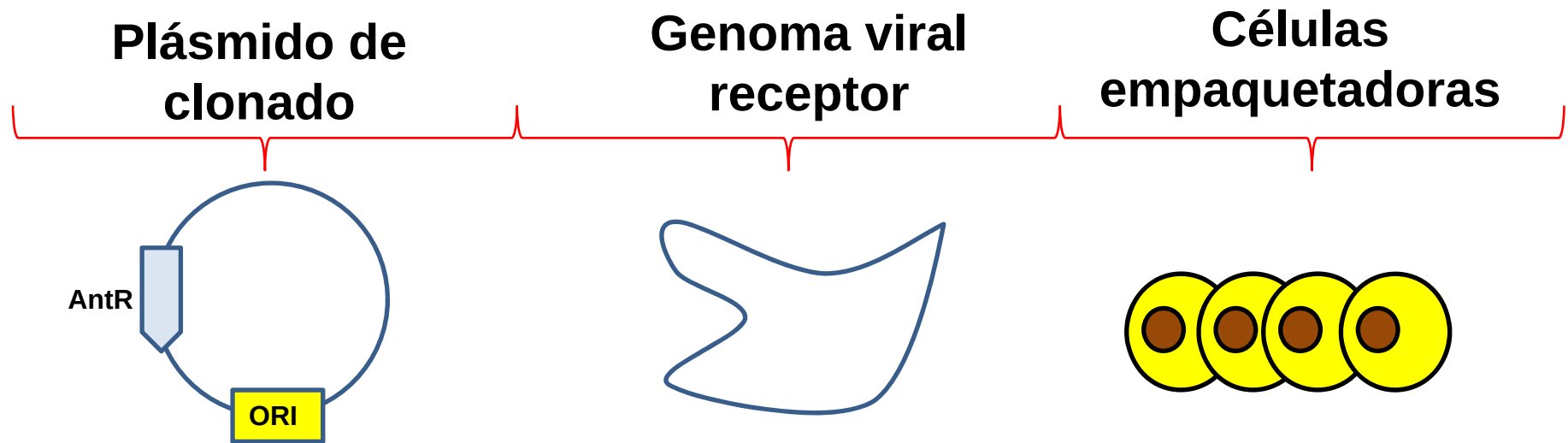
VEHÍCULOS utilizados en estudio clínico



Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Elementos necesarios para la realización de un virus modificado:



Plásmido de *Escherichia coli* conteniendo el transgén y elementos necesarios para su introducción en el genoma viral. Puede contener la parte del genoma viral necesaria cuando es pequeño.

Genoma viral conteniendo sitio aceptor para el transgén. Puede no ser necesario si el plásmido posee todo el genoma.

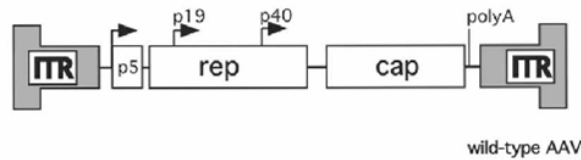
Células animales conteniendo genes virales para soportar la multiplicación del pseudo-virus y su encapsulación.

Terapia Génica *in vivo*

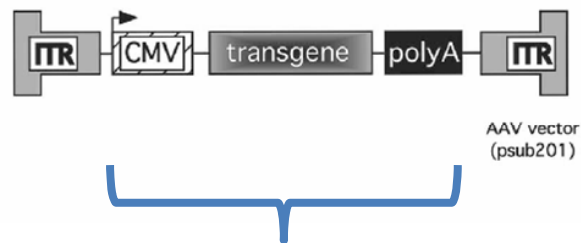
Etapas de su desarrollo y aplicación

Ejemplo de **construcción genética** de un **adenovirus asociado**

Genoma *wild type*



Genoma modificado



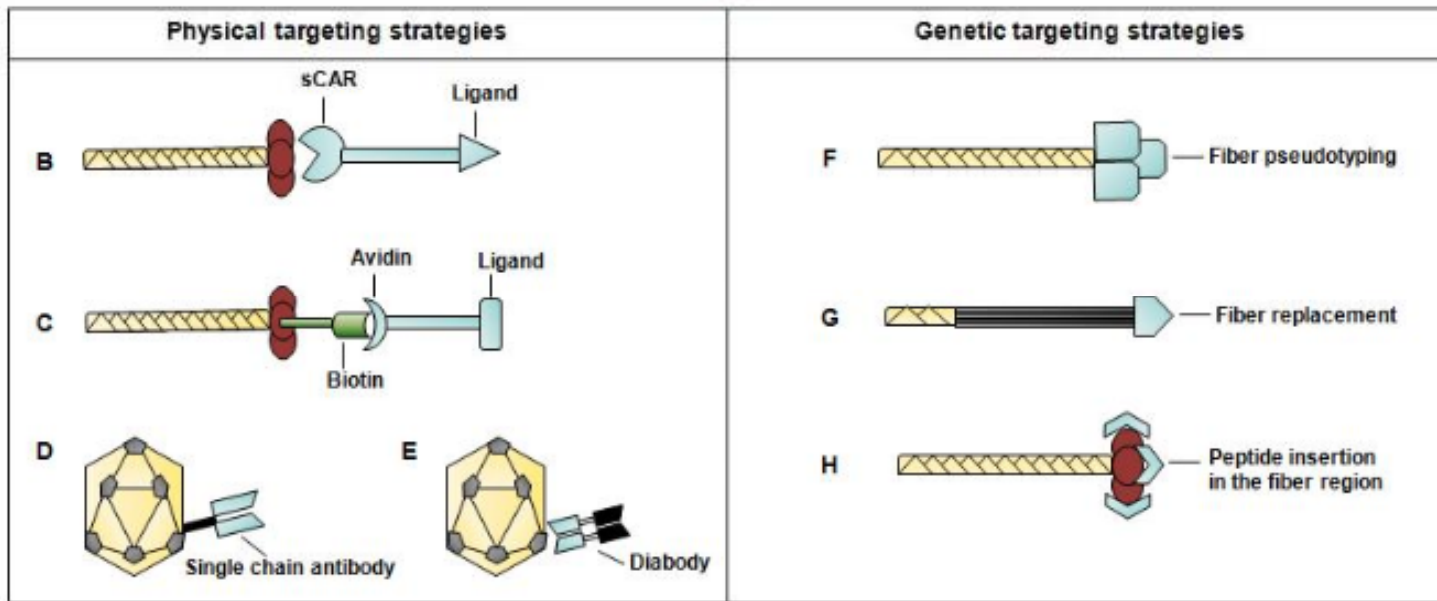
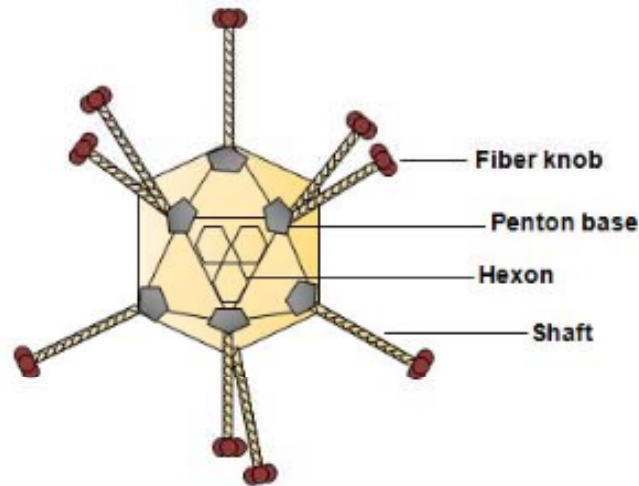
Gen terapéutico

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

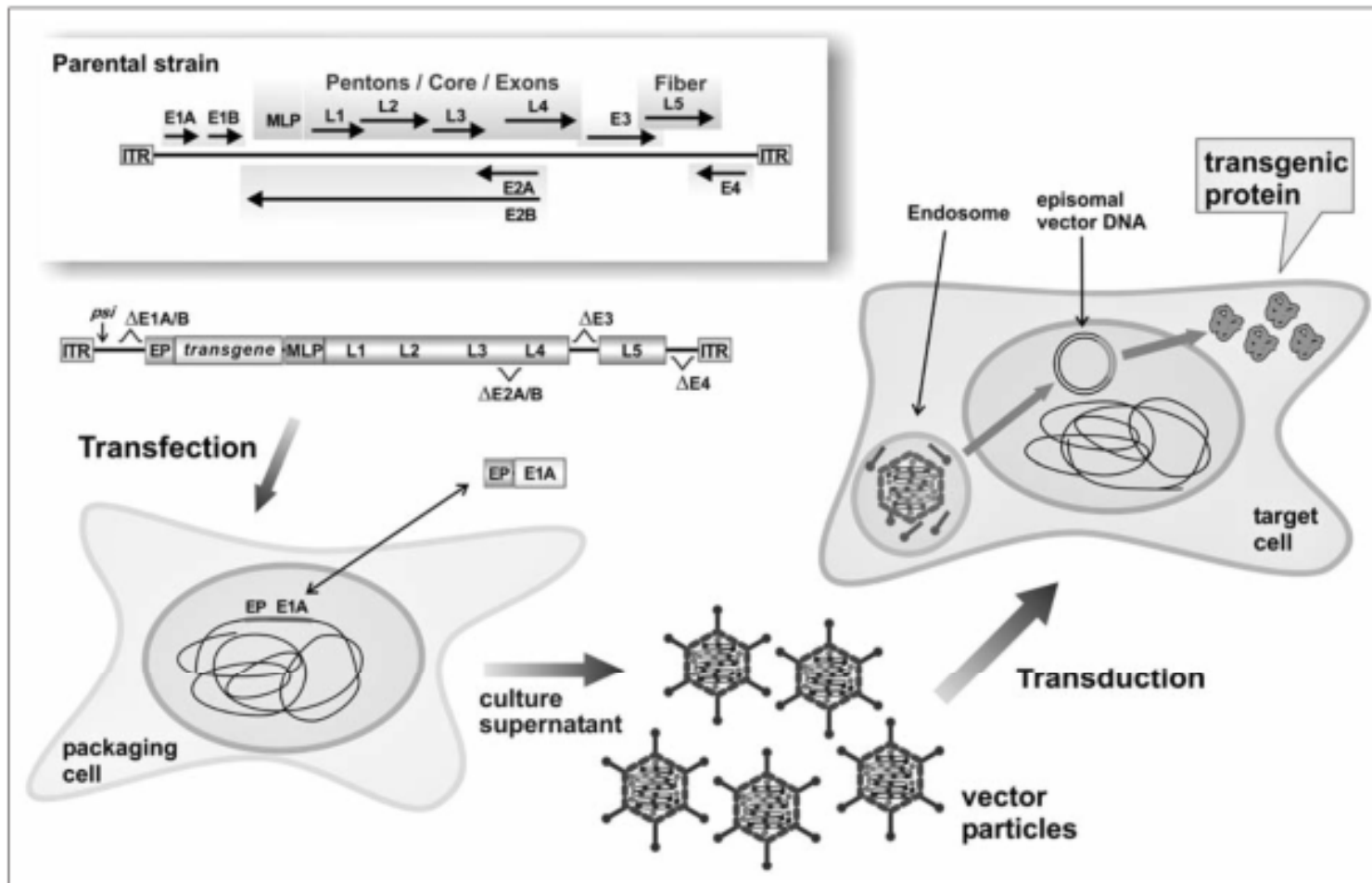
Adenovirus

A Adenovirus structure



Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

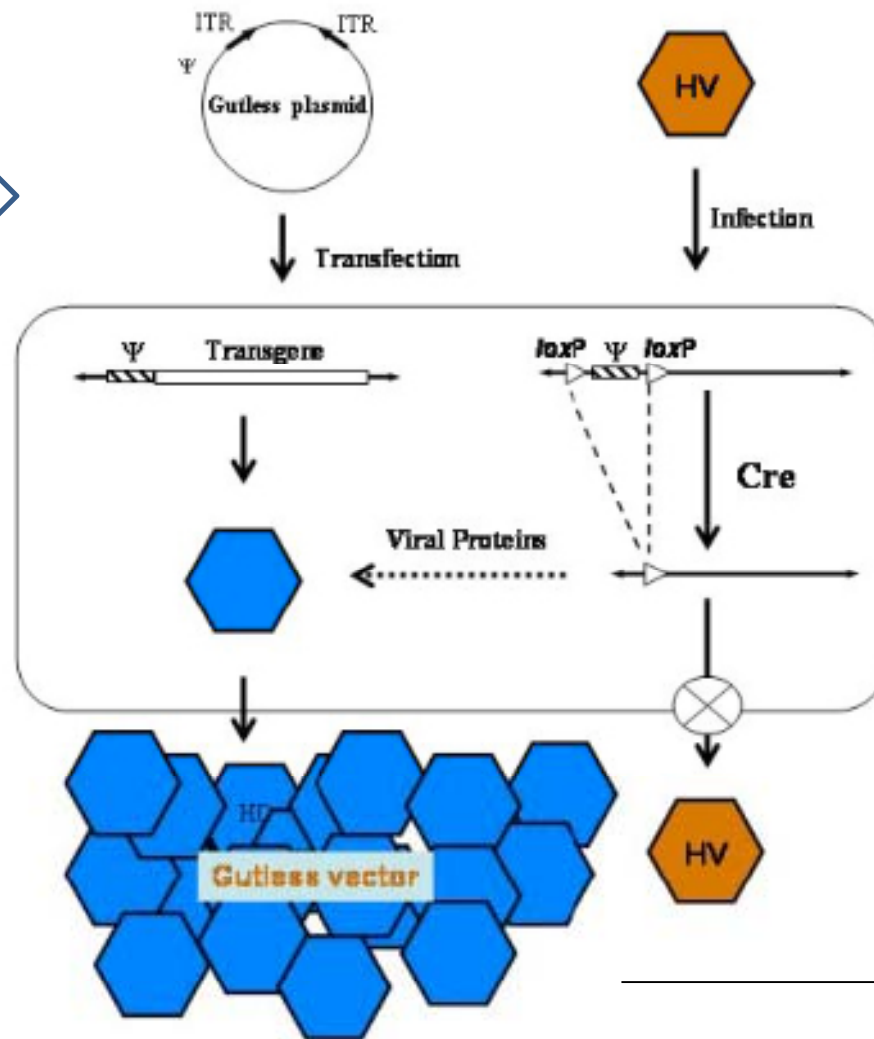


Adenovirus

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

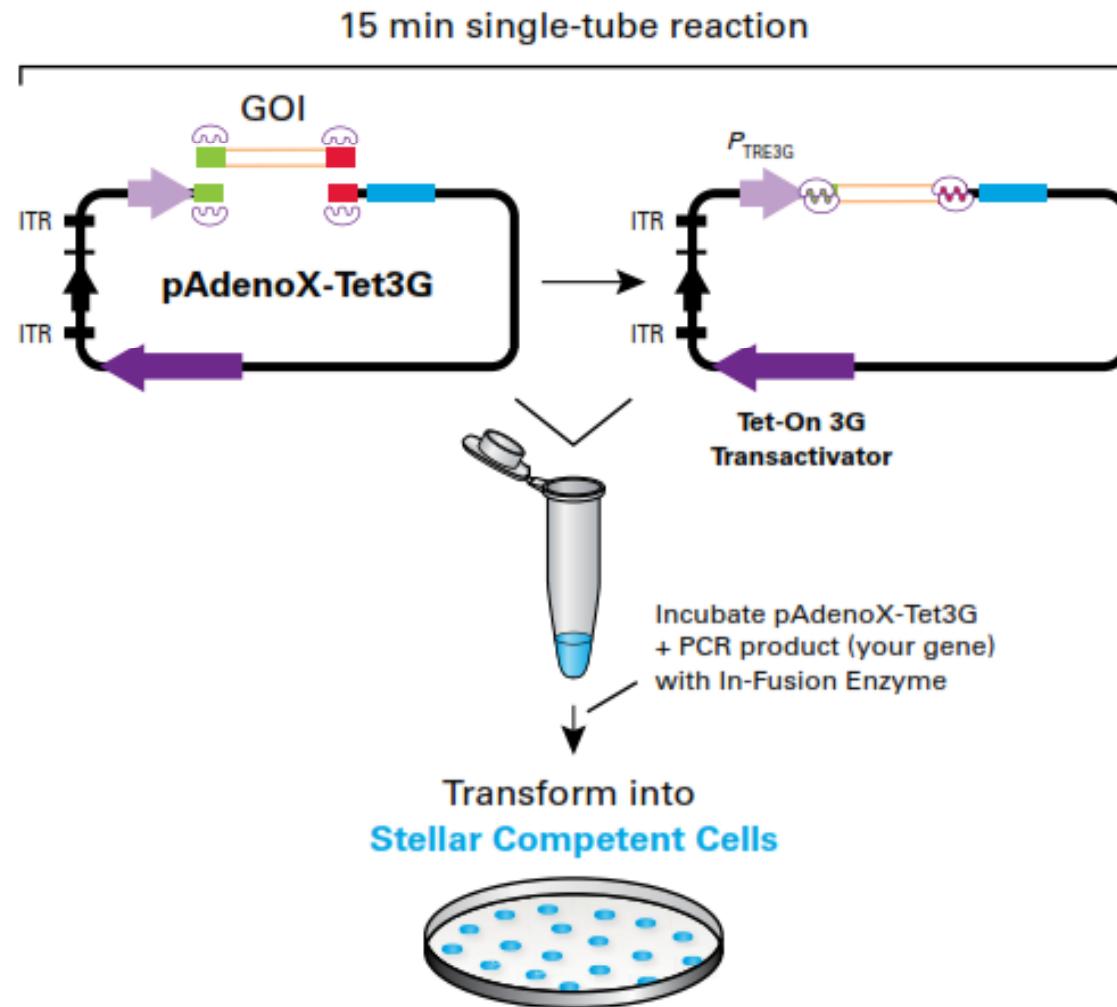
Adenovirus



Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

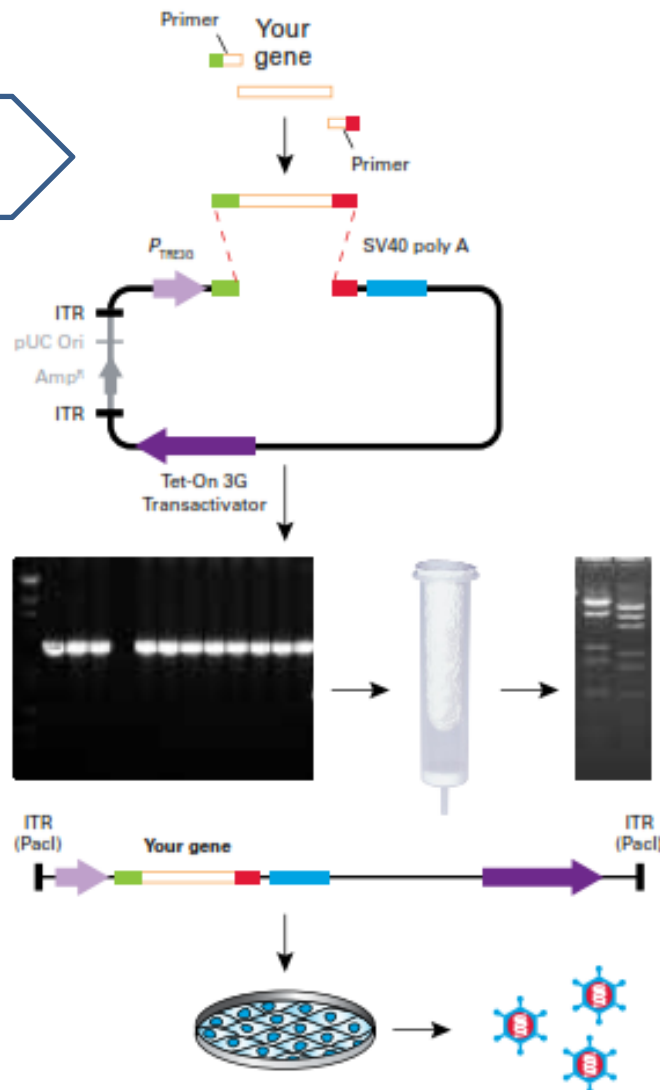
Adenovirus



Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Adenovirus



1. Amplify your gene with 15 bp of homology to pAdenoX

2. Clone using In-Fusion technology and Stellar Competent Cells

3. Perform colony PCR to verify correct clone(s)

4. Purify pAdenoX-GOI using NucleoBond Xtra

5. Digest with XhoI/NheI to verify integrity

6. Digest with PacI (to linearize)

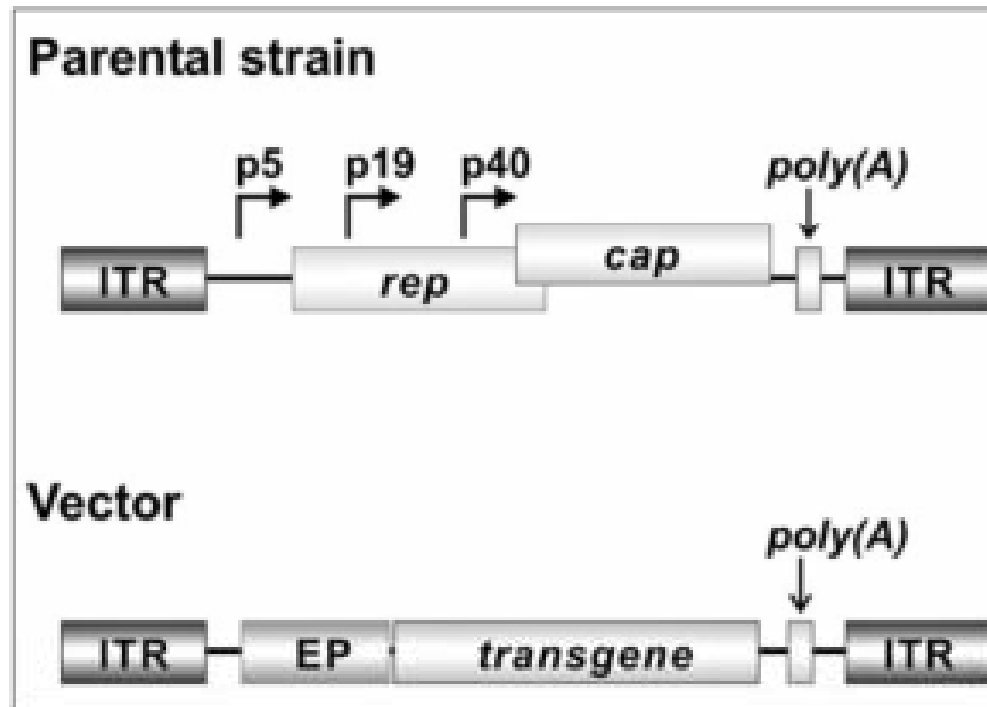
7. Transfect HEK 293 cells

8. Harvest recombinant adenovirus

Clontech

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación



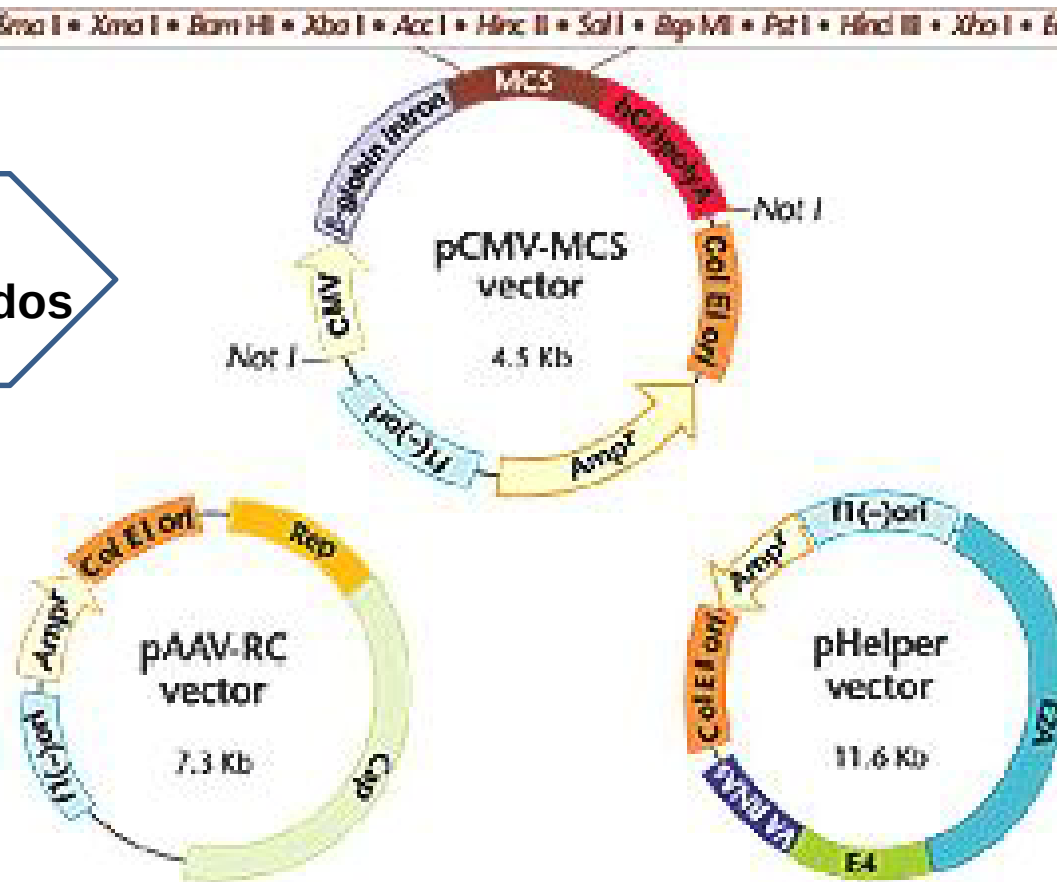
Adenovirus-Asociado

- El **virus *wild type*** se **integra** en un **locus** específico del **cromosoma 19** humano.

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

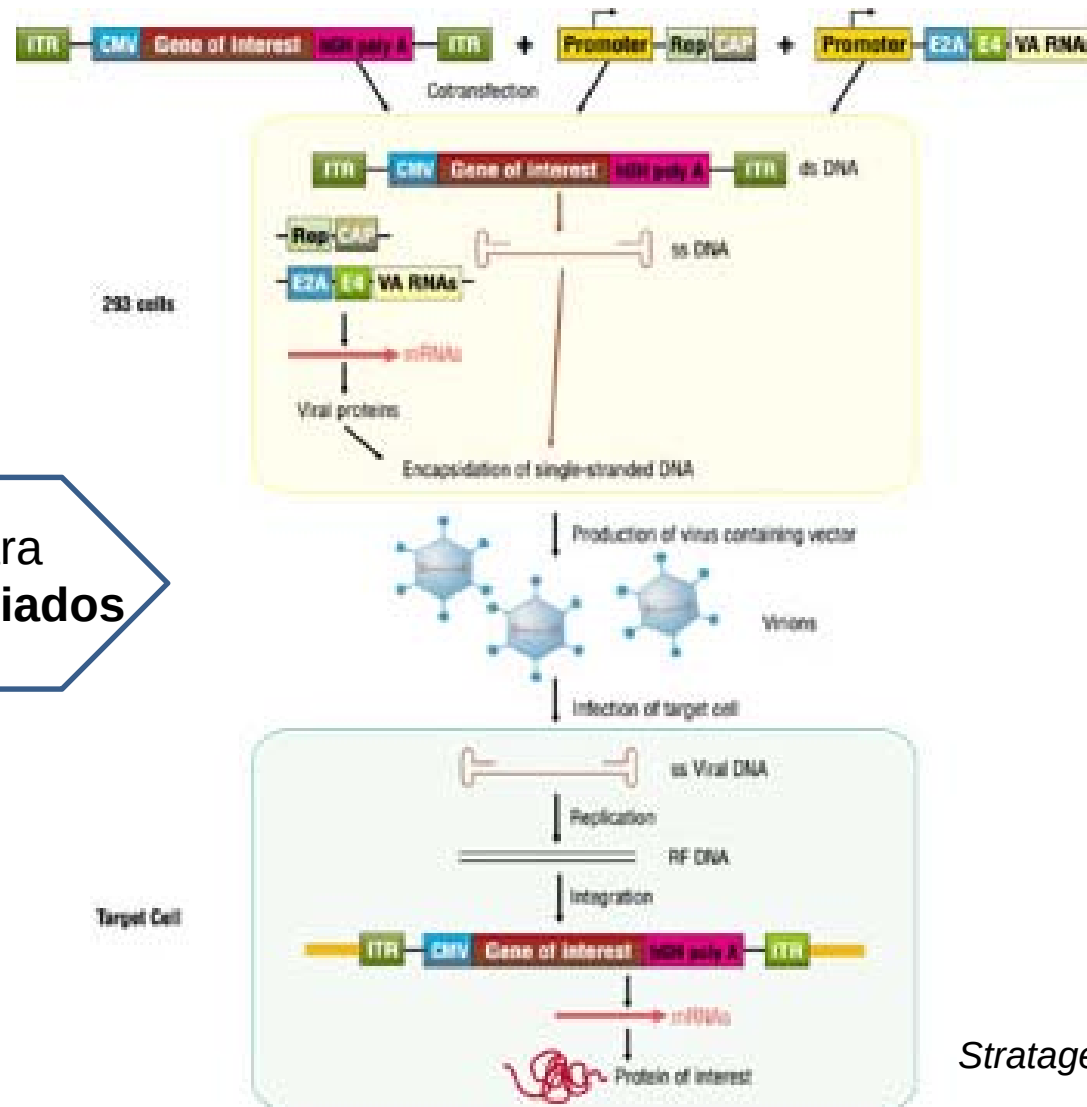
Vectores para
adeno-asociados



Stratagene

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

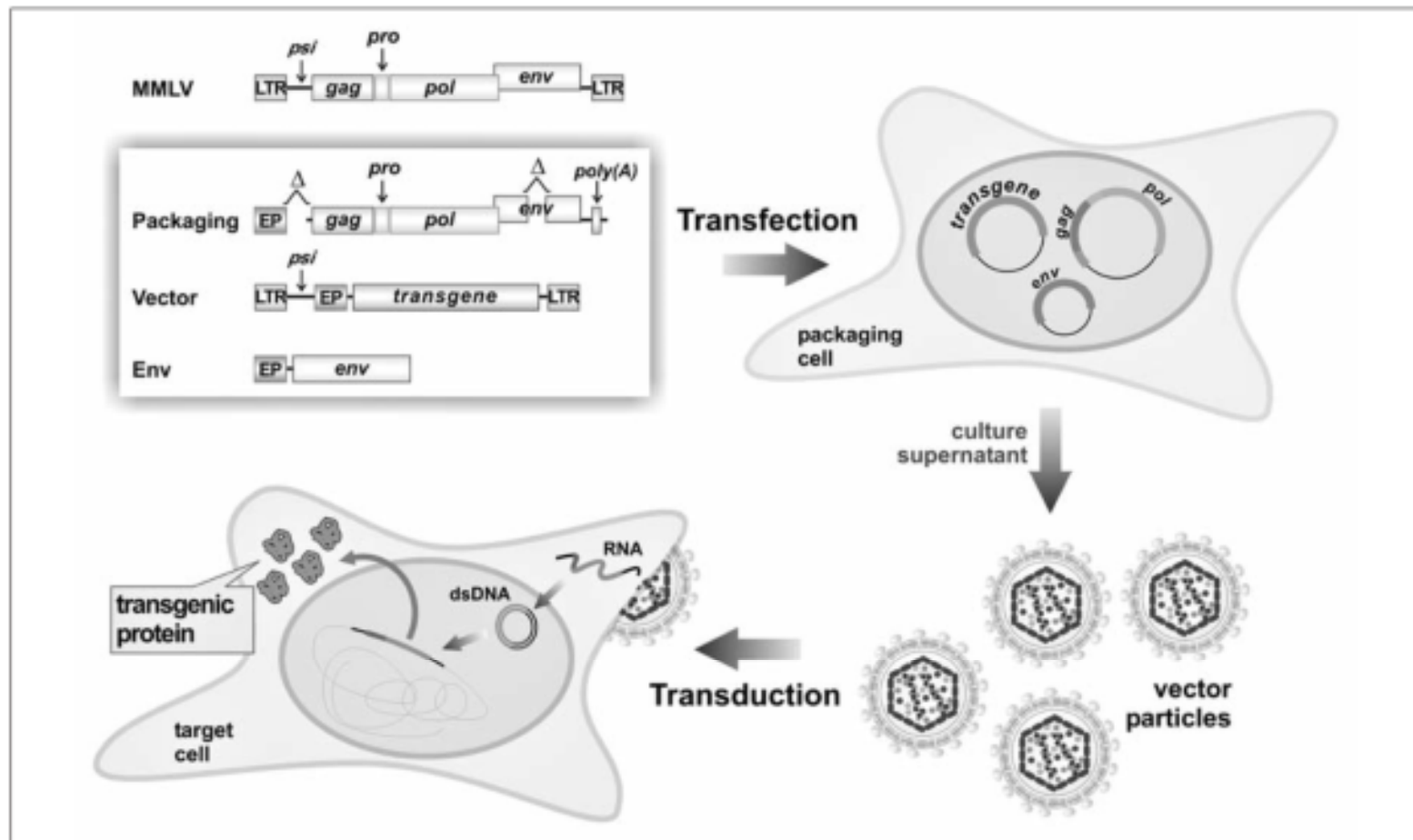


Vectores para
adeno-asociados

Stratagene

Terapia Génica *in vivo*

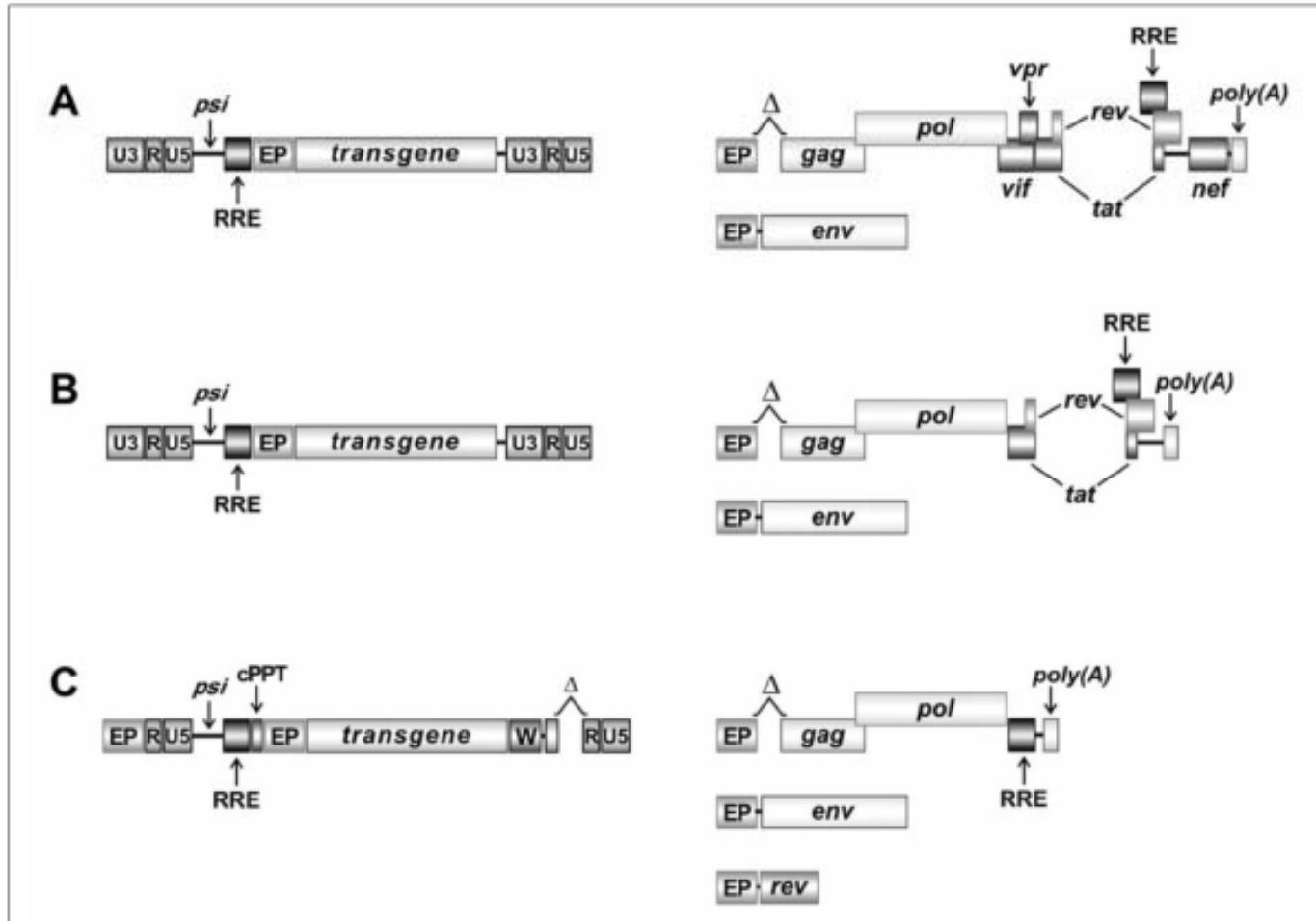
Etapas de su desarrollo y aplicación



Retrovirus (MLV)
Sólo infectan células replicativas

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

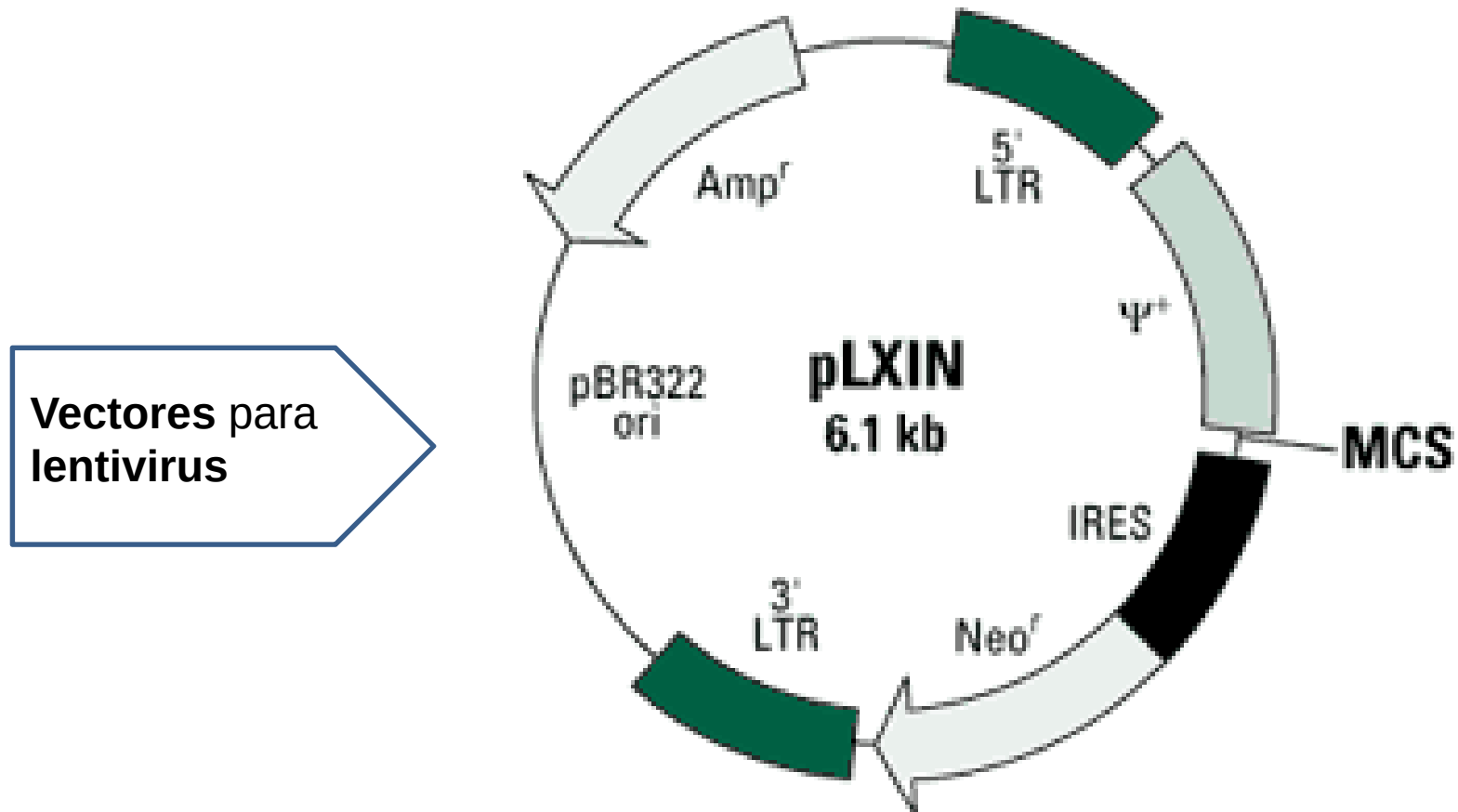


Lentivirus

Infectan células replicativas y no replicativas

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación



Clontech

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Lentiviral Vector Safety Information

V I R A L T R A N S D U C T I O N

Lentivirus Usage and Safety Guidelines

The protocols supplied with Clontech's Lenti-X systems require the production, handling, and storage of infectious lentivirus. It is imperative to fully understand the potential hazards of, and necessary precautions for, the laboratory use of lentiviruses. The National Institutes of Health and Centers for Disease Control have designated recombinant lentiviruses as Level 2 organisms. Clontech® advises that you contact your health and safety facilities for local guidelines and regulations, and strongly recommends that new users of all viral technologies receive training from experienced personnel.

For more details, download the NIH's "Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors."

NIH guidelines require the maintenance of a Biosafety Level 2 (BL-2) facility for work involving lentivirus and others like it. The VSV-G pseudotyped lentiviruses packaged from the HIV-1-based vectors described here are capable of infecting human cells. The viral supernatants produced by these lentiviral systems could, depending on your insert, contain potentially hazardous recombinant virus. Similar vectors have been approved for human gene therapy trials, attesting to their potential ability to transfer and express genes *in vivo*.

For these reasons, due caution must be exercised in the production and handling of any recombinant lentivirus. The user is strongly advised not to create VSV-G pseudotyped lentiviruses capable of expressing known oncogenes.

For more information on Biosafety Level 2 agents and practices, download [Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories \(BMBL\), Fifth Edition \(Revised December 2009\), HHS Pub. No. \(CDC\) 21-1112](#). U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and NIH.

Terapia Génica *in vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Lentiviral Vector Safety Information

Summary of Biosafety Level 2 Practices

The following information is a brief description of Biosafety Level 2. It is neither detailed nor complete. Details of the practices, safety equipment, and facilities that combine to produce a Biosafety Level 2 are available in the above publication. If possible, observe and learn the practices described below from someone who has experience working with lentiviruses.

Standard microbiological practices

- Limited access to work area
- Biohazard warning signs posted
- Minimize production of aerosols
- Decontaminate potentially infectious wastes before disposal
- Use precautions with sharps (e.g., syringes, blades)
- Biosafety manual defining any needed waste decontamination or medical surveillance policies

Safety equipment

- Biological Safety Cabinet, preferably a Class II BSC/laminar flow hood (with a HEPA microfilter) used for all manipulations of agents that cause splashes or aerosols of infectious materials; exhaust air is unrecirculated
- PPE: protective laboratory coats, gloves, face protection as needed

Facilities

- Autoclave available for waste decontamination
 - Chemical disinfectants available for spills
-

Terapia Génica *in vivo*

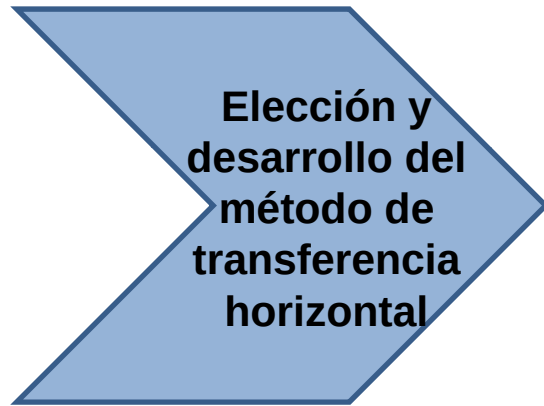
Etapas de su desarrollo y aplicación

Vector Viral	Capacidad para el transgen
Adenovirus	30 kpb
Virus adenoasociados	4 kpb
Herpes virus	50 kpb
Retrovirus	7 kpb
Baculovirus	40 kpb

Nota: Los sistemas de vehiculización no viral no presentan limitantes en la longitud del gen terapéutico

Terapia Génica *ex vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

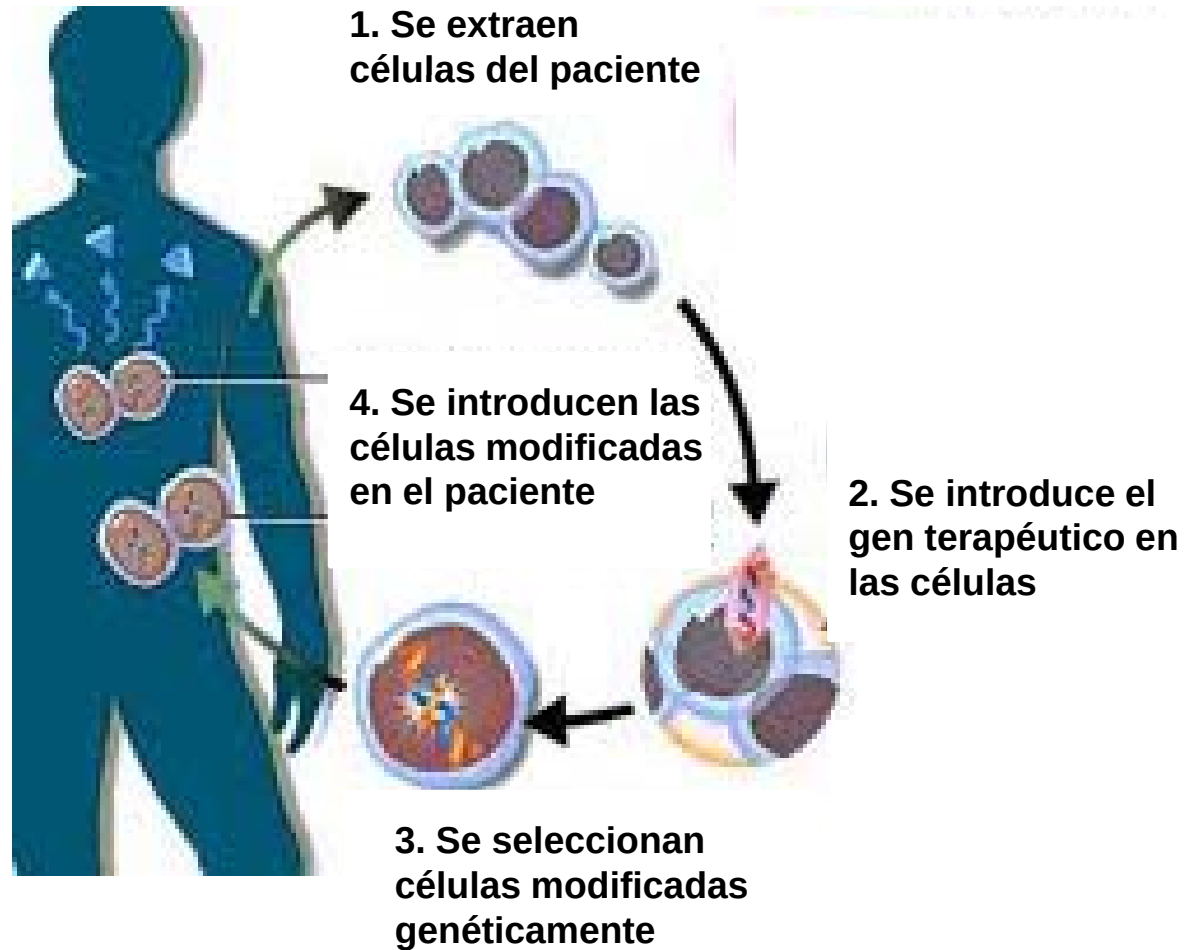


¿Cuáles son los procedimientos para la introducción de genes terapéuticos en células del paciente cultivadas *in vitro*?

La terapia génica *ex vivo* no sirve cuando se pretenden matar células. Sólo es aplicable para reparar el fenotipo de células enfermas por defectos genéticos

Terapia Génica *ex vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación



Terapia Génica *ex vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Procedimientos de la terapia génica *ex vivo*



Terapia Génica *ex vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Procedimientos de la terapia génica *ex vivo*



- Se toma una muestra de las células del paciente donde se evidencia la patología.
- Una alternativa es utilizar células madre del paciente.



Terapia Génica *ex vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Procedimientos de la terapia génica *ex vivo*



- Las células del paciente se cultivan *in vitro* mediante procedimientos estándar típicos para las líneas celulares animales.



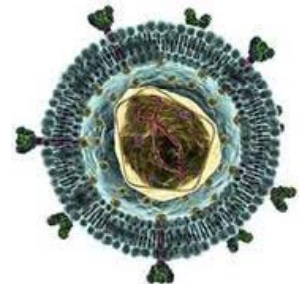
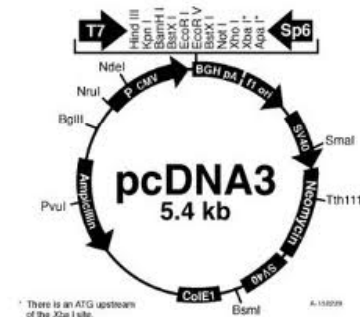
Terapia Génica *ex vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Procedimientos de la terapia génica *ex vivo*



- Las **células en cultivo** son **transfectadas** con el **plásmido** conteniendo el **gen terapéutico**. También, pueden ser transducidas mediante el uso de virus modificados conteniendo el transgen.
- Las **construcciones genéticas** poseen un **gen selector** (resistencia a antibiótico)



Terapia Génica *ex vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Procedimientos de la terapia génica *ex vivo*



- Las células transfectadas o transducidas son tratadas con el antibiótico, de manera de seleccionar poblaciones modificadas genéticamente en forma estable.
- Se realizan ensayos genotípicos y fenotípicos confirmatorios. (*Southern Blot*, *Northern blot*, *Western Blot*)



Terapia Génica *ex vivo*

Etapas de su desarrollo y aplicación

Procedimientos de la terapia génica *ex vivo*



- Las **células establemente modificadas** son **implantadas** en el órgano del cual fueron originalmente extraídas.
- En el caso de haber modificado **células madre**, puede ser necesario **pre-diferenciarlas *in vitro*** antes de su implantación.



Terapia Génica *ex vivo*

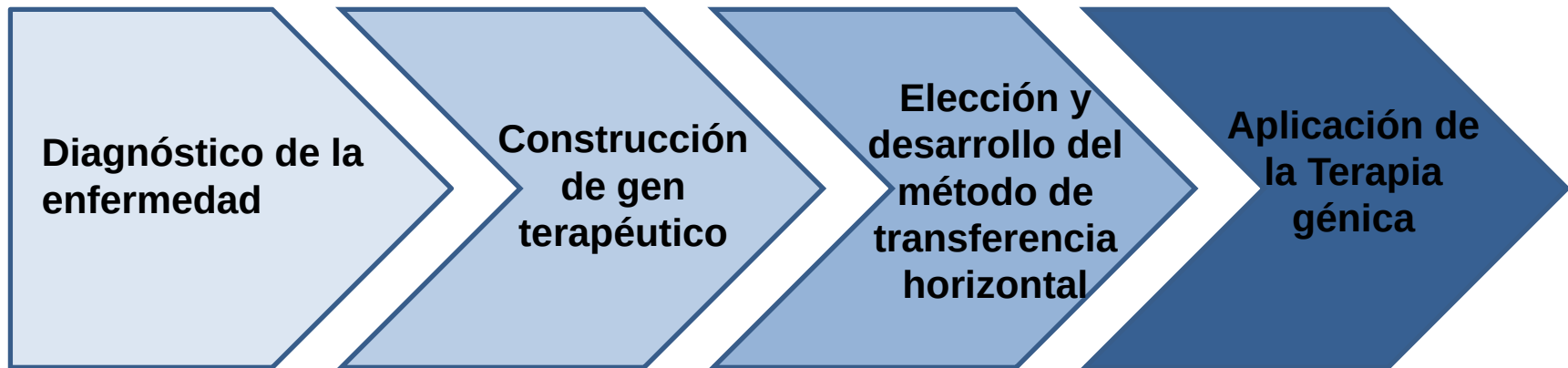
Etapas de su desarrollo y aplicación

- La **terapia génica *ex vivo*** tiene como principal **ventaja** que la **modificación** de las células sucede **fuera del organismo**, **evitando** así las problemáticas derivadas de la **vehiculización del gen terapéutico** y los posibles problemas de **rechazo**.
- Pueden considerarse como **desventajas**: las dificultades de **crecimiento *in vitro*** de algunos tipos celulares; la acumulación de **mutaciones no deseadas** que pueden generarse durante el crecimiento *ex vivo*; la **sobrevida** de las **células en el órgano destino**.

Terapia Génica

Etapas de su desarrollo y aplicación

- Cumplidas las etapas anteriores, sólo resta llevar a cabo el **proceso de aplicación en el ser humano o animal** que evidencia la patología que se pretende tratar.



Terapia Génica

Etapas de su desarrollo y aplicación



Aplicación de
la Terapia
génica

- Existen **numerosos desarrollos de terapia génica**, principalmente en su **etapa de evaluación en modelos animales**. Pero también, **algunos protocolos se están probando en seres humanos**.
- Es emblemático el caso de la **modificación ex vivo de linfocitos T** de niños con inmunodeficiencias severas combinadas (SCID), introduciéndoles con un **retrovirus** copias sanas del **gen adenosina desaminasa**.
- Actualmente, algunos protocolos de **terapia génica in vivo** utilizando como **vehículo a AAV** han mostrado **resultados exitosos** en la recuperación de cegueras congénitas.

***¿Qué es la terapia génica
germinal?***



Terapia Génica Germinal

Consideraciones generales

- La **terapia génica germinal** implica la **modificación genética de los gametos** antes de su fecundación, **o** la modificación del **cigoto**.
- Dada la naturaleza y punto de la transferencia horizontal, se la **asocia** a los **procedimientos** de generación de **organismos genéticamente modificados**. Esto es así porque todas las células del futuro organismo poseerán la modificación genética.
- Dada la **complejidad** del **asunto** y los conflictos bioéticos relacionados, no es una alternativa **extensamente explorada** en **humanos**.



***¿Cuáles son los
procedimientos que están por
salir al mercado?***



Terapia Génica

Productos en el mercado

- Hasta el momento, se han conducido o se están desarrollando alrededor de **1800 ensayos clínicos** basados en **terapia génica**.
- En **2003, China** fue el **primer país** en **aprobar** un producto basado en **terapia génica** para su uso clínico.
- Ese producto, **Gendicine™** (SiBiono Gene Tech Co.) es un **vector adenoviral** donde el gen E1 fue reemplazado por p53 humano.
- Gendicine es un **virus no replicativo** utilizable para el **tratamiento de ciertos carcinomas**.
- Al poco tiempo, **China aprobó** otro producto llamado **Oncorine™**, que es un **adenovirus replicativo condicional** también para **tratamiento oncológico**.

Terapia Génica

Productos en el mercado

- En **2004**, *Ark therapeutics Group plc* recibió la certificación comercial en la Unión Europea para realizar **ensayos con Cerepro^R**.
- **Cerepro** es un **vector adenoviral** portando el **gen de la timidina quinasa de Herpes Virus**, que ya ha pasado la **fase III**.
- Se lo **aplica** en **forma localizada** luego de la extracción de un tumor, y posteriormente se realiza **quimioterapia con ganciclovir**.
- Por otro lado, en **2012** el producto **Glybera** fue recomendado para su aprobación en la Unión Europea.
- Glybera es un **adeno-asociado** que **expresa una lipasa** para el tratamiento de una deficiencia severa en esta enzima.

Terapia Génica

Productos en el mercado



Gendicine para tratamiento **oncológico**

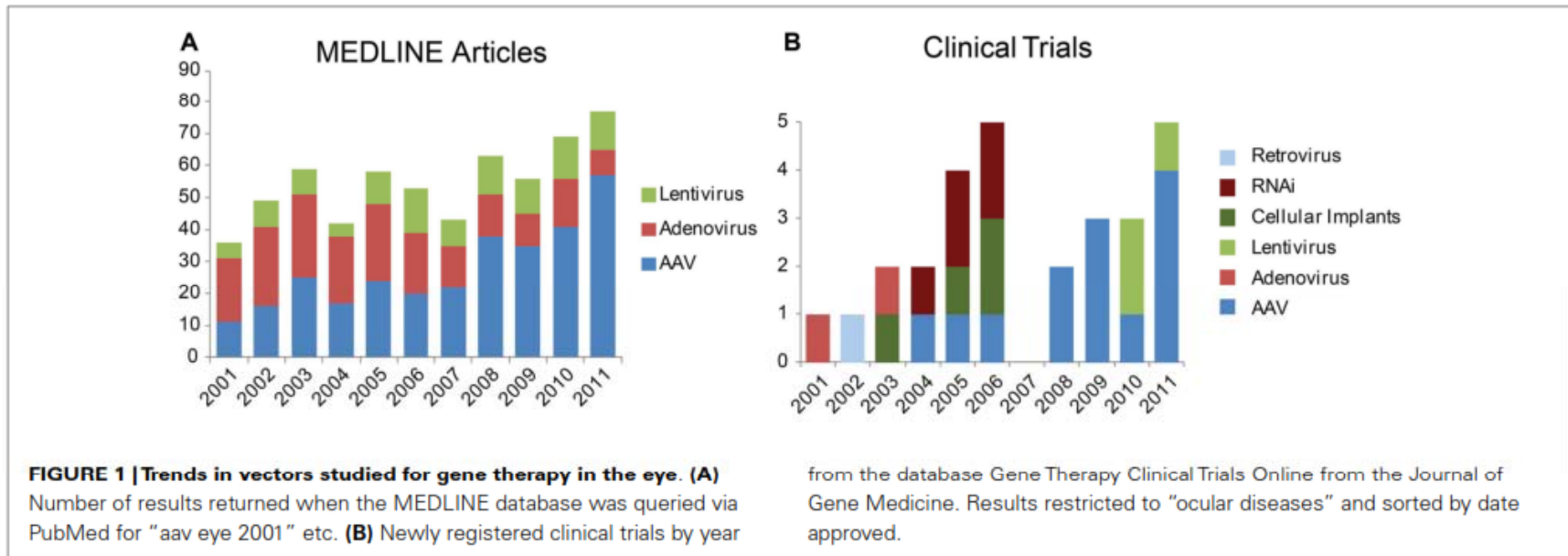


Glybera para tratamiento de una **enfermedad genética**

Terapia Génica

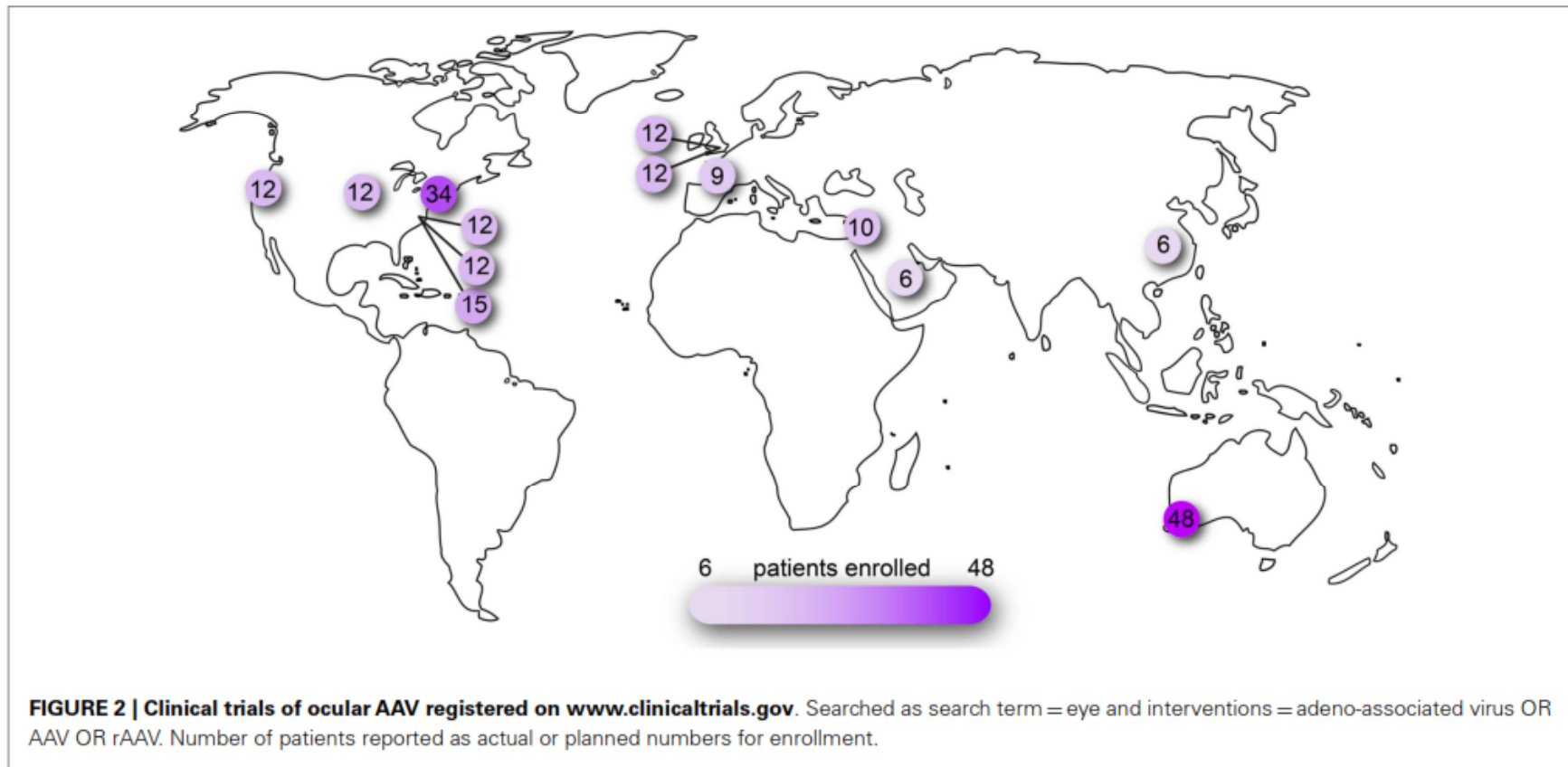
Productos en el mercado

- Actualmente, también se están llevando a cabo las **fases finales de terapias génicas con vehículos virales para enfermedades oculares**.
- El **ojo** es un órgano donde la **respuesta inmune no es tan elevada**, por lo cual es posible el uso de virus para el transporte de genes terapéuticos.



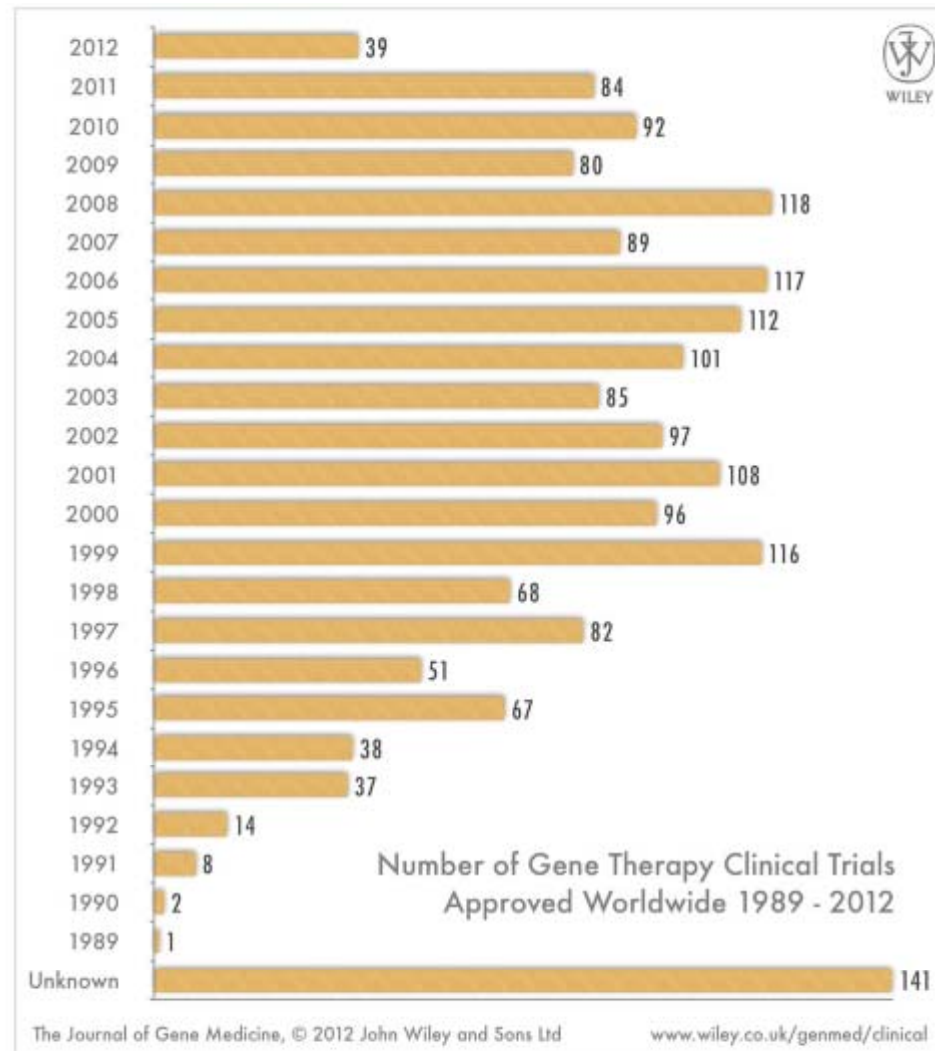
Terapia Génica

Productos en el mercado



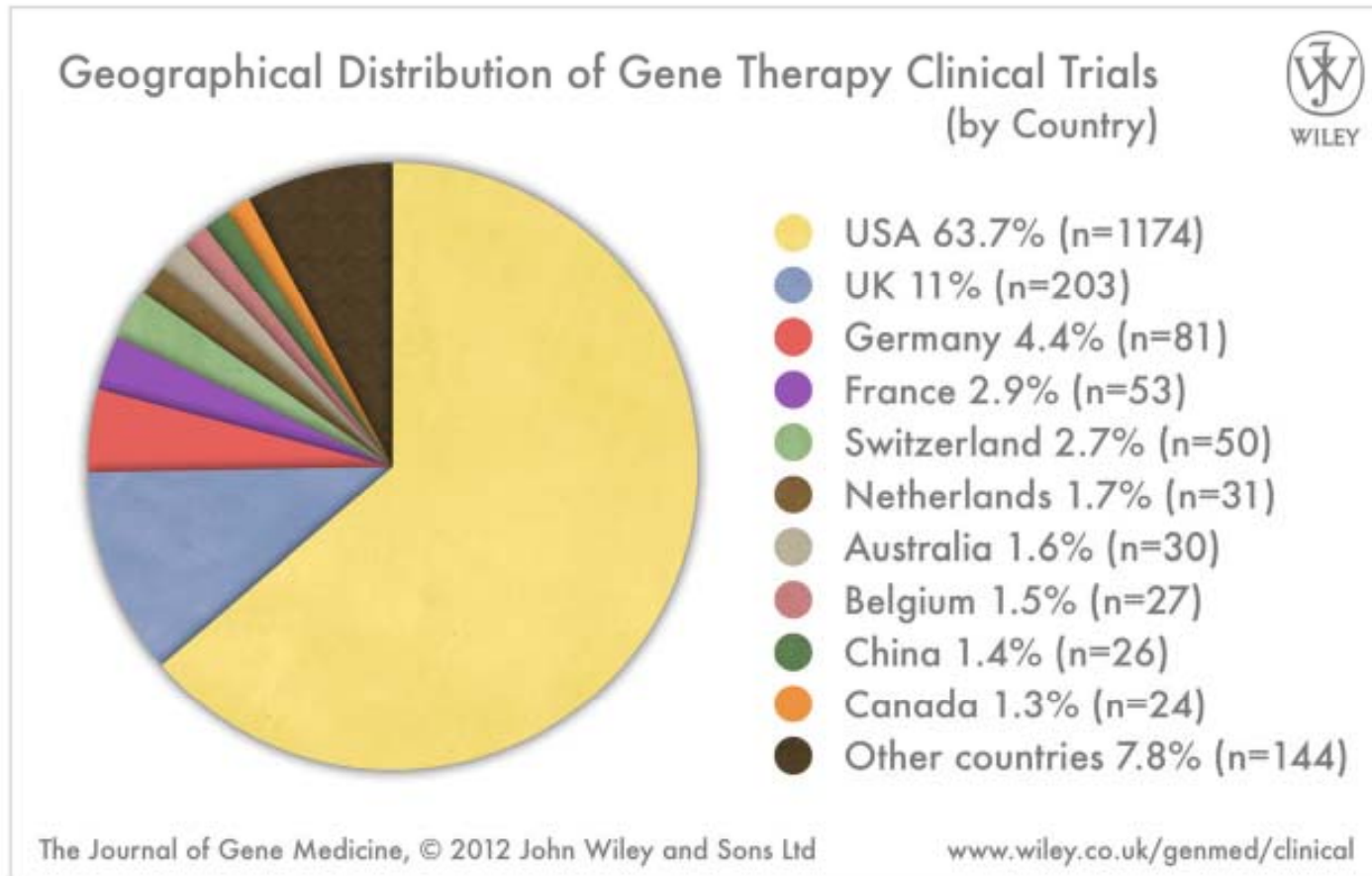
Terapia Génica

Productos en el mercado



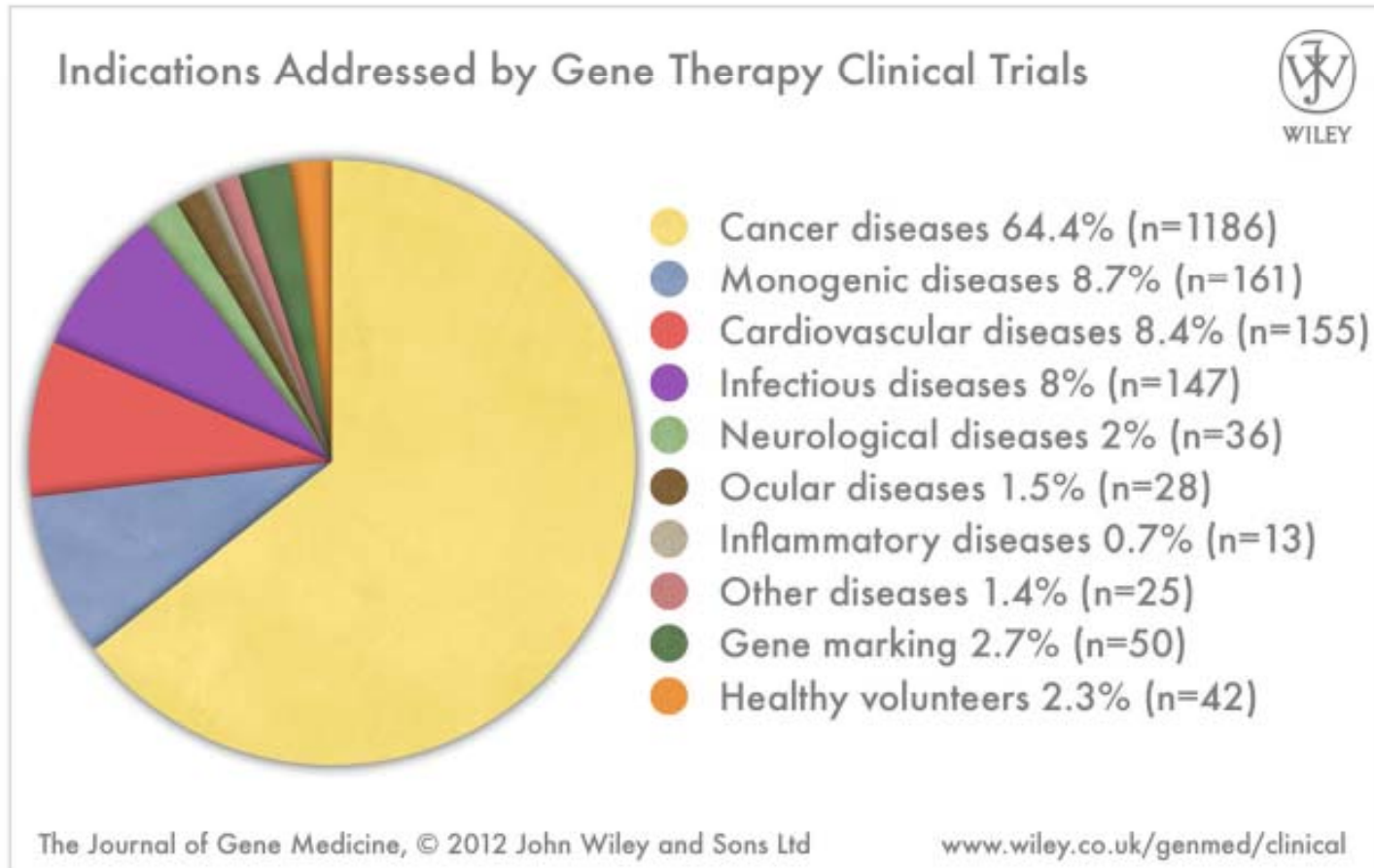
Terapia Génica

Productos en el mercado



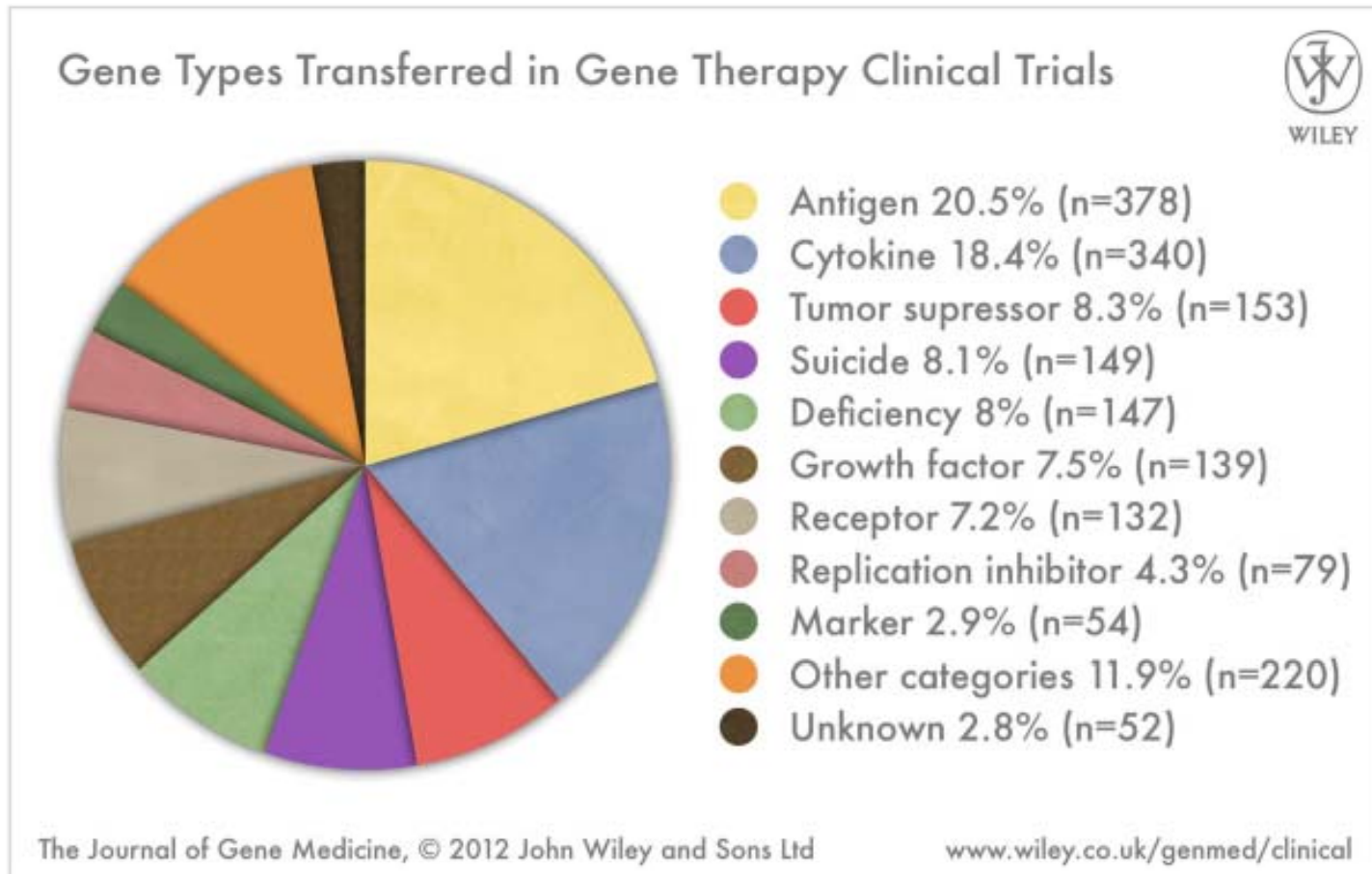
Terapia Génica

Productos en el mercado



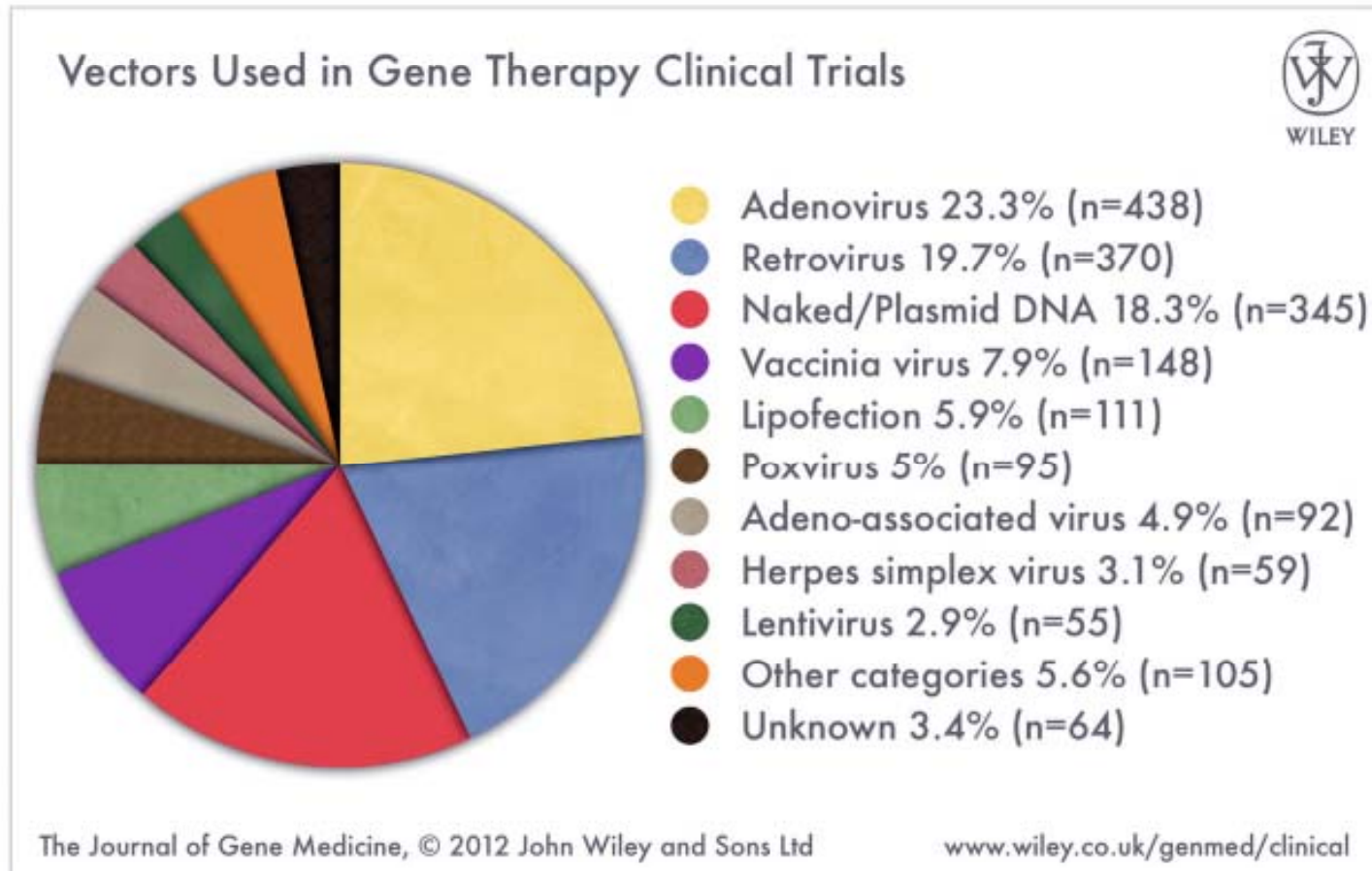
Terapia Génica

Productos en el mercado



Terapia Génica

Productos en el mercado



Terapia Génica

Productos en el mercado

