
TERAPIA GÉNICA

Programa Terapia Génica. Universitat de València.
Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina y Odontología

C.E. DURVIZ, S.L.

¿QUÉ ES LA TERAPIA GÉNICA?

Es una **estrategia terapéutica** basada en la modificación del repertorio genético de células somáticas mediante la administración de ácidos nucleicos y destinada a curar tanto enfermedades de origen hereditario como adquirido.

La terapia génica se presenta como una **promesa terapéutica** de utilidad en todo tipo de patologías, la cual probablemente revolucionará nuestra concepción de la Medicina. El surgimiento de la terapia génica **ha sido posible gracias** a la confluencia de los avances del conocimiento en campos tales como: Biología Molecular y Celular, Genética, Virología, Bioquímica y Biofísica entre otras. **En la actualidad** no cabe duda que la adecuada articulación de estos conocimientos junto con los avances propiciados por el Proyecto Genoma Humano, así como el mejor conocimiento de las bases moleculares de la patología, los estudios experimentales en terapia génica y el desarrollo de vectores que permitan la entrega selectiva de genes con seguridad y eficacia, permitirán en un futuro próximo que la utilización de genes y/o ácidos nucleicos como fármacos o medicamentos sean una realidad con insospechadas aplicaciones terapéuticas.

ANTECEDENTES

- 1869 **Miescher:** Aislamiento del DNA.
- 1944 **Avery:** El DNA es el portador de la información genética.
- 1953 **Watson y Crick:** Estructura helicoidal del DNA.
- 1957 **Kornberg:** DNA polimerasa.
- 1962 **Arber:** Primera evidencia sobre enzimas de restricción.
- 1966 **Nirenberg, Ochoa, Khorana:** Código genético.
- 1972 **Boyer, Cohen, Berg:** Técnicas clonación del DNA.
- 1975 **Songer, Barrell y Maxam, Gilbert:** Métodos de secuenciación.
- 1981 **Palmiter y Brinster:** Ratones transgénicos.
- 1990 **Blaese, Anderson, Culver:** Terapia Génica Humana.

**Tecnología
del DNA
Recombinante**



FUNDAMENTOS DE LA TERAPIA GÉNICA

VECTORES

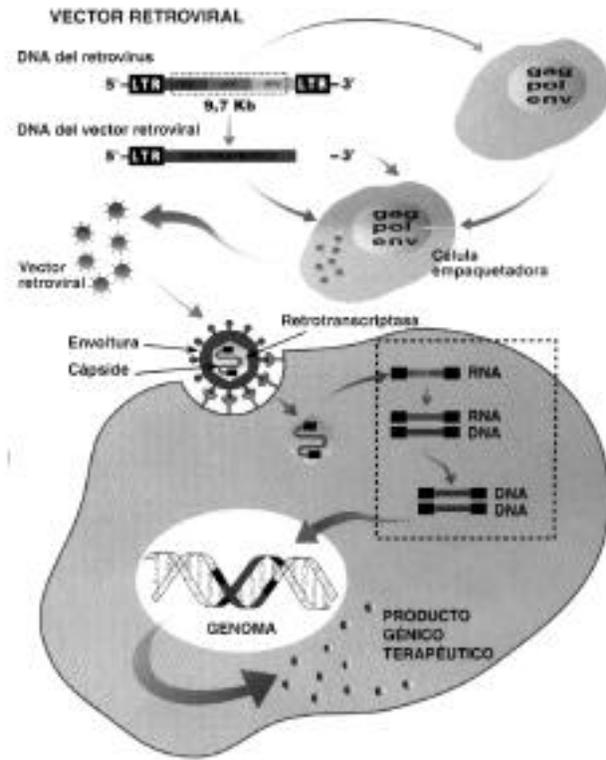
Los vectores son sistemas que ayudan en el proceso de transferencia de un gen exógeno a la célula, facilitando la entrega y biodisponibilidad intracelular del mismo de tal modo que éste pueda funcionar correctamente. Se ha utilizado una gran variedad de vectores con fines experimentales, pero todos ellos pueden ser clasificados en: vectores virales y vectores no-virales. Los vectores virales ofrecen como ventajas la especial capacidad de los virus para infectar células y facilitar la expresión de genes exógenos pero presentan como desventajas la respuesta inflamatoria y anti viral del sistema inmunitario, lo cual constituye un riesgo para el

paciente y una limitación para el tratamiento con dosis múltiples. Los vectores no-virales son menos efectivos como sistemas de transferencia génica pero ofrecen como principal ventaja la seguridad. Además, permiten que los genes puedan ser formulados como medicamentos, ser estudiados farmacológicamente y administrados al paciente de una forma dosis-dependiente.

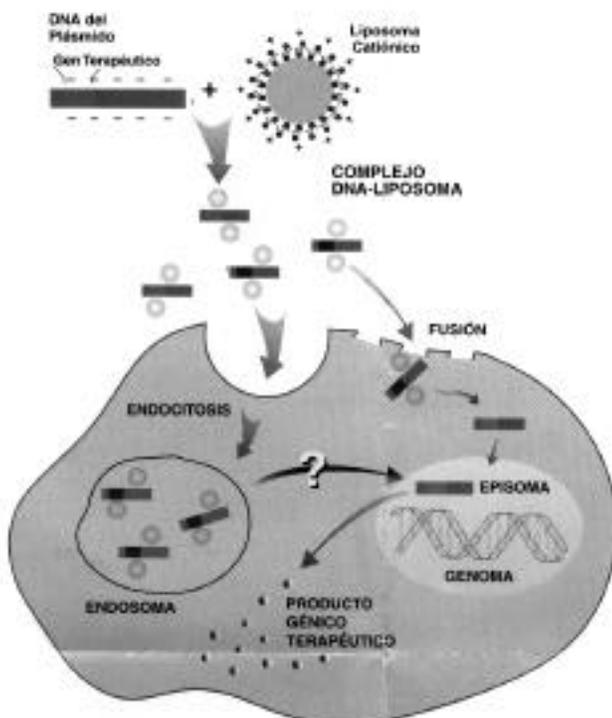
La mayor parte de los ensayos clínicos en terapia génica, dirigidos principalmente a corregir desórdenes hereditarios o al tratamiento del cáncer, han utilizado como vectores virales los retrovirus o adenovirus y como vectores no-virales los complejos DNA-liposoma.

VECTOR RETROVIRAL

Los retrovirus son virus cuyo genoma (aprox. 9.7 kb) está constituido por una cadena simple de RNA y que replican mediante la formación de una cadena doble de DNA (provirus) como intermediario. En el ciclo vital del virus existe una etapa obligatoria en la cual la doble cadena de DNA se inserta en el genoma de la célula huésped (merced a las secuencias LTR del virus), llegando así a formar parte del material genético de la célula que infecta. Los vectores retrovirales utilizados en terapia génica humana, pierden su capacidad de replicación al eliminar del virus las secuencias gag, pol y env que codifican nucleoproteínas, proteínas responsables de la síntesis o recombinación de los ácidos nucleicos y componentes de la envoltura de la partícula viral, respectivamente.



En contrapartida, al genoma viral se le incorpora una nueva secuencia génica conteniendo el gen terapéutico. El vector retroviral, deficiente en replicación, se amplifica mediante crecimiento en una línea celular especial (células empaquetadoras) que contienen en su genoma las secuencias gag, pol y env necesarias para la replicación y empaquetamiento del virus. El vector conteniendo el gen terapéutico infecta a la célula diana, utilizando receptores específicos y una vez en el citoplasma, la transcriptasa inversa (transportada por el vector) convierte el vector RNA en el DNA proviral el cual es integrado al hazar en el genoma de la célula infectada y desde donde el gen expresará su producto terapéutico.



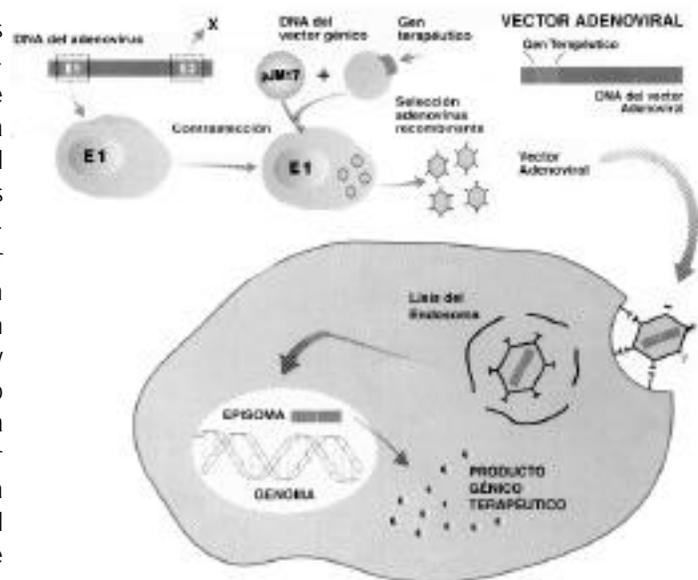
VECTOR NO-VIRAL: COMPLEJO DNA-LIPOSOMA

El transporte de genes mediado por liposomas está basado en la asociación del DNA plasmídico a vesículas formadas por autoensamblaje de bicapas de lípidos. Comparados con los vectores virales así como con otros vectores no-virales tales como los complejos DNA-polilisina, los liposomas son vectores de baja toxicidad que

inducen una escasa o nula respuesta inmunitaria cuando se administran in vivo, pero cuya eficacia de transfección es baja. Existen dos principales clases de liposomas, basados en su composición y/o carga neta final: liposomas aniónicos y catiónicos. Habitualmente, los primeros han sido preparados para encapsular el DNA en el liposoma, mientras que los liposomas catiónicos han sido formulados como complejos DNA-liposoma, para la transferencia de genes. La carga positiva del lípido facilita la interacción del liposoma tanto con el DNA como con la superficie celular, conduciendo a una relativamente eficaz entrada a la célula diana. Aunque la mayor parte del material genético transportado es secuestrado y/o degradado en los endosomas, una pequeña proporción alcanza el núcleo en donde permanece en su mayor parte (sino en toda) en forma de un epicromosoma, permitiendo la expresión del gen terapéutico. Este tipo de liposoma es el único vector no-viral que ha demostrado ser suficientemente eficaz y seguro como para iniciar ensayos clínicos.

VECTOR ADENOVIRAL

Los adenovirus son virus cuyo genoma (aprox. 36 Kb) está constituido por una doble cadena lineal de DNA. Existe una amplia variedad de adenovirus pero los serotipos 2 ó 5 son los utilizados para construir vectores. El genoma de los adenovirus se divide en genes tempranos (E1 a E4) y genes tardíos (L1 a L5). Puesto que la capacidad del genoma adenoviral para dirigir la producción de adenovirus reside en las secuencias ubicadas en E1, las estrategias para producir vectores adenovirales consisten en eliminar dichas secuencias e incorporar en su lugar el gen terapéutico, generando así un vector adenoviral sin capacidad de replicación. El posterior crecimiento y amplificación del vector se lleva a cabo utilizando una línea celular complementaria, conteniendo la secuencia E1 en su genoma. Por último, el vector adenoviral conteniendo el gen terapéutico, se une a la célula diana mediante interacción de la fibra y el pentón del adenovirus con receptores específicos de la célula. El vector es internalizado por un mecanismo mediado por receptor y una vez en el endosoma se produce la lisis del mismo. El DNA viral conteniendo el gen terapéutico es liberado al citoplasma desde donde alcanza el núcleo y donde permanece como un DNA extracromosómico (episoma) dirigiendo la expresión del gen terapéutico.



ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GÉNICA *IN VITRO*

Métodos no-virales

Químicos: Fosfato cálcico.

Físicos: Electroporación, Microinyección, Bombardeo de partículas.

Fusión: Complejos DNA-Liposomas.

Endocitosis mediada por receptor: Complejos DNA-proteína, Complejos DNA-cápside/envoltura viral, Inmunoliposomas/liposomas destinados.

Métodos virales: Adenovirus, Retrovirus, Virus Adeno-Asociados.

El tratamiento está basado en la obtención previa de células del paciente procedentes de un tejido u órgano de interés. A continuación se procede a la disgregación de las mismas y su mantenimiento en condiciones de cultivo de tejidos *in vitro*, en donde las células son posteriormente transfectadas con el "gen terapéutico" utilizando para ello un vector adecuado. Las células transfectadas son seleccionadas en función de su capacidad para expresar el gen exógeno de forma estable y persistente. Las células así seleccionadas son amplificadas y recolectadas con el fin de ser reimplantadas al paciente. También se puede utilizar líneas celulares alogénicas en aquellos casos en los que el órgano o tejido de interés no puede ser extraído con facilidad o que ofrece dificultad de crecimiento *in vitro*.



ESTRATEGIAS *IN VIVO*

MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GÉNICA *IN VIVO*

Métodos no-virales

Inespecíficos: DNA desnudo, Complejos DNA-Liposomas.
Específicos: mediado por receptor:
Complejos DNA-proteína, Inmunoliposomas/liposomas destinados

Métodos virales

Adenovirus, Retrovirus
Virus Adeno-Asociados
Virus Herpes Simplex

Vector no destinado



Vector destinado



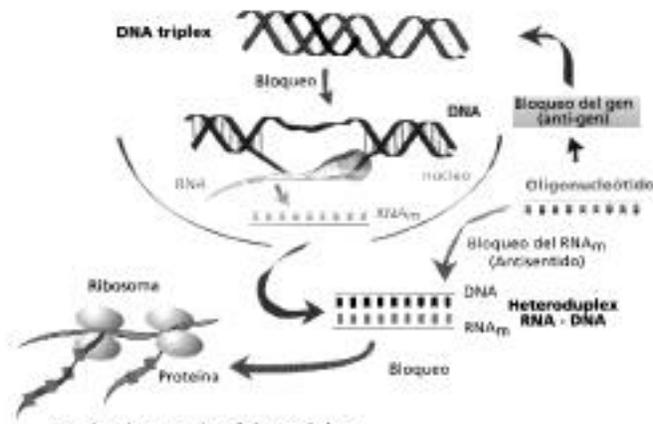
Distribución de un gen en el organismo, cuando se administra en forma libre (izquierda) o dirigido al hígado (derecha).

El tratamiento está basado en la administración sistémica de la construcción génica de interés. Aunque el DNA puede ser administrado de forma directa, lo habitual es recurrir a la ayuda de algún vector que facilite el proceso de transferencia del gen y permita la entrada y localización intracelular del mismo, de tal suerte que éste resulte en un gen funcionante. Asimismo, es importante recurrir vectores con destino específico dentro del organismo lo cual permite la entrega celular selectiva del gen en un determinado órgano o tejido, sin requerir para ello procedimientos traumáticos o quirúrgicos.

OTRAS ESTRATEGIAS UTILIZANDO ÁCIDOS NUCLÉICOS

La terapia génica supone la manipulación genética de las células utilizando procedimientos destinados tanto a reparar o incorporar nuevos genes en la célula como a bloquear o inhibir la sobre expresión de los mismos, con fines terapéuticos.

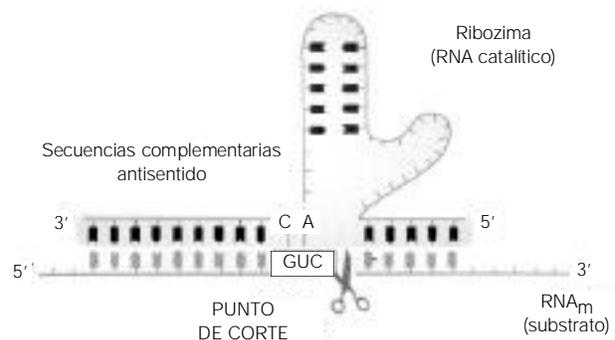
Oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos son secuencias cortas de ácidos nucleicos diseñadas para unirse a secuencias específicas de DNA (formación de DNA triplex) o RNA (formación heteroduplex RNA-DNA). Los oligonucleótidos antisentido son complementarios de secuencias específicas de un determinado RNA mensajero (secuencia sentido).



La formación de un heteroduplex bicatenario sentido-antisentido bloquea la traducción del mensaje genético a proteína. Las estrategias antisentido tienen un gran potencial terapéutico para inhibir la expresión de genes en patologías tales como el cáncer, enfermedades autoinmunes y enfermedades infecciosas como el SIDA. Sin embargo, su aplicación clínica se ha visto limitada por su corta vida media en la circulación sistémica y su dificultad para acceder con actividad funcional al citoplasma y/o núcleo celular.

Reparación génica mediante oligonucleótidos. Es una estrategia destinada a reparar genes cuya alteración es originada por una mutación puntual conocida y el objetivo es activar selectivamente los mecanismos celulares de reparación del DNA, en el lugar de la mutación. Para ello se diseñan oligonucleótidos específicos para secuencias genómicas adyacentes al lugar de la mutación, en cuyo extremo el oligonucleótido lleva un agente capaz de lesionar el DNA, mediante la formación de un enlace covalente con el nucleótido responsable de la mutación. La lesión selectiva del nucleótido mutado, desencadena el proceso celular de reparación del DNA que conduce a una normalización estructural y funcional del gen.

Ribozimas. Son RNAs catalíticos que pueden actuar como una endoribonucleasa secuencia específica, para lo cual utilizan unas Secuencias Guía Internas (IGS) que le permiten unirse a secuencias complementarias (antisentido) de un determinado RNA. Mediante mutaciones del elemento IGS es posible cambiar la especificidad del ribozima hacia un RNA específico conteniendo las secuencias complementarias a la nueva secuencia de la región IGS. Se han aprobado ensayos clínicos utilizando ribozimas en pacientes con SIDA, con el fin de intentar degradar moléculas específicas de RNA en las células infectadas con el VIH.



TERAPIA GÉNICA HUMANA: PRESENTE Y FUTURO

VECTOR IDEAL

Aunque las prioridades del vector ideal pueden variar en función de la aplicación concreta, en todos los casos el vector desempeña una importante función en el éxito del proceso completo de la terapia génica, cuyas

principales etapas son: destino, entrega y expresión del gen. En este sentido, las principales características deseables en un vector son:

- Que pueda ser destinado con la mayor especificidad celular posible a un órgano o tejido.
- Que proteja al DNA de posibles degradaciones enzimáticas durante su transporte.
- Que facilite la entrega del gen terapéutico a la célula con una elevada biodisponibilidad.
- Que permita la expresión del gen con eficacia.
- Que no sea reconocido por el sistema inmunitario ni despierte respuestas inflamatorias.
- Que sea seguro para el paciente y el entorno.

TERAPIA GÉNICA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y AUTOINMUNES

Estas estrategias están basadas en la deplección de subpoblaciones celulares infectadas por virus (por ejemplo VIH) o linfocitos T autoreactivos bien mediante la administración directa de ácidos nucleicos o genes o bien indirectamente, mediante el desarrollo de vacunas por terapia génica.

TERAPIA GÉNICA DEL CÁNCER

Destino y objetivo		
Destino del Gen Terapéutico	Tipos y Productos Génicos	Objetivo Terapéutico
Células del sistema Inmunitario	Citoquinas: TNFalfa Modificación Tumoral: Receptor Quimérico de Células T	Terapia Génica ex vivo: células efectoras anti-tumorales del sistema inmune, son modificadas genéticamente y reimplantadas. Su capacidad para alcanzar y residir dentro del tumor, es aprovechada para liberar en el interior del mismo el producto de genes exógenos.
Células Progenitoras Hematopoyéticas	Resistencia a Fármacos: MDR	La incorporación de genes MDR en células progenitoras del sistema hematopoyético les confiere resistencia para sobrevivir a altas dosis de quimioterapia.
Células tumorales (y/o fibroblastos)	Citoquinas: IL2, IL4, IL7, IL12, IFNy, GM-CSF, TNFalfa Vacunas: HLA, B7, antígenos tumorales Profármacos: HSV-TK, citosindeaminasa Supresores tumorales: p53, E1A, BRCA1, RB Antioncogenes: anticuerpos de cadena simple anti-erb B2, estrategias antisentido (myc, Fos, K-ras)	Aumentar la respuesta inmune antitumoral del paciente. Aumentar la respuesta antitumoral (celular y/o humoral) específica del sistema inmune. Transformación selectiva en las células de un profármaco en un agente citotóxico. Inducción de apoptosis y/o muerte celular. Inducción de apoptosis y/o muerte celular.

Estrategias

Tumor	Citoquinas	Vacunas	Antisentido	Profármacos citotóxicos	Supresor Tumores	Anti oncogenos	Protección Hematopoyética
Cerebro	sí	-	sí	sí	-	-	sí
Mama	sí	sí	-	-	-	sí	sí
Colorectal	sí	sí	sí	sí	sí	-	-
Cabeza/cuello	sí	sí	-	sí	sí	-	-
Pulmón	sí	sí	sí	-	sí	sí	-
Linfoma	sí	sí	sí	-	-	-	-
Melanoma	sí	sí	-	-	-	-	-
Neuroblastoma	sí	-	-	-	-	-	-
Retinoblastoma	-	-	-	sí	-	-	-
Ovario	sí	s	-	sí	sí	sí	sí
Próstata	sí	sí	-	sí	-	sí	-
Renal	sí	sí	-	-	-	-	-
Estómago	-	sí	-	-	-	-	-
Páncreas	-	sí	-	-	-	-	-
Hepático/biliar	-	-	-	-	sí	-	-

TERAPIA GÉNICA DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS

Patología Primaria	Producto Génico	Destino del Gen Terapéutico
Adenosin Deaminasa (deficiencia)	ADA	Célula T, Célula Progenitora hematopoyética
Alfa-1-Antitripsina (deficiencia)	Alfa-1-Antitripsina	Epitelio respiratorio, hepatocito
Enfermedad de Gaucher	Glucocerebrosidasa	Célula progenitora hematopoyética
Fibrosis Quística	CFTR	Epitelio respiratorio
Granulomatosis Crónica	p47 ^{phx}	Célula progenitora hematopoyética
Hemofilia A y B	Factores VIII y IX	Hepatocito
Hipercolesterolemia familiar	LDLr	Hepatocito
Mucopolisacaridosis II (síndrome Hunter)	Irudonato-2-sulfatasa	Célula T
Ornitina Transcarbamilasa (deficiencia)	OTC	Hepatocito
Purina nucleósido fosforilasa (deficiencia)	PNP	Célula T

