

# GENE THERAPY



Corso di Ingegneria Genetica e Terapia Genica  
*Ballarino Monica*

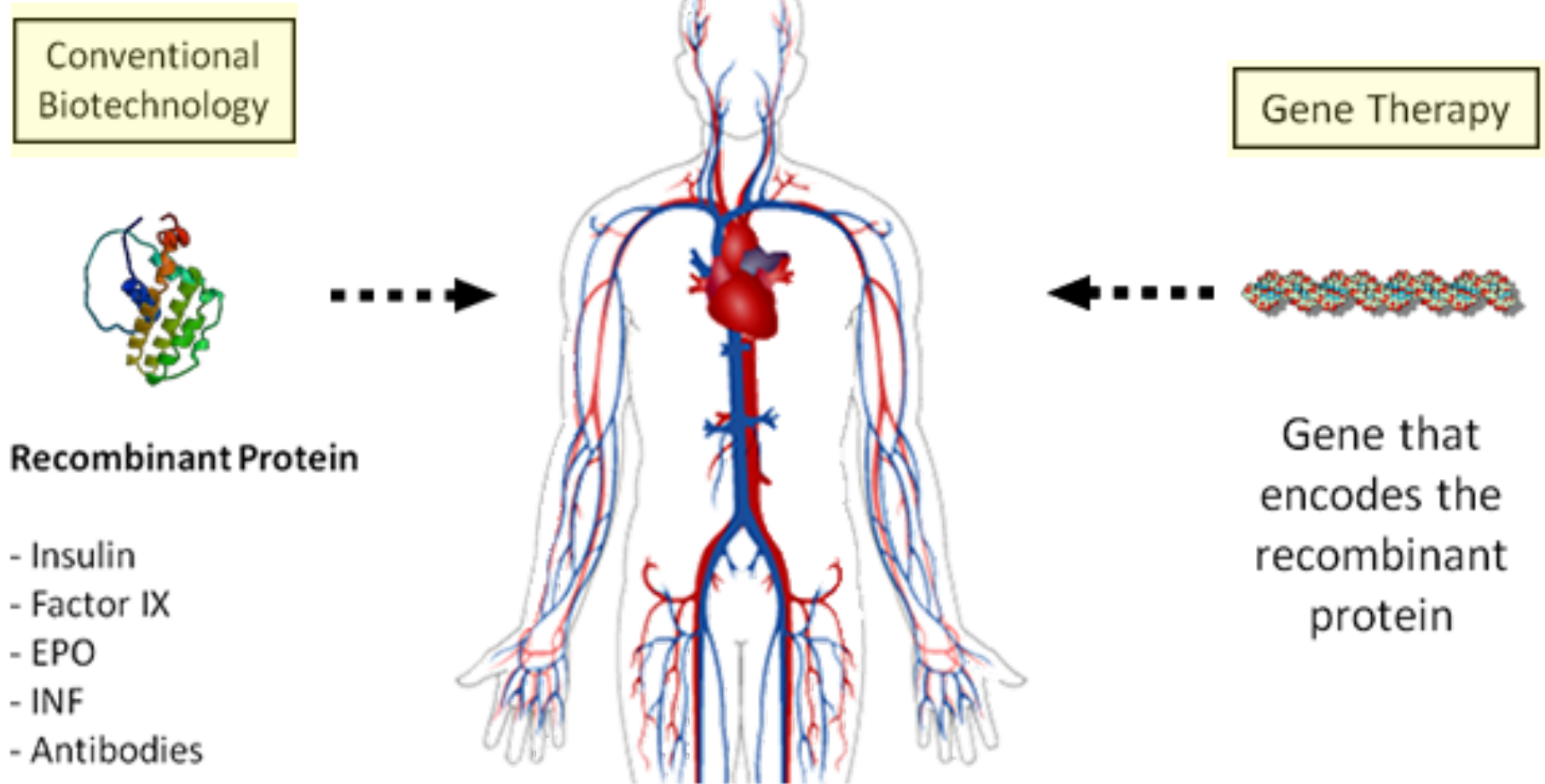
# TERAPIA GENICA

*trasferimento* di materiale genetico allo scopo di prevenire o curare una malattia per *modifica* genetica delle cellule del paziente

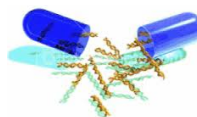
- *Overdosaggio* genico
- *Silenziamento* genico
- *Riparazione* di sequenze mutate



# TERAPIA GENICA

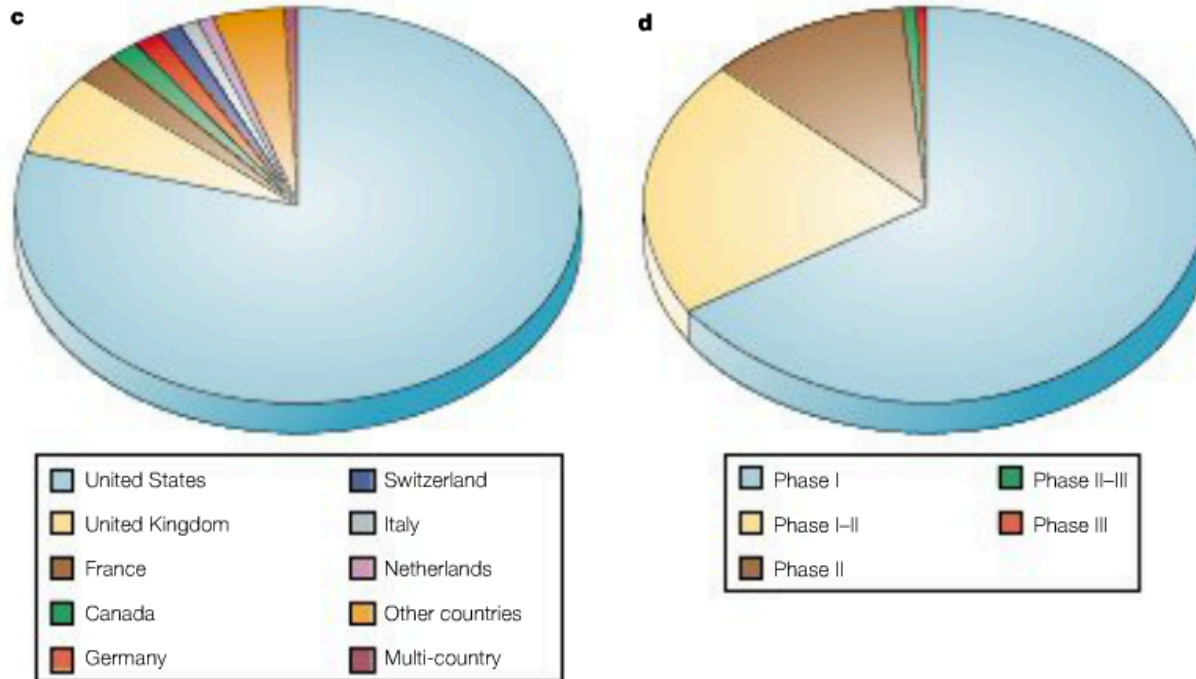


**Il farmaco e' il materiale genetico**



# Gene Therapy Clinical Trials Worldwide

Provided by the Journal of Gene Medicine

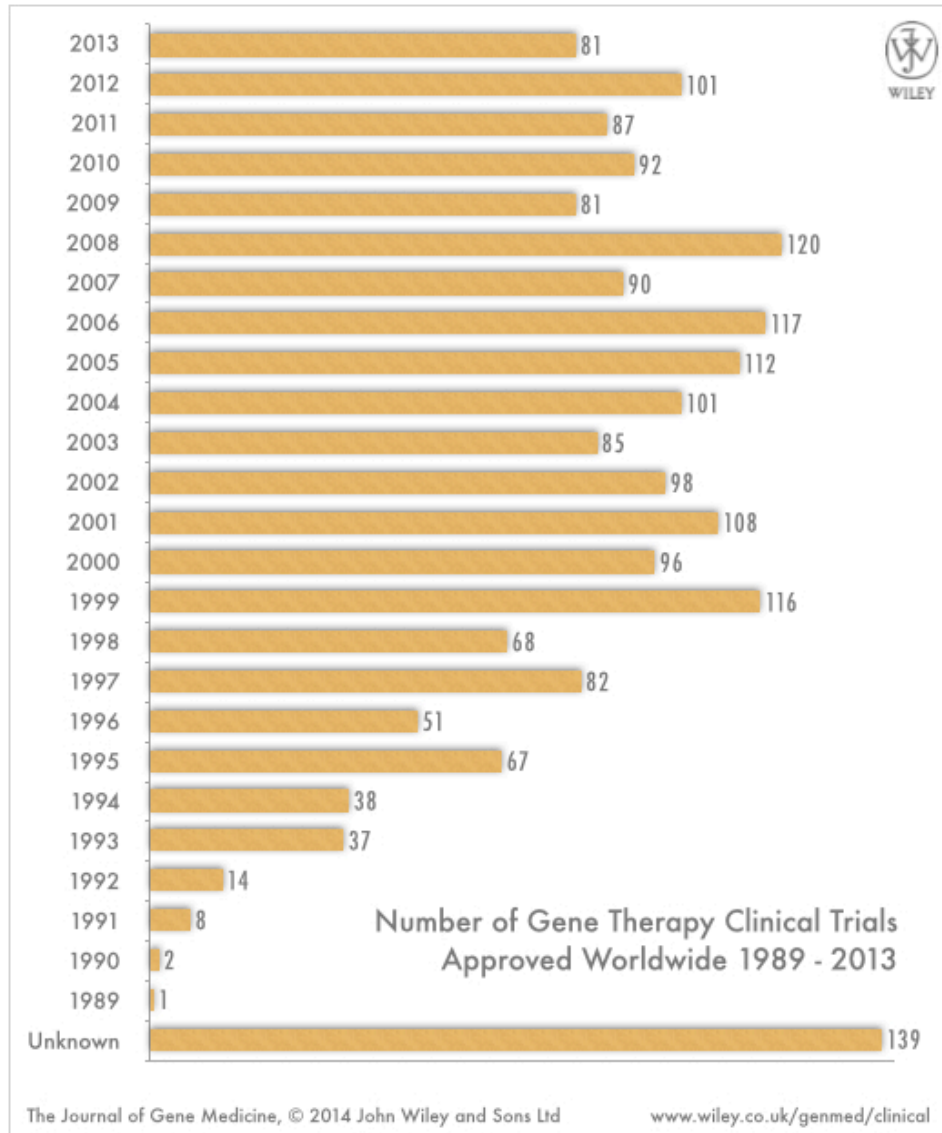


- In **Phase 1** trials, researchers test an experimental drug or treatment in a *small group of people* (20–80) for the first time to evaluate its safety, determine a safe dosage range, and identify side effects.
- In **Phase 2** trials, the experimental treatment is given to a *larger group of people* (100–300) to see if it is effective and to further evaluate its safety.
- In **Phase 3** trials, the treatment is given to *large groups of people* (1,000–3,000) to confirm its effectiveness, monitor side effects, compare it to commonly used treatments, and collect information that will allow it to be used safely.
- In **Phase 4** trials, post-marketing studies delineate additional information, including the treatment's risks, benefits, and optimal use.



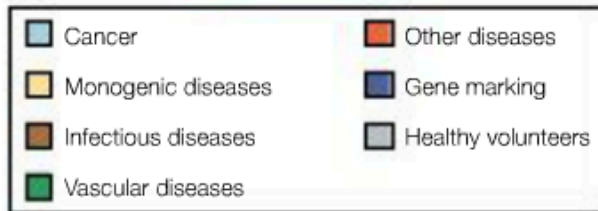
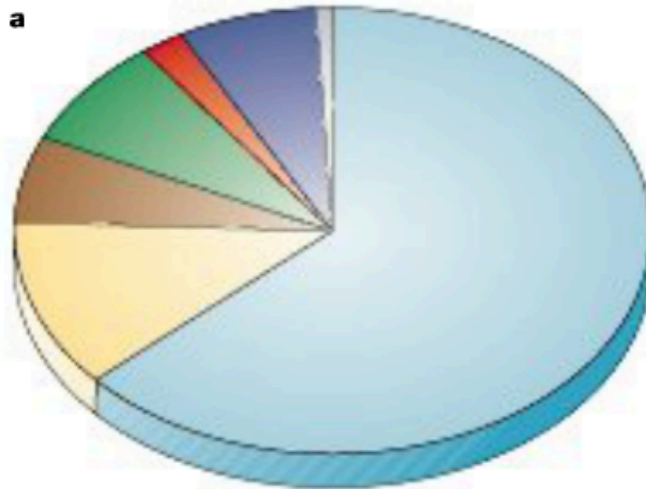
# Gene Therapy Clinical Trials Worldwide

Provided by the Journal of Gene Medicine

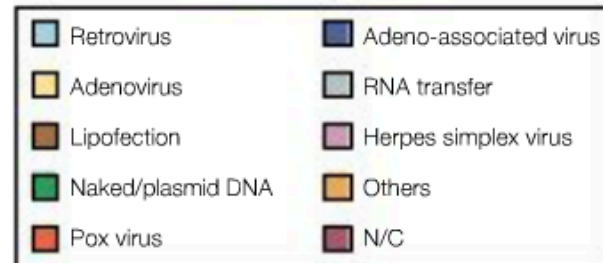
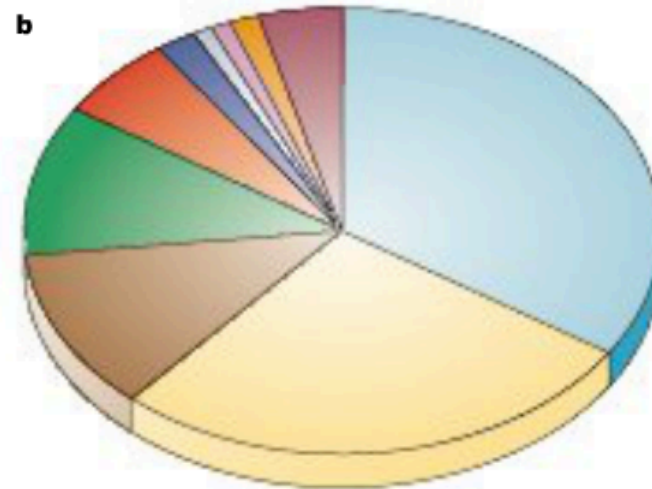


# Gene Therapy Clinical Trials Worldwide

Provided by the Journal of Gene Medicine



Most gene-therapy clinical trials are designed to treat **cancer**.



*Retrovirus* vectors and *adenovirus* vectors have, so far, been the most commonly used vectors in gene-transfer trials.

# TERAPIA GENICA

## VANTAGGI

- Correzione *radicale* dei difetti
- Azione su meccanismi molecolari per i quali risulta *difficile sviluppare farmaci specifici*
- Vantaggi *economici* (se permanente evita la necessità di trattamenti ripetuti)

## LIMITAZIONI

- Poca necessità (disponibili terapie *alternative*)
- Grandi problemi tecnici
- Problemi *tecnici* della terapia genica ed effetti indesiderati :
  - Efficienza* di trasferimento (vettori *virali* migliori di *non virali*)
  - Selettività* del sistema di trasferimento
  - Espressione *non* regolata
  - Reazioni del sistema immunitario
  - Problemi etici

## Necessità della Terapia genica

Comprendere *meccanismi* fisiopatologici della malattia bersaglio



Identificare *bersaglio* cellulare ideale per il rilascio genico



Identificare il *metodo* e la *strategia* per il trasferimento genico



Definire il *livello terapeutico* e la *durata* d'espressione del gene introdotto



Definire il *numero* di cellule da utilizzare nel trasferimento



Definire *l'età* ottimale del paziente da arruolare per il trattamento

ciascuna patologia richiede quindi una **differente metodica** e presenta delle **problematiche tecniche peculiari**

## Tappe fondamentali

1866	Fattori ereditabili ( <i>Mendel</i> )
1868	Identificazione acidi nucleici
1933	I geni sono contenuti nei cromosomi ( <i>Morgan</i> )
1944	<b>DNA portatore dell'informazione genetica (Avery)</b>
1951	Scoperta dei trasposoni ( <i>McClintock</i> )
1953	Doppia elica ( <i>Watson e Crick</i> )
1956	DNApoll ( <i>Kornberg</i> )
1957	Dogma centrale ( <i>Crick</i> )
1963	Metodo sequenziamento DNA ( <i>Sanger</i> )
1963	Enzimi di restrizione
1965	Decifrato Codice genetico
1972	I molecola di DNA ricombinante ( <i>Berg</i> )
1973	Tecnologia del clonaggio genico ( <i>Boyer</i> )
1981	Topo transgenico
1984-2004	Progetto Genoma ( <i>Collins</i> )
1985	PCR ( <i>Mullis</i> )
1990	<b>Primo trattamento di terapia genica realizzato con successo su una bambina affetta da SCID (W. F. Anderson)</b>
1995	Test del DNA per casi giuridici
1995	Inizio trials clinici per la SCID
1999	Primo morto per reazione infiammatoria per terapia genica (OTC)
2002	Cure SCID

# Adverse events in gene therapy:

## 1999: adenovirus vector causes patient death

In September 1999, 18-year-old Jesse Gelsinger took part in a gene-therapy clinical trial at the University of Pennsylvania. Gelsinger suffered from a partial deficiency of ornithine transcarbamylase (**OTC**), a liver enzyme that is required for the safe removal of excessive nitrogen from aminoacids and proteins. By the morning after his treatment ( $3.8 \times 10^{13}$  particles), he was displaying symptoms of liver injury and **DISSEMINATED INTRAVASCULAR COAGULATION**. Within four days of treatment, Gelsinger died from multi-organ failure.

Although the vector had been infused directly into the liver through the hepatic artery, substantial amounts of the vector had disseminated into the circulation and had triggered a massive inflammatory response



Jesse Gelsinger's death from a gene therapy clinical trial in 1999 raised many questions concerning the safety of experimental gene therapy treatments.



Photo: Courtesy of 'Jeans for Genes'

Ten-month-old Rhys Evans was successfully treated with gene therapy for SCID in 2001.

## 2002–2003: retrovirus vector induces a lymphoproliferative disorder

In April 2000, three young children suffering from the SCID-XI syndrome had developed functional immune systems after the reinfusion of haematopoietic stem cells **TRANSDUCED** with an MLV vector.

Two of the three patients developed a leukaemia-like disorder: the cancerous T cells are thought to be derived from single transduced cells in which the retrovirus genome had inserted near, or in, the LIM domain only 2 (LMO2) oncogene, activating LMO2 expression.

## La scoperta del DNA: alcuni cenni storici

- 1928 *F. Griffith* scoprì che i caratteri della forma “liscia” di *Pneumococcus* potevano essere trasferiti alla forma “rugosa”, miscelando i batteri “lisci” morti con batteri “rugosi” vivi. Questo sistema, *pur non fornendo nessuna evidenza* su quale fosse la sostanza che determinava il cambiamento, mostrava che qualcosa potesse **trasportare l'informazione** genetica dai resti dei batteri morti a quelli vivi. Si parlò quindi di un **principio trasformante** in grado di modificare i batteri vivi.
- 1943 *O. Theodore Avery* dimostrò che **il DNA è il principio trasformante** alla base di questo fenomeno.
- 1953 *Alfred Hershey e Martha Chase* dimostrarono che il materiale genetico del fago T2 è effettivamente il DNA: ruolo del DNA nell'ereditarietà



# Trasferimento del DNA in cellule bersaglio

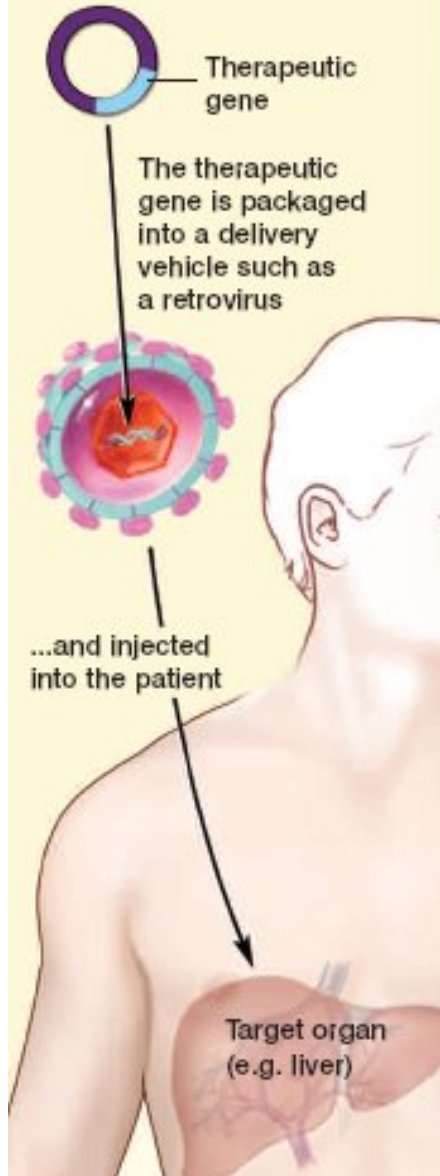
Il gene sano viene dapprima *clonato* nel vettore appropriato e poi *inserito* nelle cellule mutate per produrre cellule *geneticamente modificate*.

**1. *in vivo*:** trasferimento di DNA **direttamente** nelle cellule del paziente ("direct delivery"). Il gene terapeutico è impacchettato in un veicolo di rilascio (come un retrovirus) usato per infettare il paziente nel tessuto nell'organo target.

**2. *ex vivo*:** il DNA prima trasferito in cellule bersaglio isolate dall'organismo e fatte crescere in laboratorio ("cell-based delivery"). Cellule ES geneticamente modificate, cellule ES dalla banca HLA, somatic-cell nuclear transfer (SCNT) fatte differenziare *in vitro*, oppure cellule staminali prelevate dall'adulto vengono messe in coltura e trattate in modo da ricevere il gene terapeutico mediante vettore. Dopo la crescita e la selezione delle cellule che hanno effettivamente ricevuto il gene terapeutico (ora *geneticamente modificate*) vengono reintrodotte nel paziente.

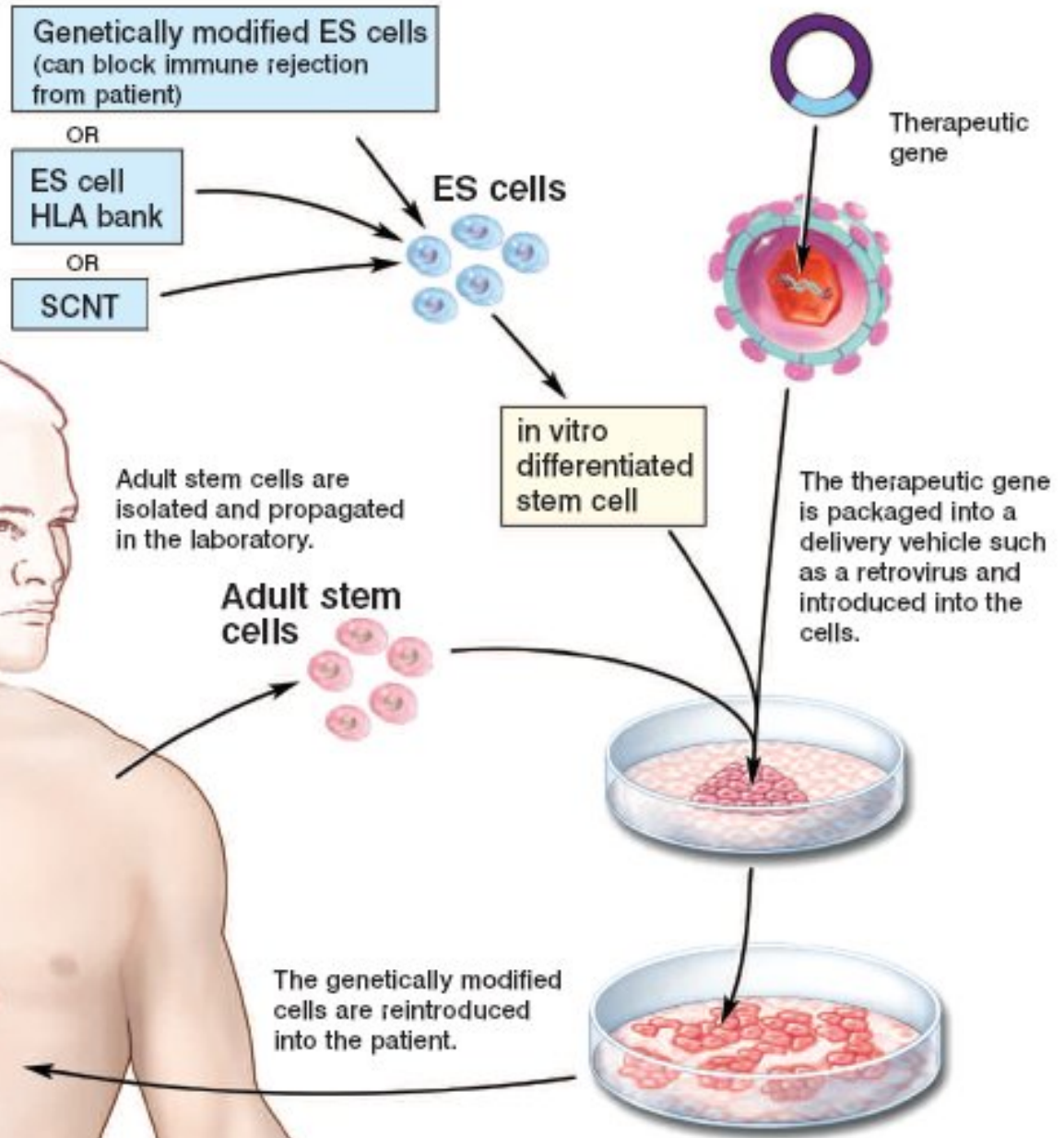
# 1

## Direct Delivery



# 2

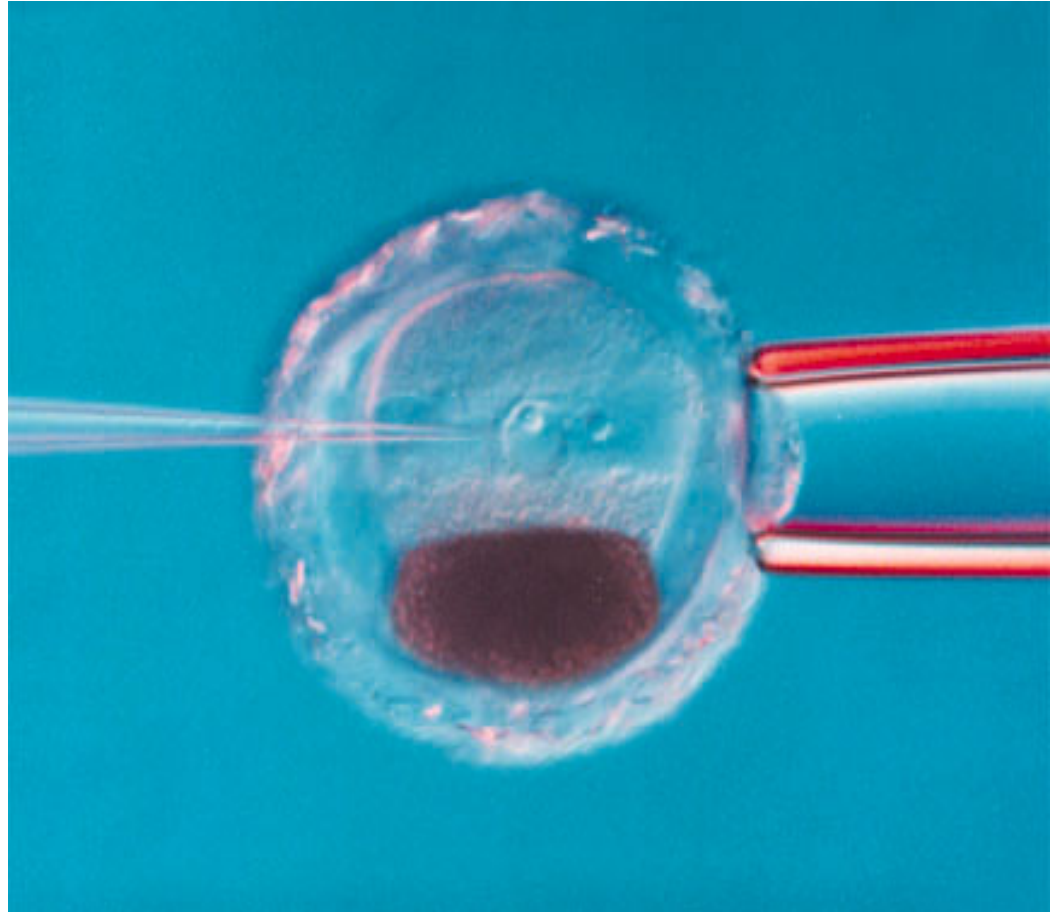
## Cell-based Delivery



# La Terapia genica *in vivo*

Viene attuata in tutti quei casi in cui le cellule *non* possono essere messe in coltura, o prelevate e reimpiantate, come quelle del **cervello** o del **cuore** e della maggior parte degli organi interni.

In questo caso il gene d'interesse viene **inserito** nell'organismo direttamente, tramite un opportuno vettore, per via *locale* o *sistemica*.



# La Terapia genica *ex vivo*

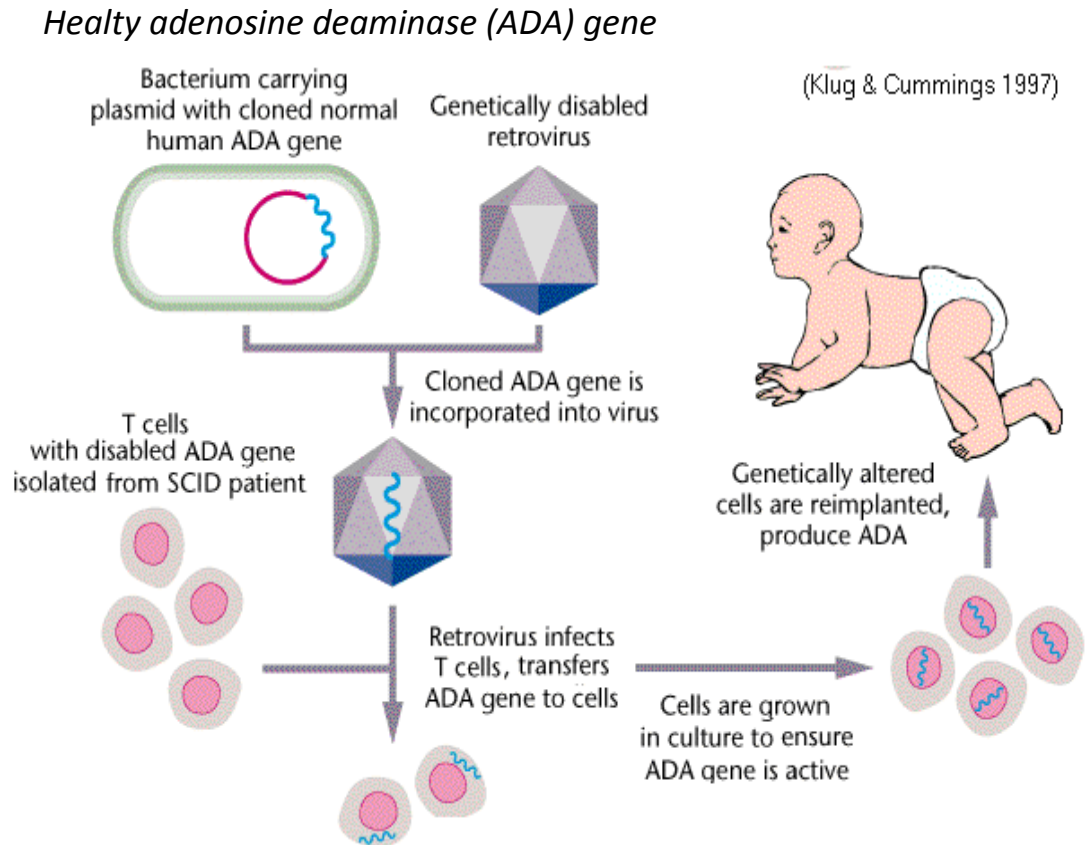
## Severe combined immunodeficiency treatment

Consiste nel **prelievo** delle cellule somatiche dall'individuo che successivamente, vengono messe in coltura.

Le cellule vengono poi **transfettate** con il gene d'interesse, clonato all'interno di un apposito vettore (spesso virale), e successivamente vengono re-infuse o **re-impiantate** nel corpo del soggetto.

Tale procedura è sicuramente la più lunga e la più costosa delle due ma permette di selezionare ed amplificare le cellule d'interesse ed inoltre gode d'una maggior efficienza.

E' la modalità *più utilizzata* ma è riservata solamente a quei casi in cui sia possibile prelevare, mettere le cellule in coltura e reinserirle nell'organismo...



# Strategie terapeutiche

Esistono essenzialmente due approcci in terapia genica:

## 1) Terapia genica *indiretta*

- consiste nel controllo della crescita tumorale e della morte cellulare mediante **inserimento** di sequenze geniche che agiscono come *intermedi*.

Esempi:

- Stimolazione delle risposte immunitarie
- Alterazioni della angiogenesi tumorale
- Inserimento di enzimi per la trasformazione di "pro-drug"

## 2) Terapia genica *diretta*

- consiste nell'**alterazione** diretta della sequenza di DNA responsabile della trasformazione maligna o del suo mantenimento.

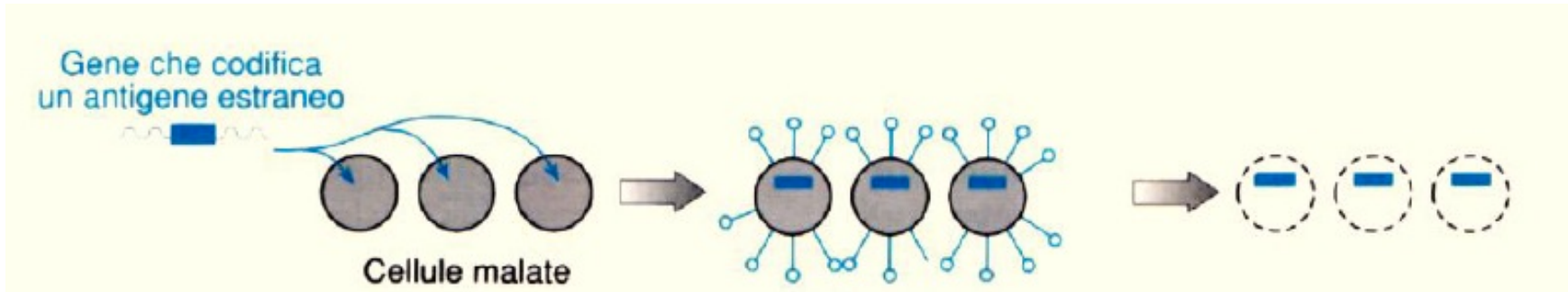
Esempi:

- ablazione di oncogeni
- aggiunta di geni oncosoppressori (perchè assenti o mutati)

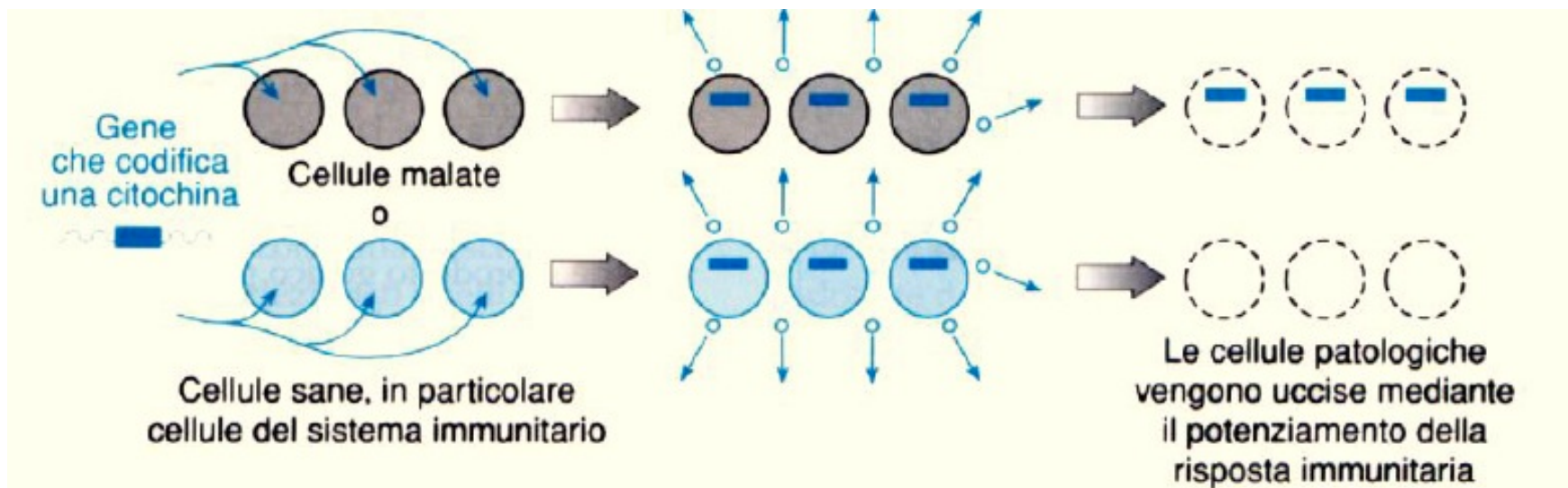
## 1) INDIRETTA: uccisione di cellule patologiche mediata dal sistema immunitario

**Es:1** Introduzione di un gene che codifica un antigene estraneo in cellule malate per farlo esprimere sulla loro membrana. Le cellule malate vengono così uccise tramite la risposta immunitaria.

*Nella terapia genica dei tumori, si sfrutta l'attività di geni che codificano fattori che attivano le cellule del sistema immunitario, con lo scopo di aumentare la loro attività vs le cellule tumorali.*



I geni inseriti possono anche codificare fattori di crescita o citochine che vengono secreti dalla cellula, esercitando vari effetti su altre cellule vicine o distanti, o agendo nell'ambiente extracellulare.

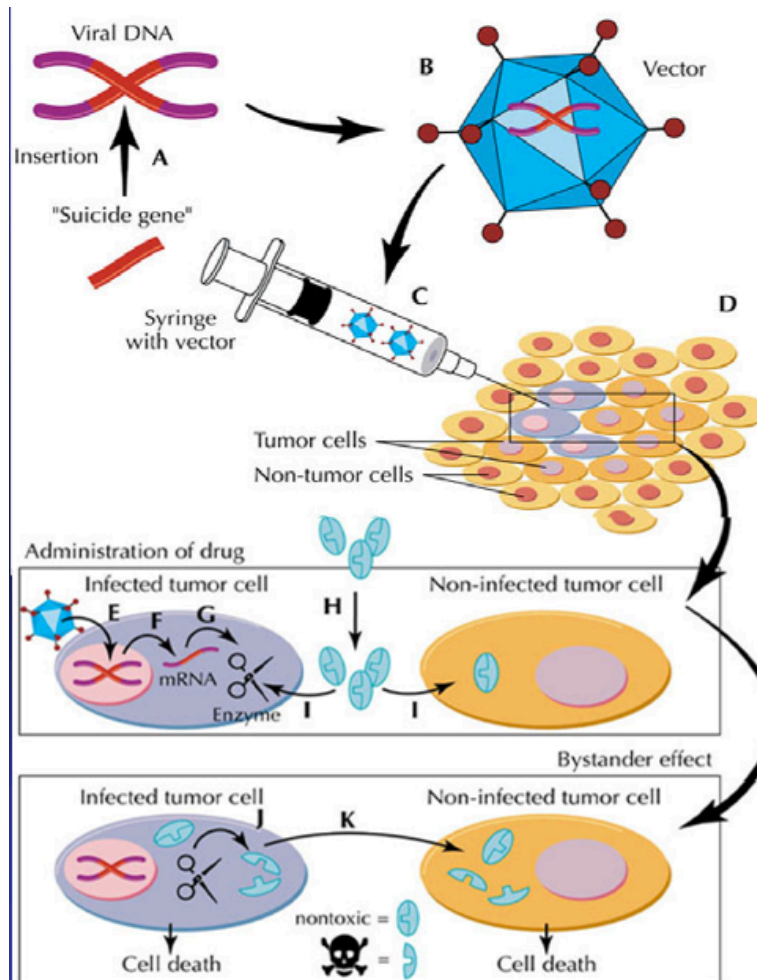




# 1) INDIRETTA: uccisione di cellule patologiche mediata dal sistema immunitario (Terapia suicida)

**Es:2** Introduzione di gene che codifica una tossina, che una volta espresso in cellule malate provoca la loro morte

*Uso di un gene che codifica un pro-farmaco, una molecola biologicamente inattiva che, una volta introdotta nelle cellule, subisce delle trasformazioni chimiche (ad opera di enzimi) che "maturano" il farmaco attivo contro le cellule malate.*



Introduzione in cellule bersaglio di un gene che codifica per un enzima (es. HSV-TK metabolizzante un farmaco (DME)

Successivo trattamento con un pro-farmaco non tossico (es. Gangiclovir) che viene convertito selettivamente nella forma tossica (Gangiclovir-P) dal DME



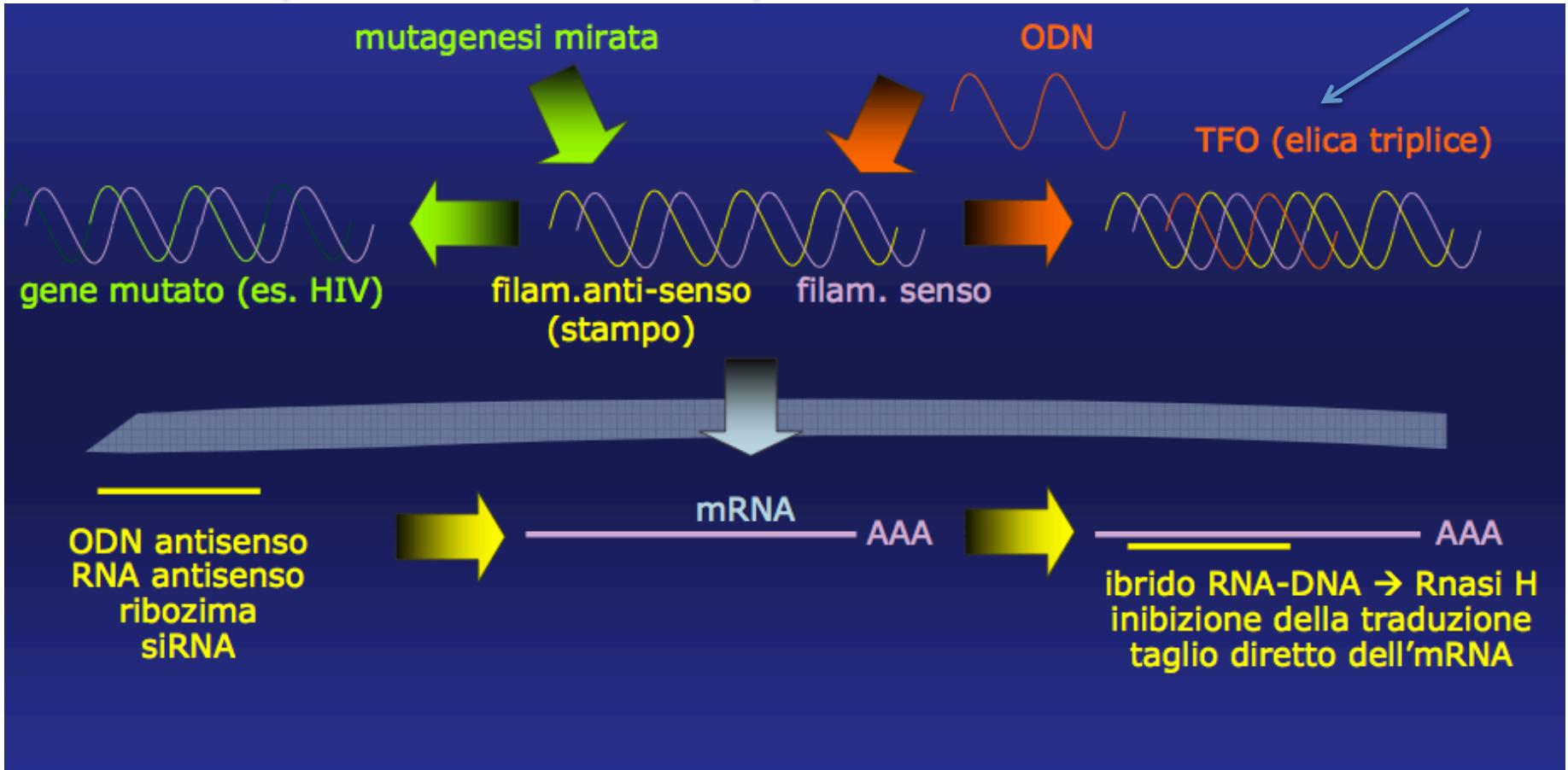
**1) INDIRETTA: Inibizione mirata dell'espressione genica**

**Es:3** Strategia utile per le patologie causate dalla presenza di mutazioni ad effetto dominante o dominante negativo

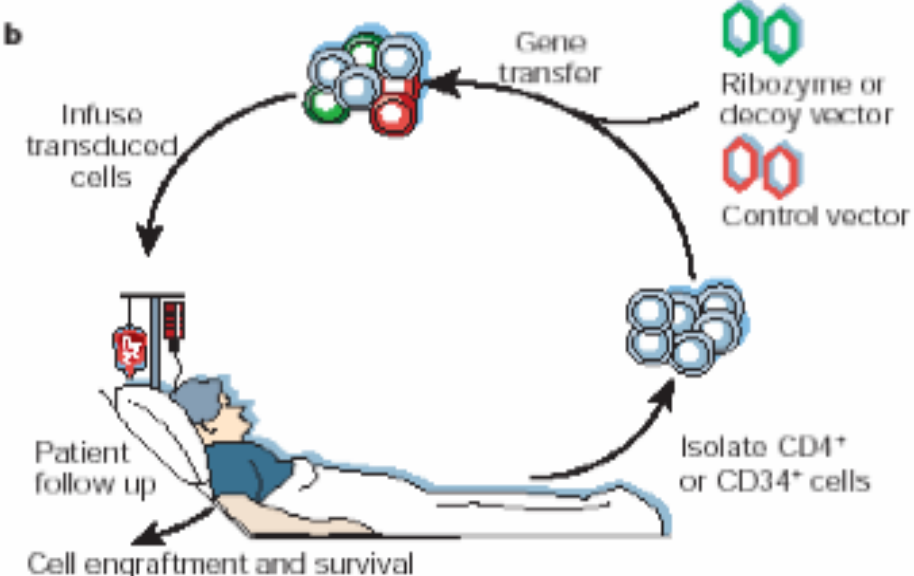
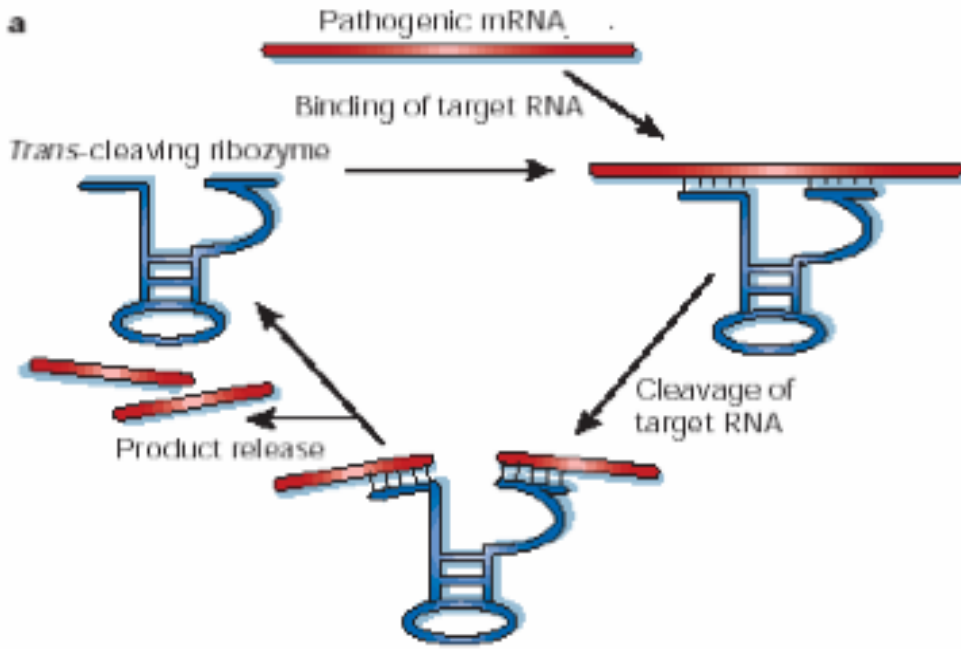
*Oligonucleotidi anti-senso, antisense oligonucleotides (ODN) o triplex forming oligonucleotides (TFO) o ribozyme vectors vengono introdotti in cellule malate contenenti gene mutante per bloccarne l'espressione*

**Post-transcriptional inhibition!**

**Transcriptional inhibition!**



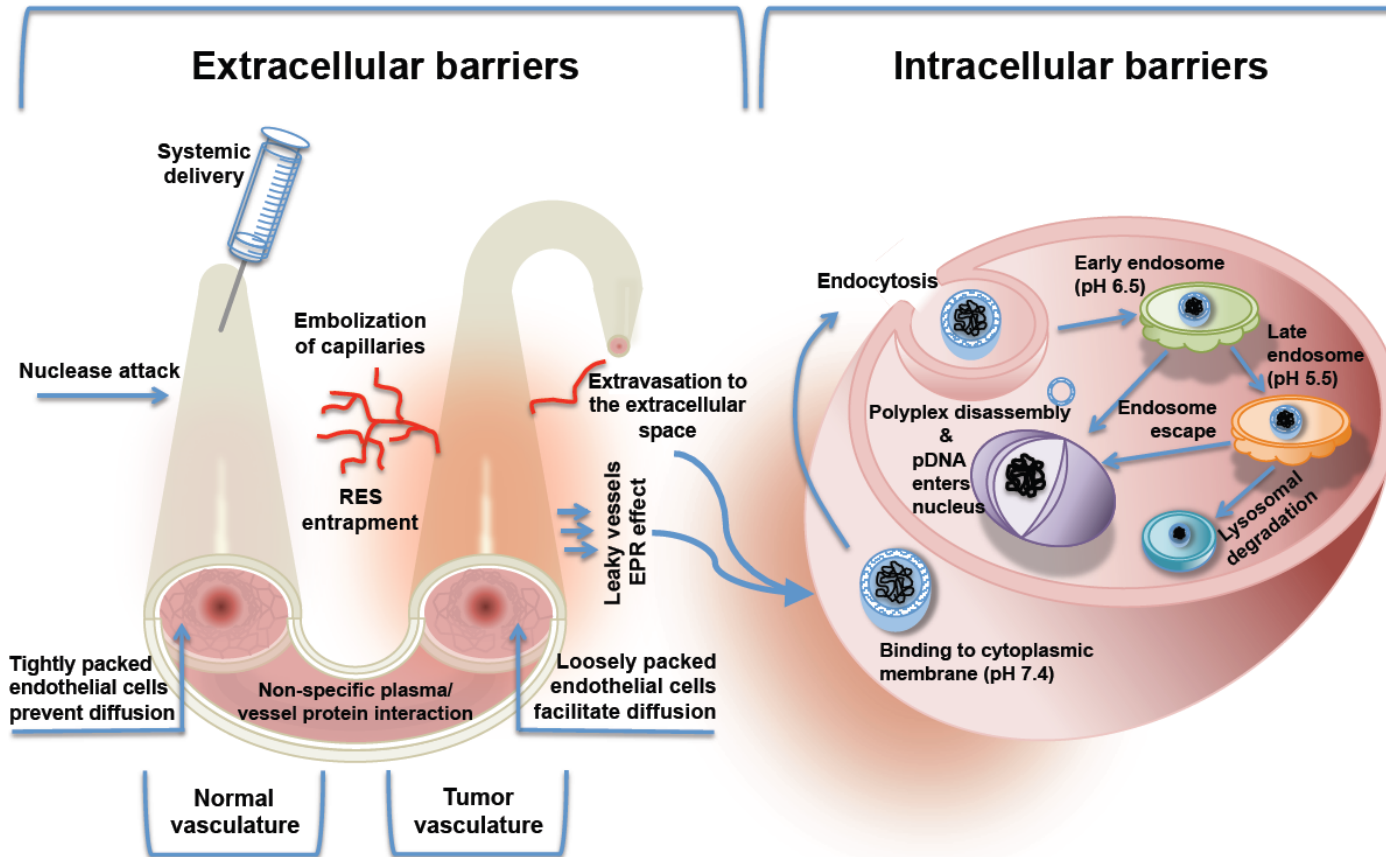
Es4: Ribozyme strategy



# Gene Delivery



Come *veicolare* il DNA esogeno all'interno delle cellule



Costituiscono un impedimento al passaggio dal punto d'ingresso alla cellula bersaglio

- barriera ematoencefalica
- il sistema immunitario
- fluidi corporei

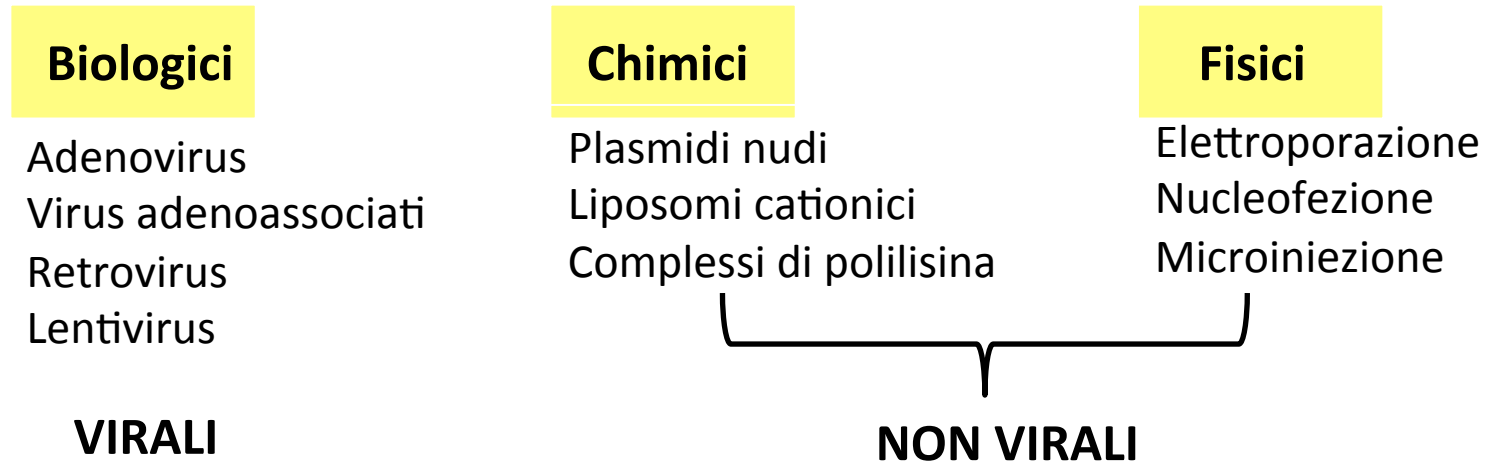
Costituiscono un impedimento al trasferimento all'interno della cellula

- membrane citoplasmatiche e nucleari
- lisosomi
- endonucleasi

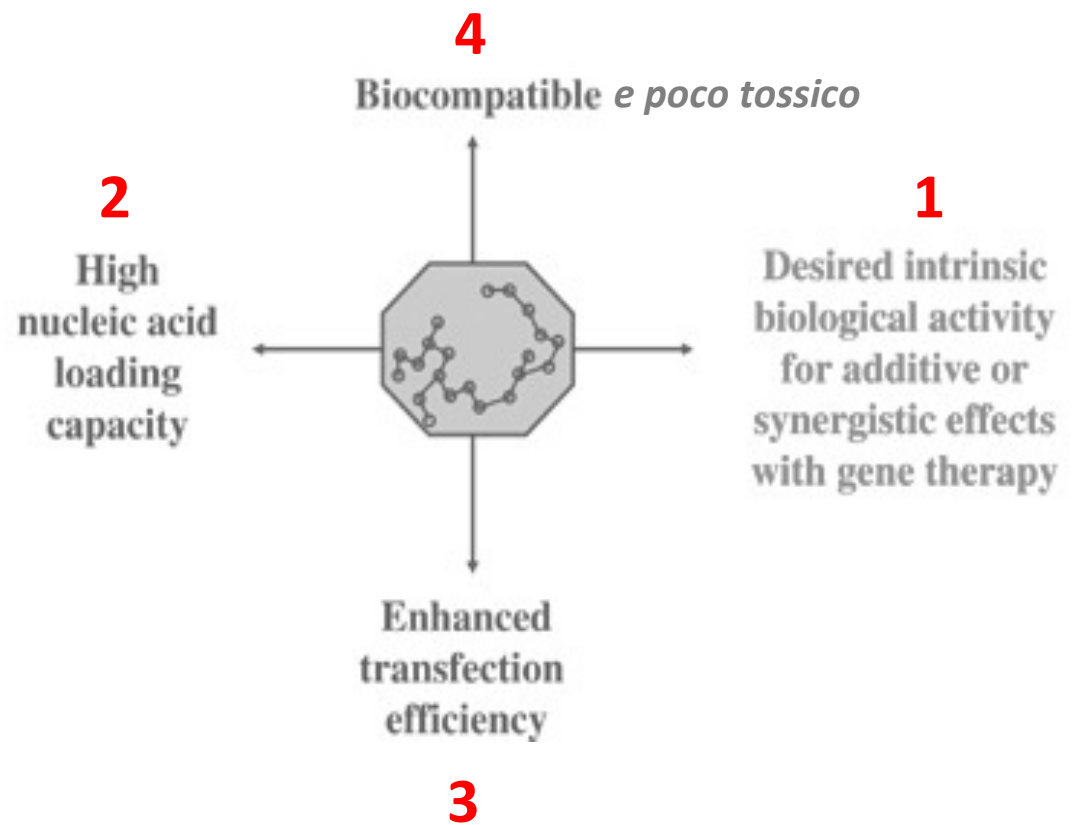
# Gene Delivery

Come *veicolare* il DNA esogeno all'interno delle cellule ?

E' necessario che il DNA raggiunga solo quelle cellule che richiedono un intervento terapeutico. L'introduzione e l'espressione di un gene all'interno della cellula ospite avviene per mezzo di **VETTORI** (*virali o non virali*)



## VEETTORE IDEALE:



E poi...

- **Tropismo di espressione:** opportuna localizzazione del transgene sia a livello *trasduzionale* (il vettore infetta cellule specifiche) che a livello trascrizionale (il gene viene espresso solo in alcune cellule).
- **Livello di espressione:** possibilmente regolabile.
- **Efficacia clinica:** test funzionali su modelli animali.
- **Durata della trasduzione:** per far sì che la terapia duri nel tempo

# Durata della Trasduzione

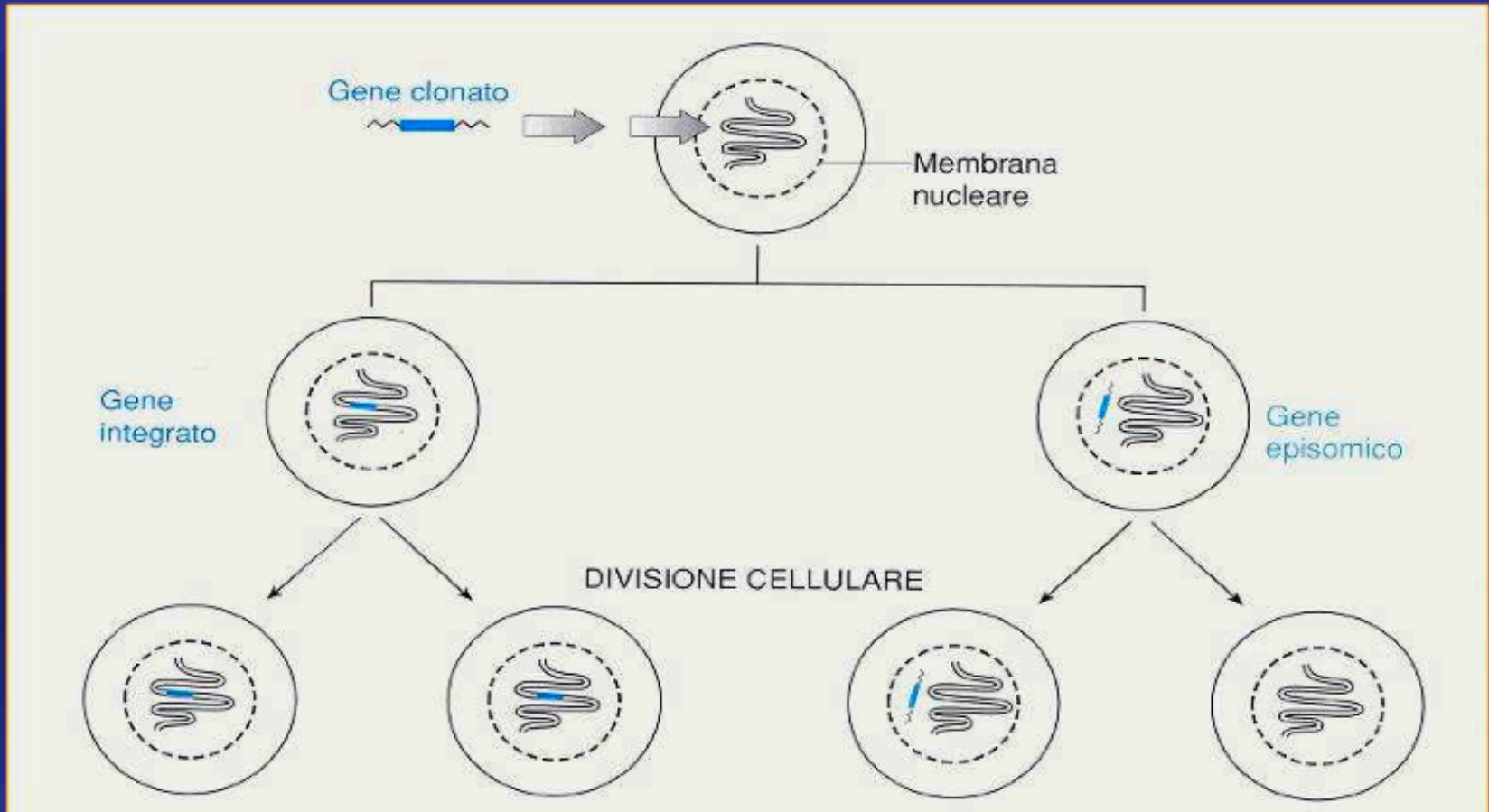
La trasduzione puo' essere: *stabile* o *transiente*

1. Espressioni *stabili* sono preferibili per malattie metaboliche. Richiede che il gene sia integrato nel genoma della cellula ospite
2. Espressioni *transienti* sono preferibili per vaccini e tumori

**strumento utile per valutare l'avvenuta trasduzione  
è il GENE REPORTER:**

- codifica per una proteina che non ha analoghi funzionali nella cellula trasfettata
- è rivelato con sistemi semplici e sensibili
- non deve interferire con il normale metabolismo cellulare

# Durata della Trasduzione

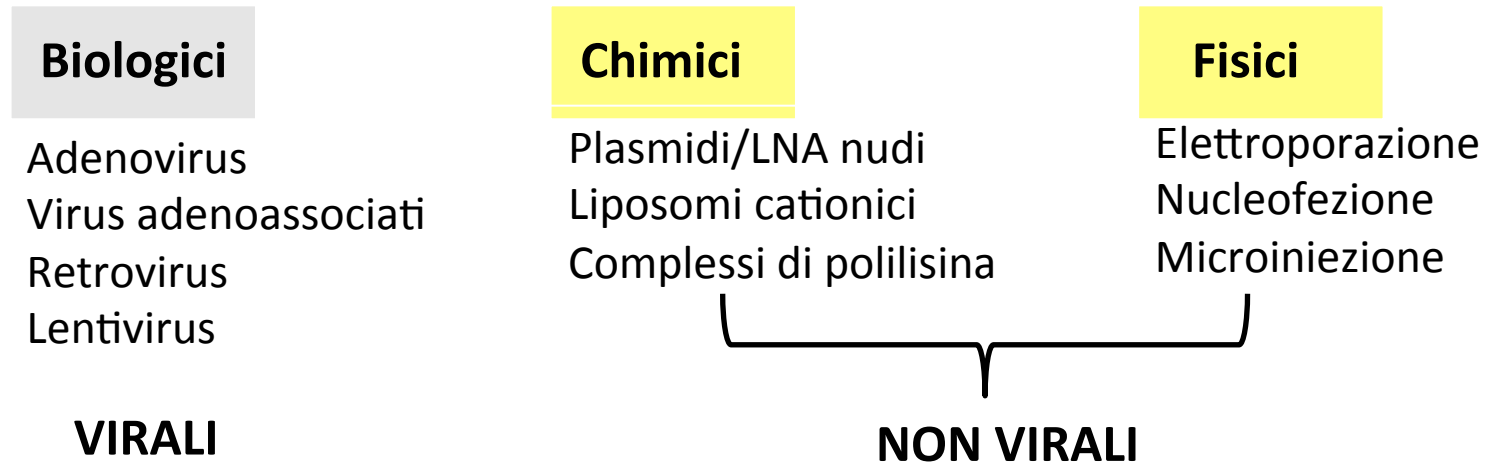


integrazione del transgene nel genoma ospita → espressione stabile

il transgene non si integra nel genoma → espressione temporanea



# Gene Delivery: metodi fisico-chimici



## vantaggi:

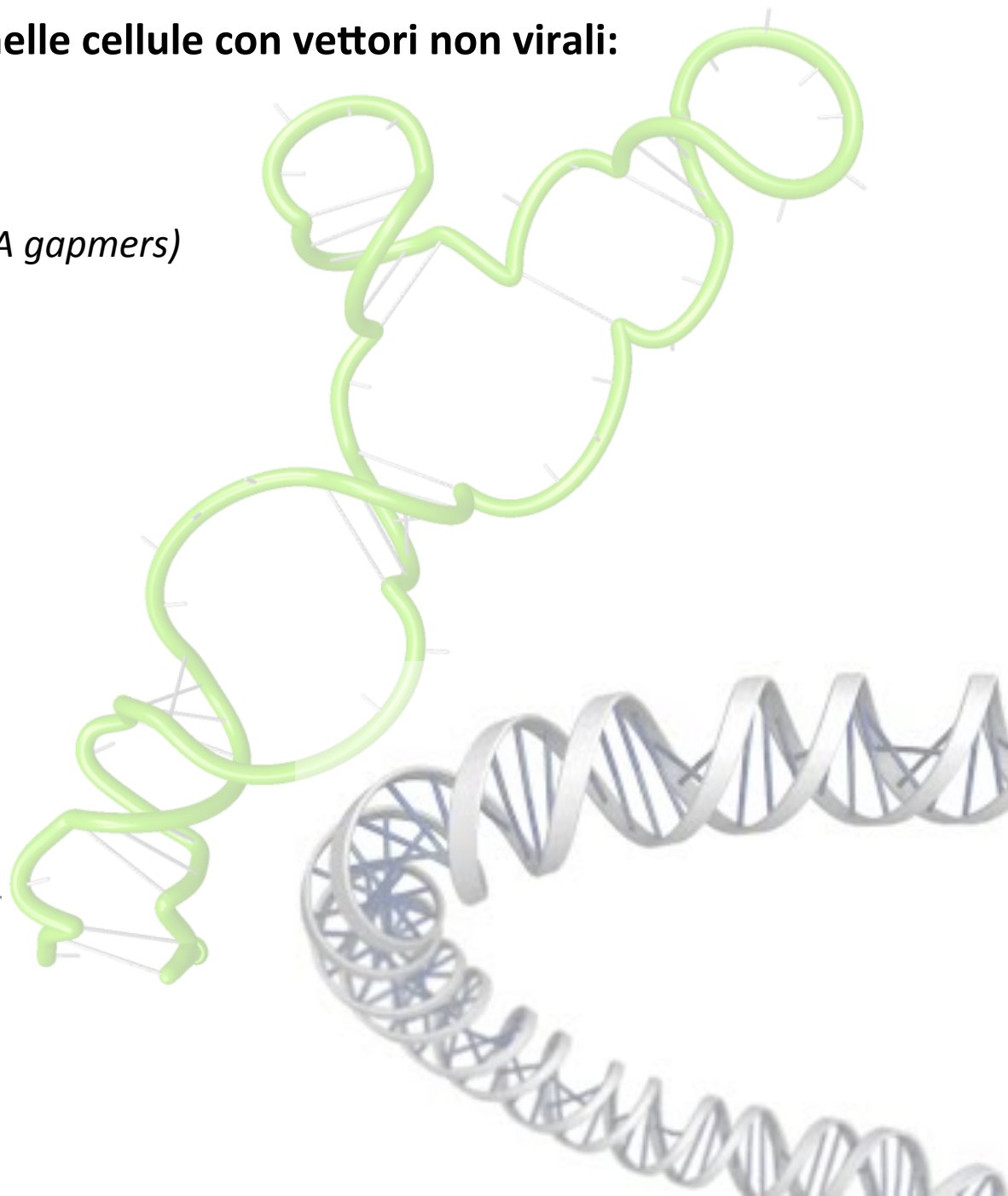
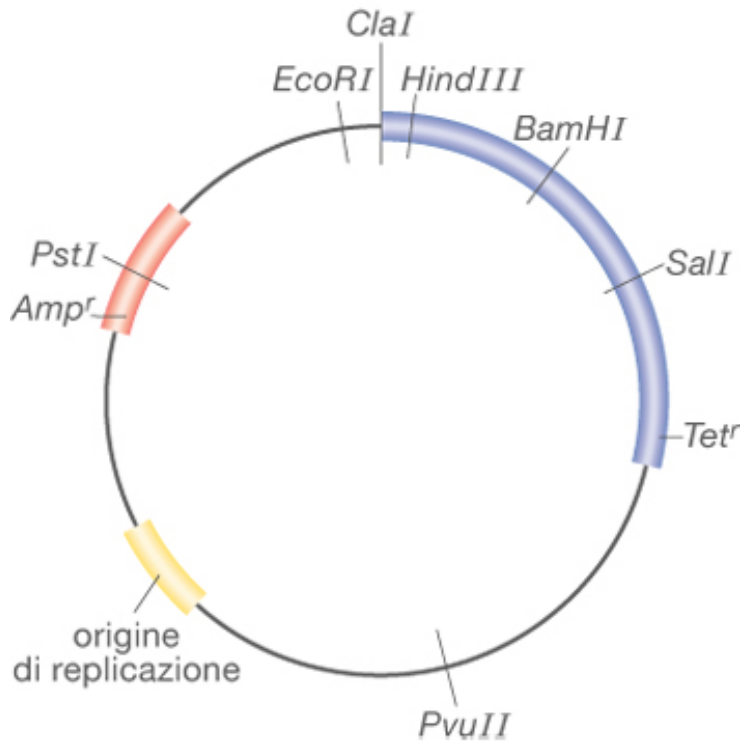
- Impossibile la generazione di nuovi virus patogeni
- Riduzione del rischio di reazione immunitaria
- Possibilità di trasferire tipi *diversi* di molecole e di trasdurre molecole di DNA molto grandi
- Possibilità di produzione in grandi quantità a basso costo

## svantaggi:

- *Scarsa efficienza* sia di trasduzione che di integrazione (effetti non duraturi)
- Se integrati possono a loro volta dare mutagenesi *inserzionale*

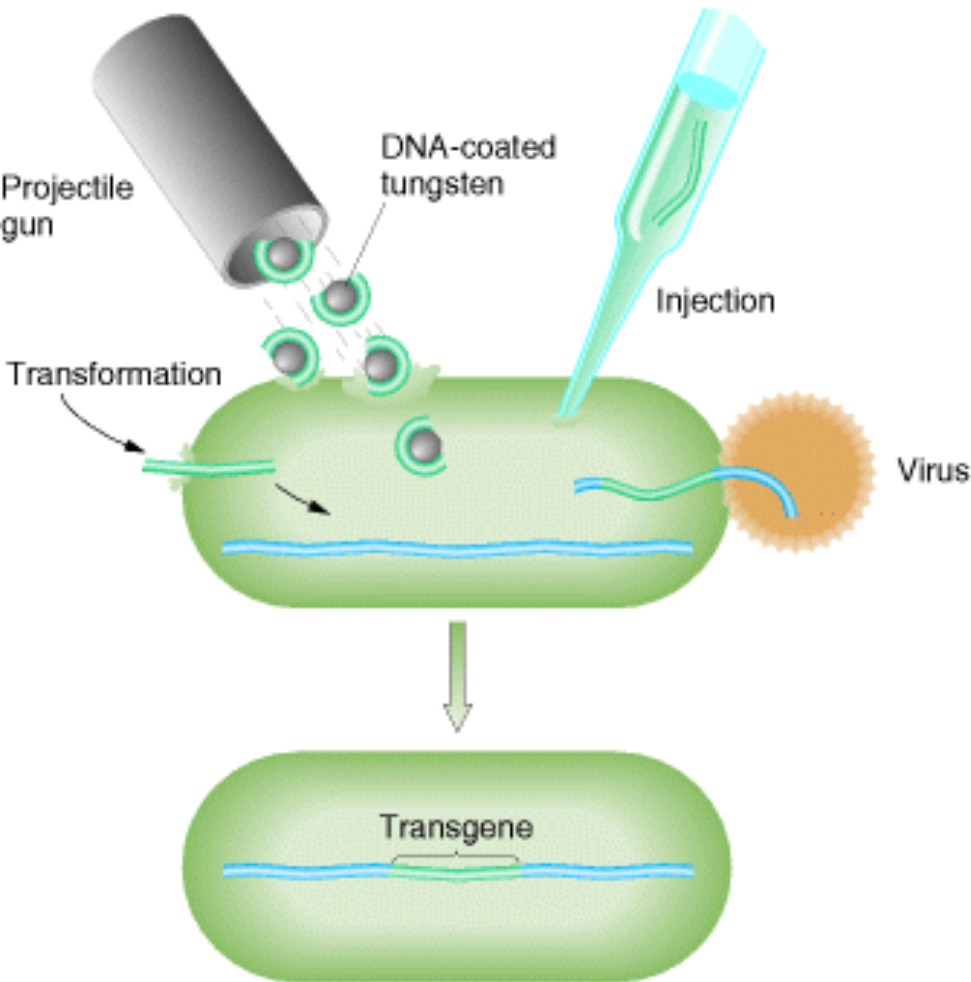
## Molecole che possono entrare nelle cellule con vettori non virali:

- *Plasmidi*
- *DNA lineare a doppio filamento*
- *Oligonucleotidi DNA/RNA (es: LNA gapmers)*
- *Ribozimi*
- *Polipeptidi*



# Gene Delivery: metodi fisici

## Bombardamento con microparticelle

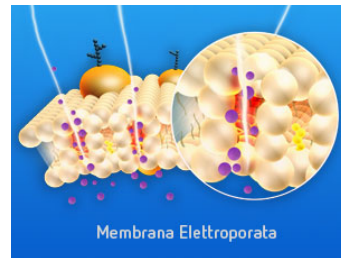
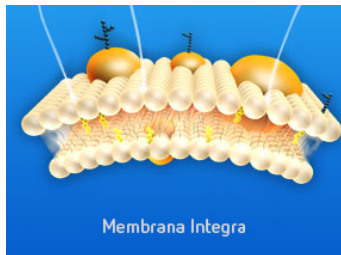
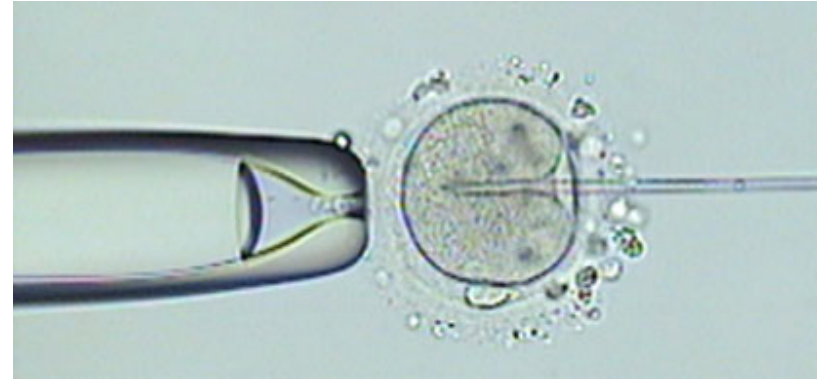


The Biolistic gene gun, developed by the Cornell group but recently acquired by Du Pont, accelerates particles in a manner similar to the way a standard gun propels a bullet. The device uses a small gunpowder charge and a macroscopic projectile about the size of a .22-caliber bullet to accelerate DNA-laden tungsten particles. The particles are located on the front, flat surface of the plastic cartridge. When the gunpowder explodes, the “bullet” carrying the particles travels down a smooth, six-inch barrel and hits a plastic stopping plate. On impact, the bullet fuses with the plate, but the small tungsten particles pass through to the target tissue via a hole in the center of the plate.

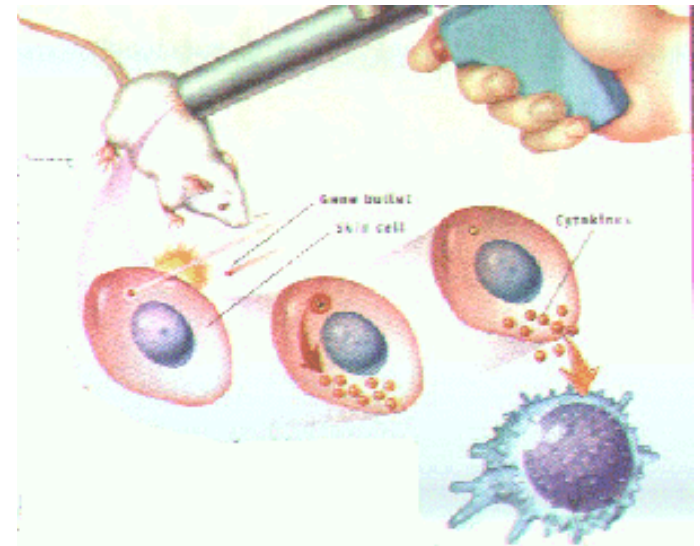
# Gene Delivery: metodi fisici

**Microiniezione:** consiste nell'iniezione di una miscela di DNA tramite una micro-pipetta di vetro sottile posta su un micro-manipolatore. La tecnica è attualmente impiegata per inserire DNA esogeno negli embrioni di animali (es. preparazione di topi transgenici).

- Il metodo è *laborioso* e *lento*, poichè si può iniettare materiale in una sola cellula alla volta. L'uso di microiniettori computerizzati ha ridotto questo inconveniente.
- Problema di *dimensioni*: alcuni tipi di cellule non sono sufficientemente grandi per essere micro-iniettate.



**Elettroporazione:** consiste nel sottoporre una cellula ad un campo elettrico in modo tale da *creare pori idrofili* nella membrana cellulare. La scarica è operata in un piccolissimo contenitore che racchiude cellule e molecole di DNA in una sospensione liquida.

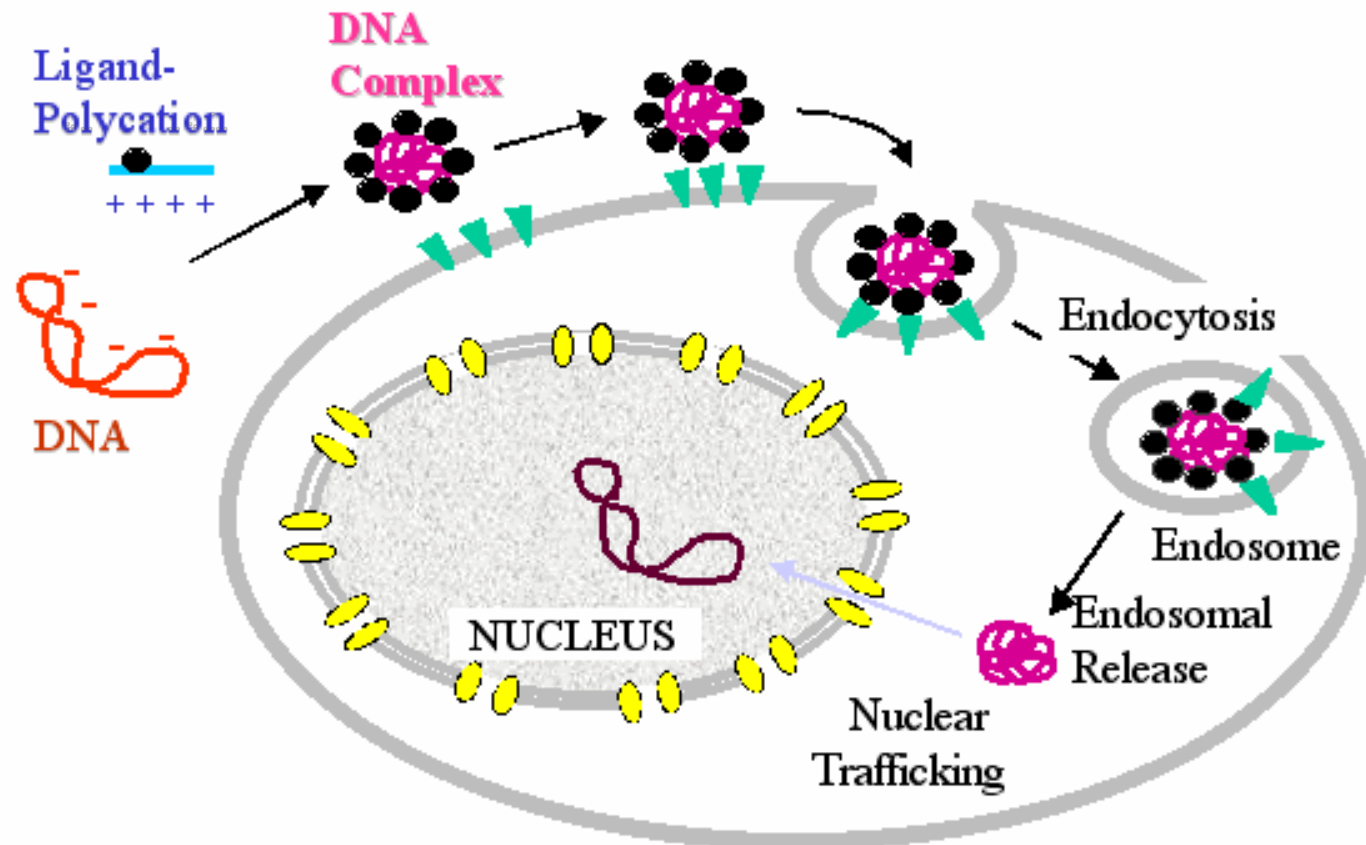


**Gene gun:** permette di inviare nella cellula particelle microscopiche d'oro o di tungsteno ricoperte di DNA

# Gene Delivery: metodi chimici

necessità:

1. *Impacchettamento* del DNA
2. *Ingresso* nelle cellule
3. *Rilascio* dalle vescicole lisosomiali
4. *Trasporto* nel nucleo
5. *Espressione* del gene



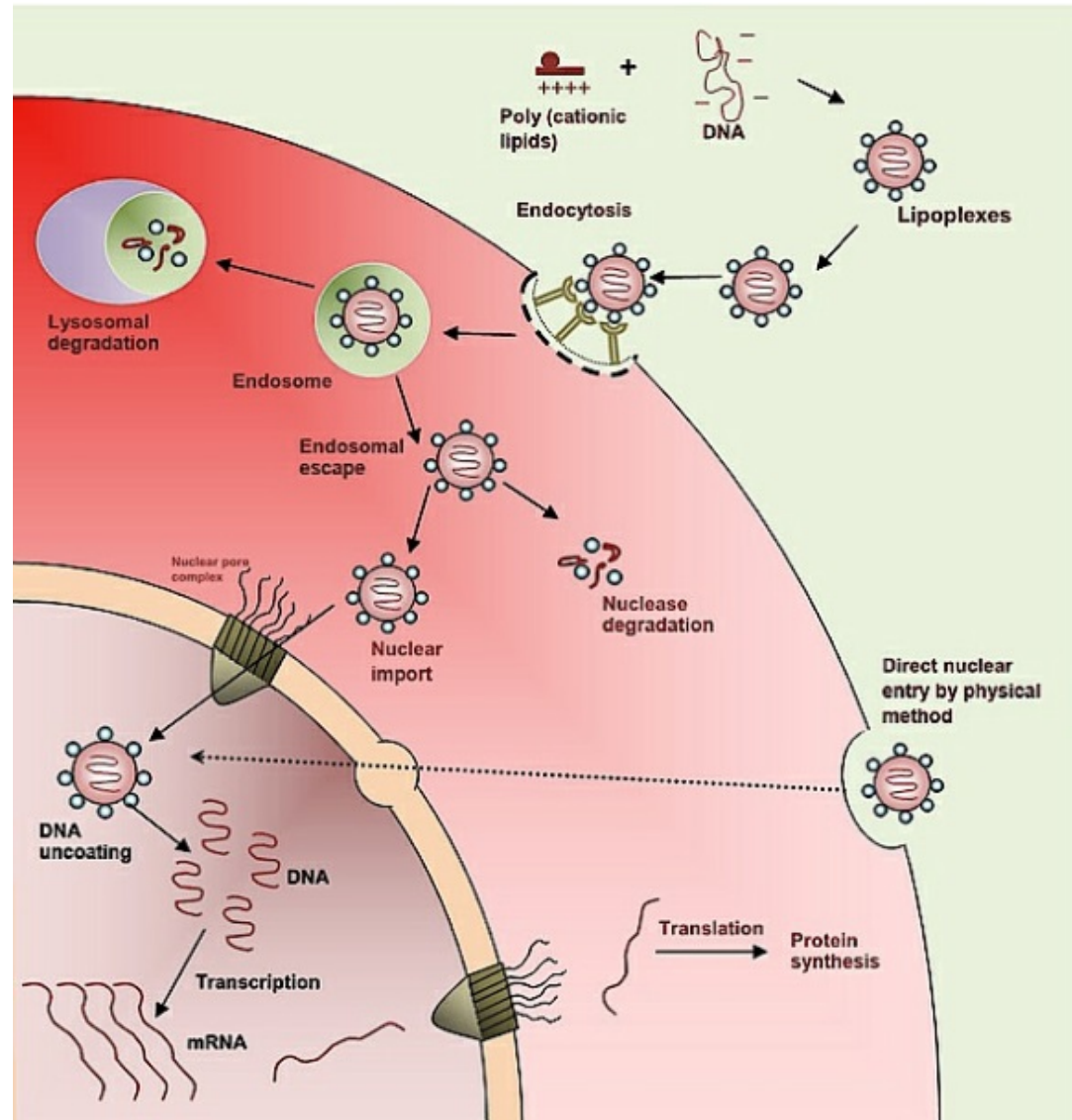
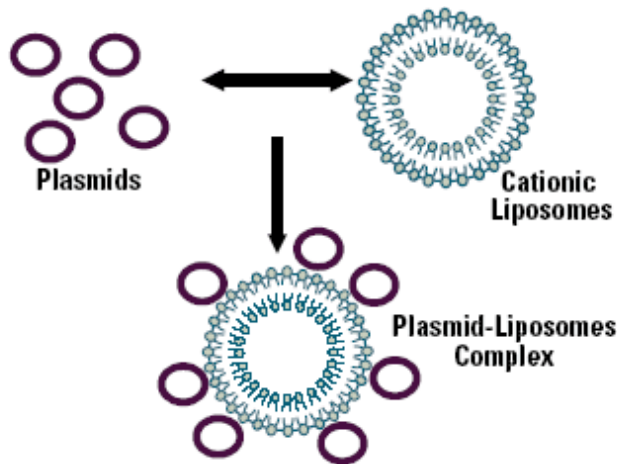


# Gene Delivery: metodi chimici

In base alla carica, i lipidi possono essere *anionici*, *cationici* o *neutri*.

Per i **cationici** l'acido nucleico si troverà sulla superficie, al contrario per gli **anionici** si troverà all'interno delle vescicole.

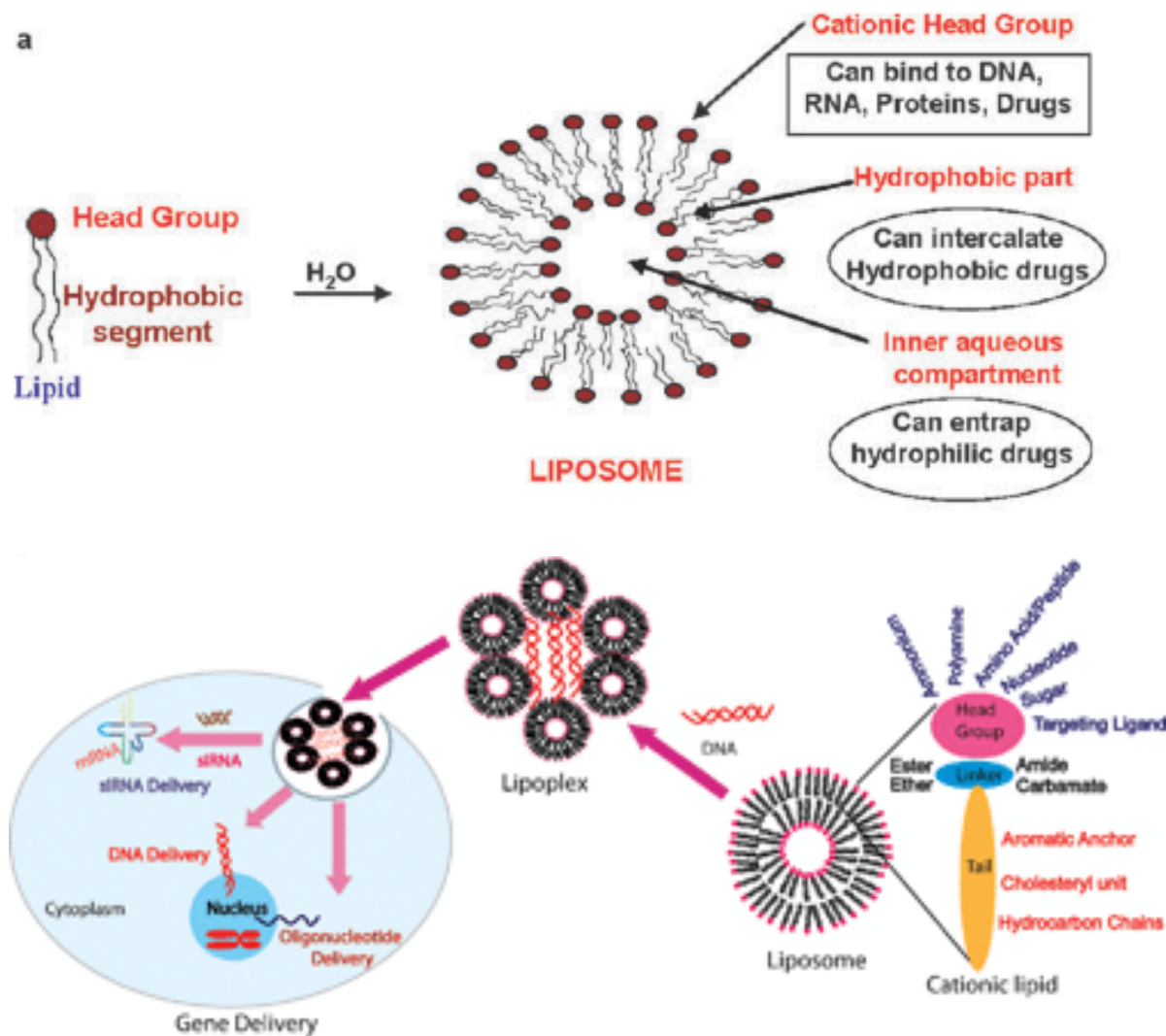
Il trasferimento del gene avviene attraverso meccanismo di fusione di membrane e rilasciato all'interno della cellula potrà raggiungere il nucleo



# Gene Delivery: metodi chimici

**Cationic lipids** offer positively charged interfaces for effective complexation with DNA (*lipoplex* formation) via electrostatic interactions.

At the same time, due to the membranous nature of the lipoplexes, they interact with negatively charged natural cell surfaces favourably and assist delivery of DNA inside the cells. The cationic liposomes also protect DNA from attack by the DNases.



Advances in gene delivery through molecular design of cationic lipids

Santanu Bhattacharya and Avinash Bajaja *Chem. Commun.*, 2009, 4632-4656



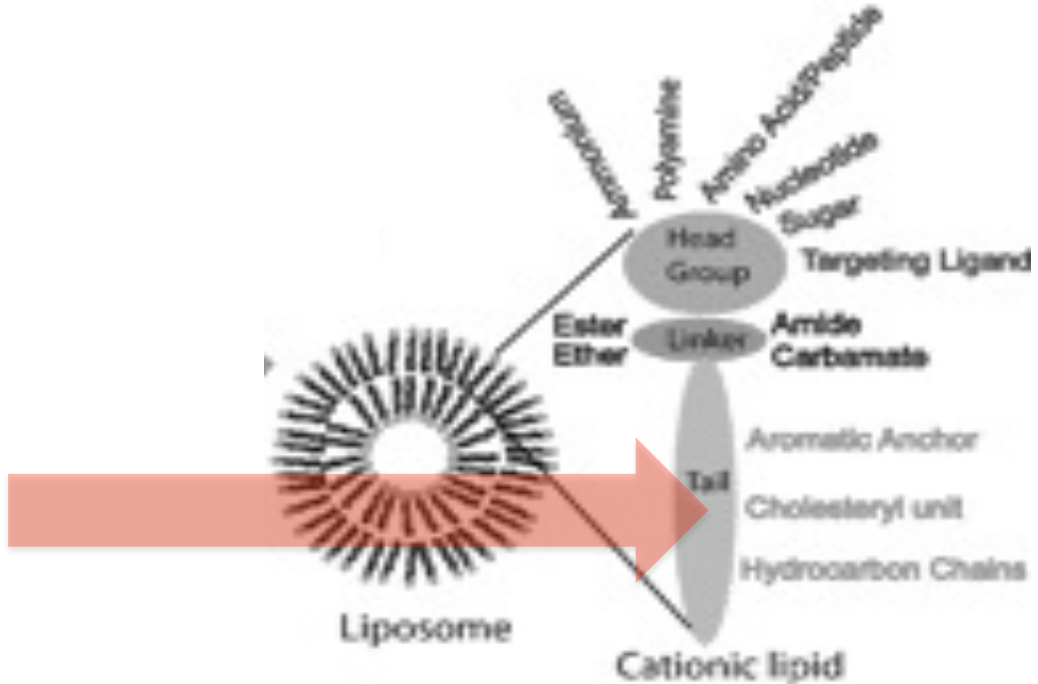
Various *parameters* affecting:

- liposomes *aggregation*
- liposomes *complexation* with DNA
- liposomes *application* toward gene delivery

have been optimized by different research groups to increase efficiency and make the liposomes more compatible in the blood stream.

However lipid architecture composition, lipid/DNA charge ratios, different cell types, ionic strength, and lipoplex structures need to be optimized for the successful application of gene delivery in clinical trials.

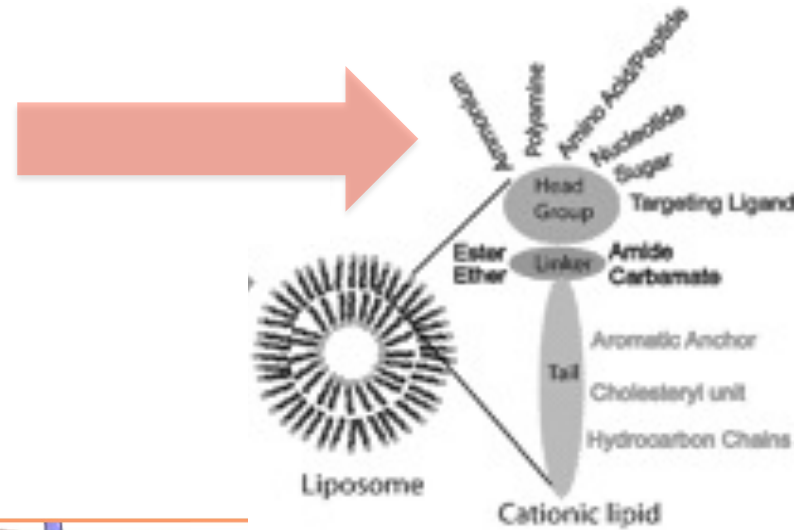
Various systematic *modifications* had been performed at the **hydrophobic parts**, linkage regions and the head groups to optimize the DNA delivery to various mammalian cells.



Lipid system <sup>b</sup>	Transfection efficiency in various cell lines <sup>a</sup>						
	COS	CHO	HepG2	HeLa	3T3	Serum effect	Toxicity range (%)
1c <sup>25</sup>	High						
1e <sup>25</sup>	High						
6e <sup>51</sup>	High	High	High				10
6f <sup>51</sup>	Low	Low	Low				10
6h <sup>53</sup>		High	High			Low	10–30
9d <sup>81</sup>	High			High	Average		
10a <sup>85</sup>				Average			20
12d <sup>96</sup>	Average	Average	Average				0
12l <sup>105</sup>			Average	Average			5
13c <sup>107</sup>			Average			Low	30
13f <sup>114</sup>				Average			20
14c <sup>120</sup>	Low	Low					20
14f <sup>124</sup>		High					0
15j <sup>140</sup>		Average					
15k <sup>140</sup>		Low					
18a <sup>172</sup>					High		
18d <sup>175</sup>			High	High		Low	0

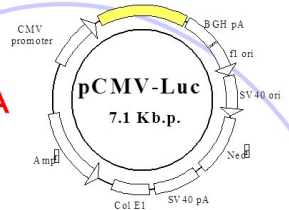
<sup>a</sup> Transfection efficiencies have been assigned “High”, “Average” and “Low” compared to the commercial transfection reagents as reported. <sup>b</sup> See the references for details.

systematic *modifications* (glycosilation) can be also performed at the **head groups** as for targeted drug delivery *via* specific cellular receptors

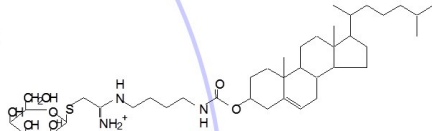
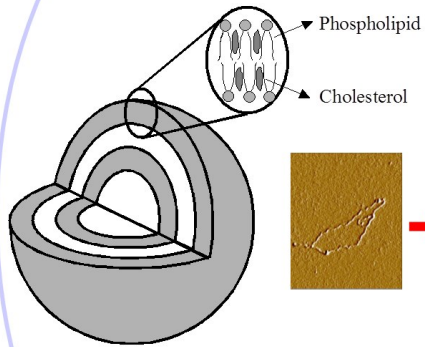


**Lipoplex**

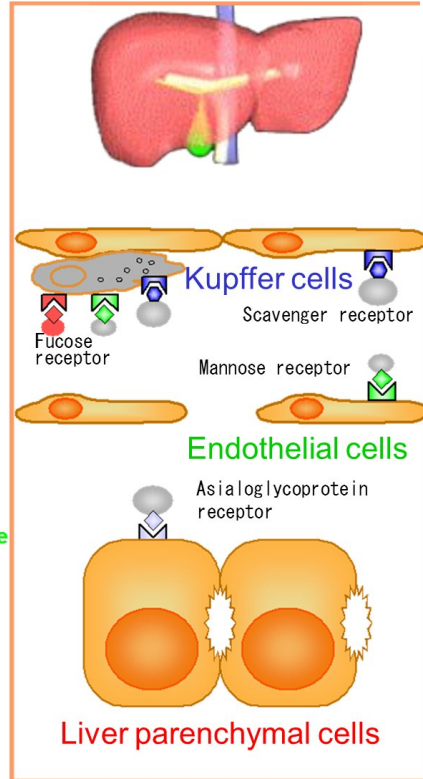
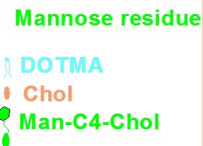
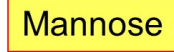
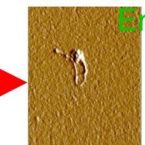
**Plasmid DNA**



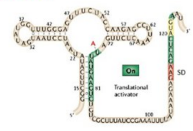
**Cell-specific Targeting Device (Recognition Moiety)**



**Endothelial cells**



**Oligonucleotide**



**Ubc13-siRNA**

5'-GUACGUUUC AUGACCAAAA-dTdT-3'  
3'-dTdT-CAUGC AAAAGUACUGGUUUU-5'

# Gene Delivery: metodi biologici

## Biologici

Adenovirus  
Virus adenoassociati  
Retrovirus  
Lentivirus

## VIRALI

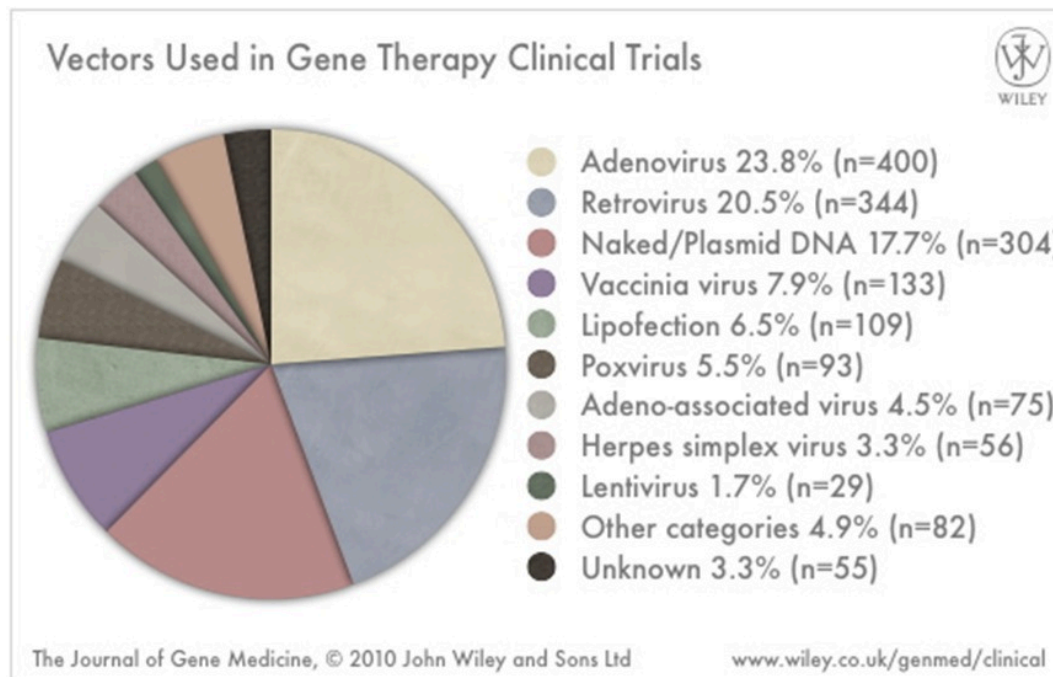
## Chimici

Plasmidi nudi  
Liposomi cationici  
Complessi di polilisina

## Fisici

Elettroporazione  
Nucleofezione  
Microiniezione

## NON VIRALI



# I vettori virali

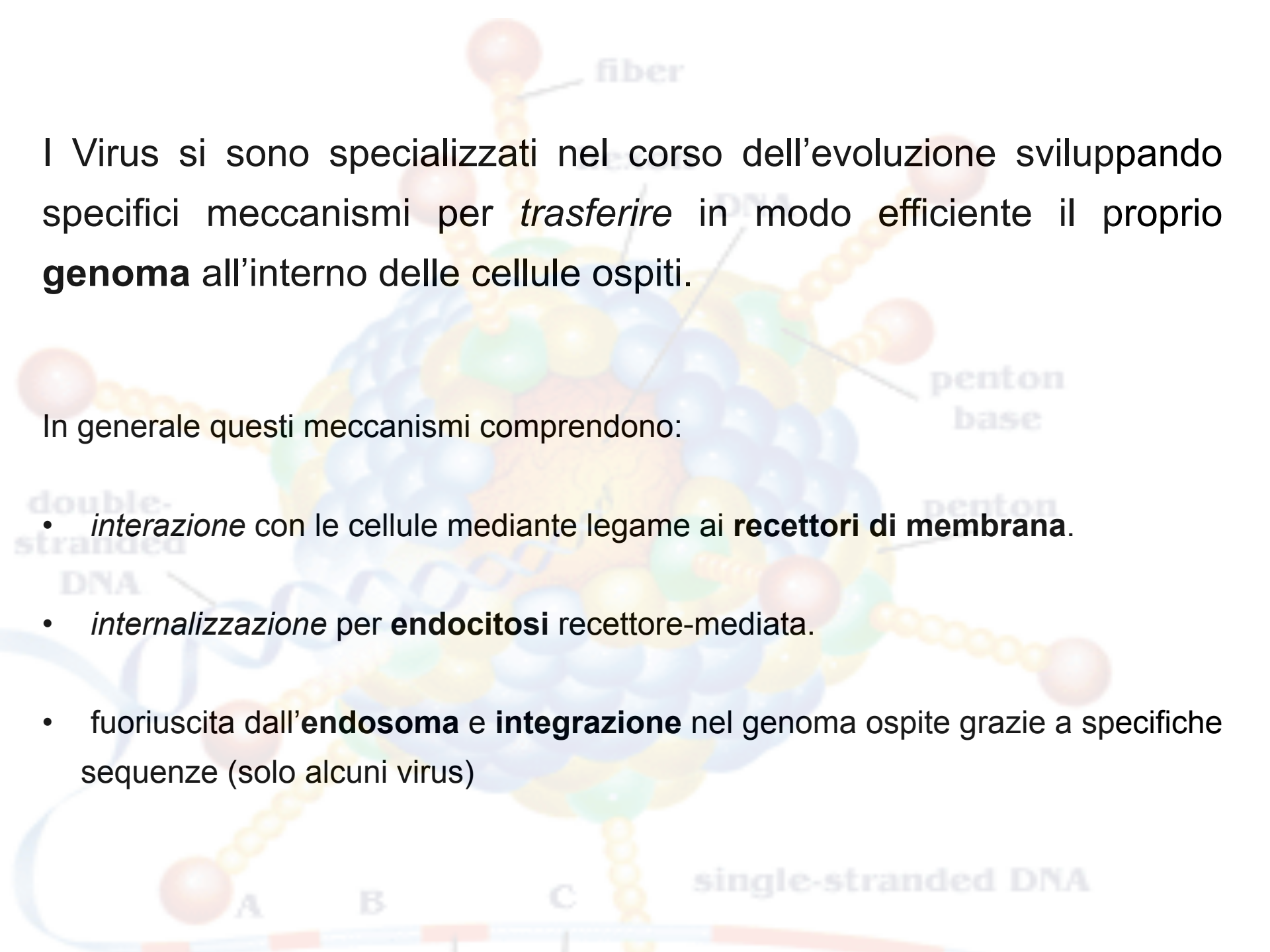
La semplice trasfezione potrebbe *non essere sufficiente* per trasferire materiale genetico nelle cellule. Alcuni tipi cellulari sono particolarmente *refrattari*, rendendo l'efficienza di trasfezione estremamente *bassa*. Per superare questo ostacolo si è pensato di sfruttare la proprietà dei virus di trasdurre il proprio materiale genetico all'interno della cellula (infezione), capacità resa efficientissima da milioni di anni di evoluzione.

## Che cos'è un virus?

È un *parassita* che necessita di un ospite cellulare per potersi replicare. I virus sono costituiti da:

- un **genoma** (doppio o singolo filamento di DNA o RNA)
- un **capside**, l'involucro che contiene il genoma e permette l'infezione della cellula ospite.





I Virus si sono specializzati nel corso dell'evoluzione sviluppando specifici meccanismi per *trasferire* in modo efficiente il proprio **genoma** all'interno delle cellule ospiti.

In generale questi meccanismi comprendono:

- *interazione* con le cellule mediante legame ai **recettori di membrana**.
- *internalizzazione* per **endocitosi** recettore-mediata.
- fuoriuscita dall'**endosoma** e **integrazione** nel genoma ospite grazie a specifiche sequenze (solo alcuni virus)



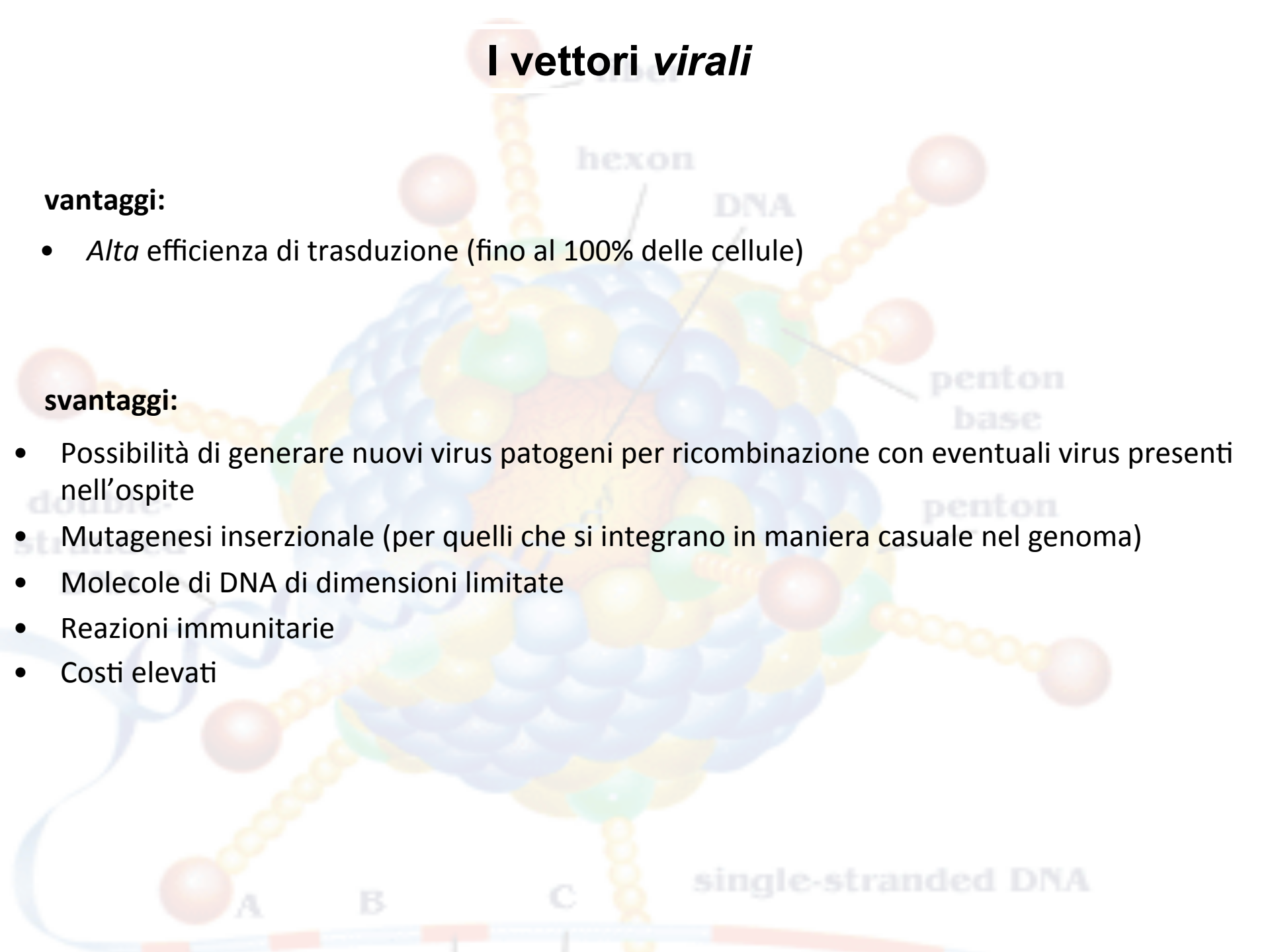
# I vettori *virali*

## **vantaggi:**

- *Alta* efficienza di trasduzione (fino al 100% delle cellule)

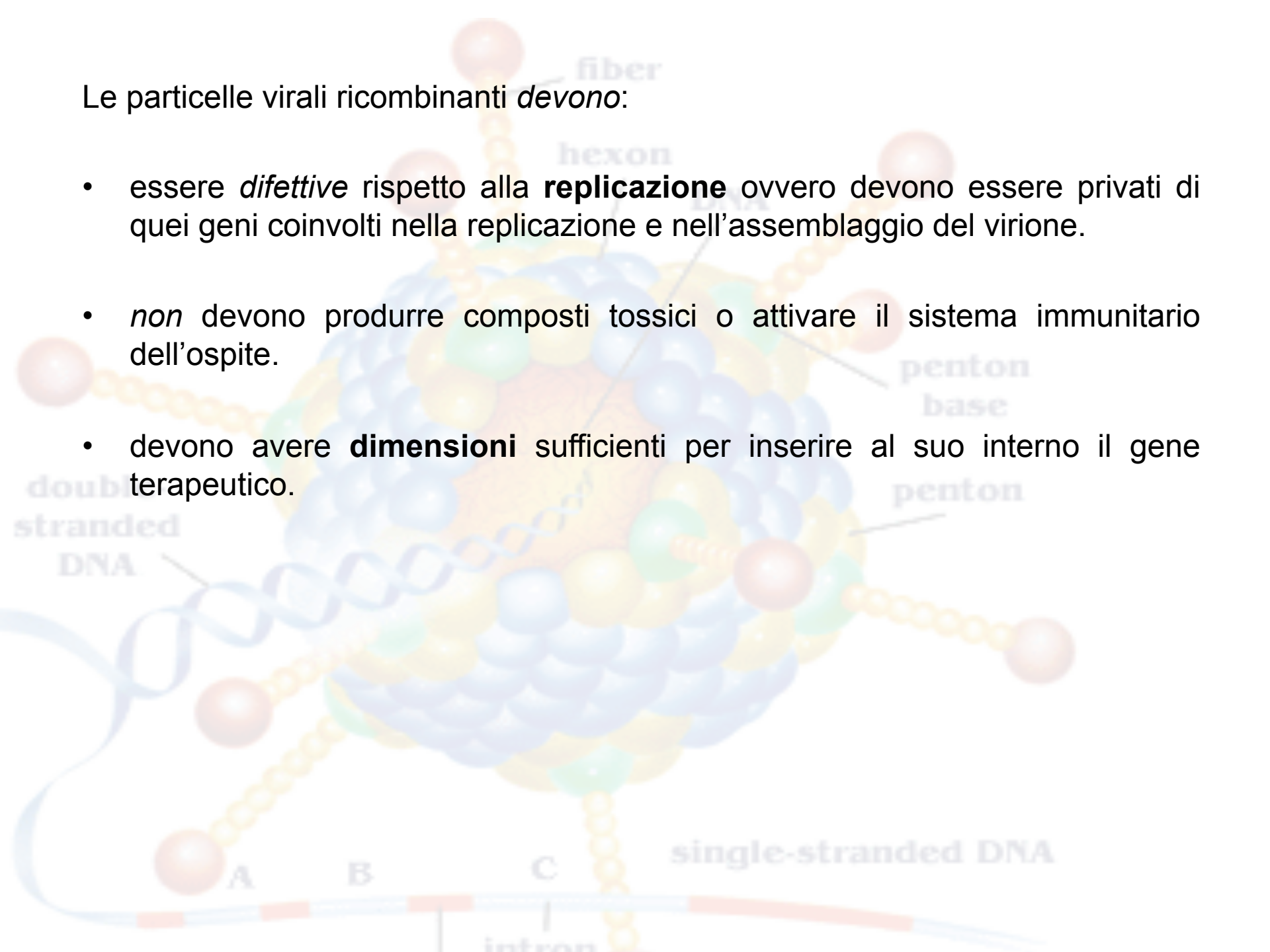
## **svantaggi:**

- Possibilità di generare nuovi virus patogeni per ricombinazione con eventuali virus presenti nell'ospite
- Mutagenesi inserzionale (per quelli che si integrano in maniera casuale nel genoma)
- Molecole di DNA di dimensioni limitate
- Reazioni immunitarie
- Costi elevati



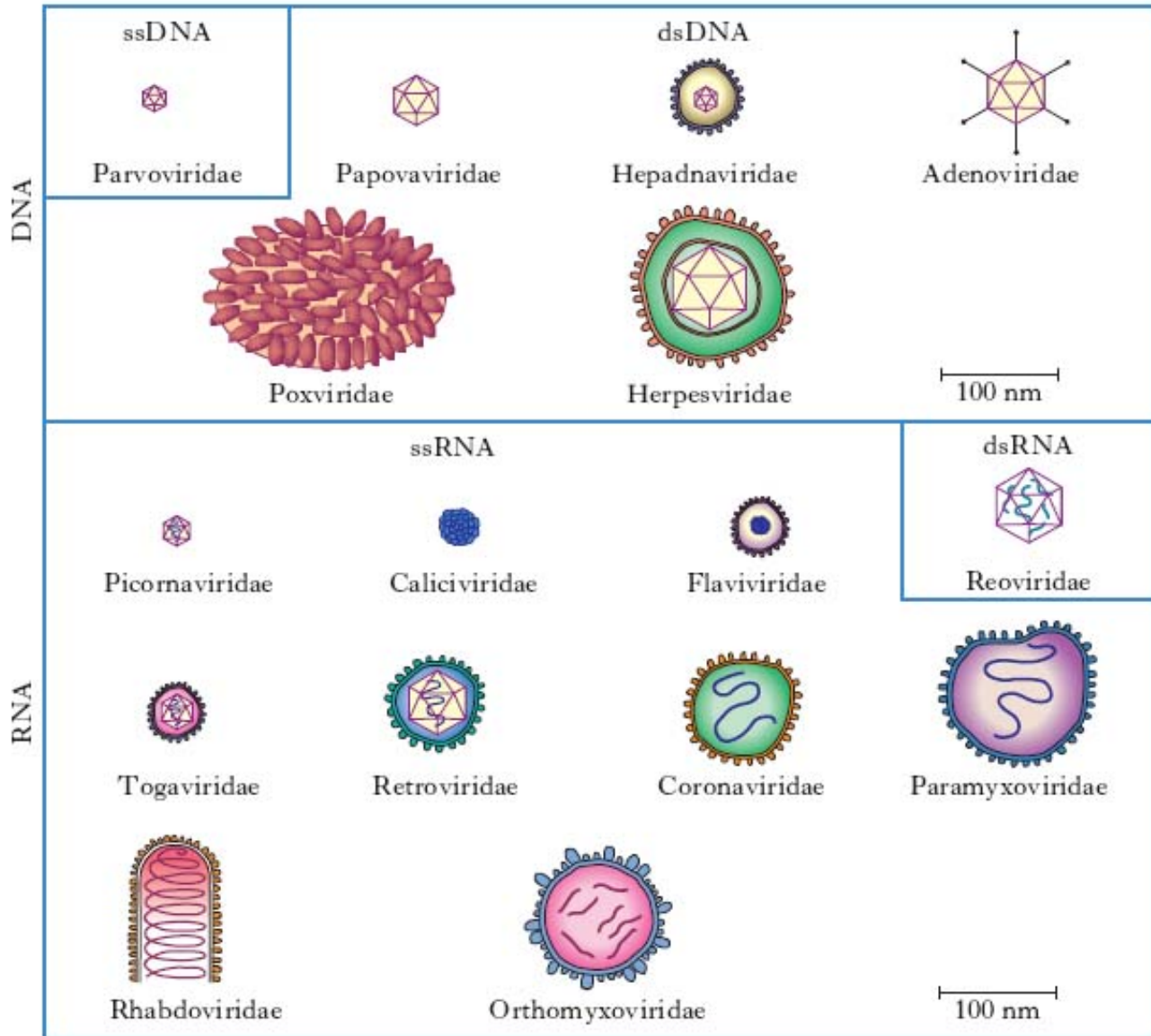
Le particelle virali ricombinanti *devono*:

- essere *difettive* rispetto alla **replicazione** ovvero devono essere privati di quei geni coinvolti nella replicazione e nell'assemblaggio del virione.
- *non* devono produrre composti tossici o attivare il sistema immunitario dell'ospite.
- devono avere **dimensioni** sufficienti per inserire al suo interno il gene terapeutico.





# Virus can be categorized in groups according to their genomes



There are at present **five** main classes of *clinically applicable* viral vector

Vector	Genetic material	Packaging capacity	Tropism	Inflammatory potential	Vector genome forms	Main limitations	Main advantages
<b>Enveloped</b>							
Retrovirus	RNA	8 kb	Dividing cells only	Low	Integrated	Only transduces dividing cells; integration might induce oncogenesis in some applications	Persistent gene transfer in dividing cells
Lentivirus	RNA	8 kb	Broad	Low	Integrated	Integration might induce oncogenesis in some applications	Persistent gene transfer in most tissues
HSV-1	dsDNA	40 kb* 150 kb <sup>†</sup>	Strong for neurons	High	Episomal	Inflammatory; transient transgene expression in cells other than neurons	Large packaging capacity; strong tropism for neurons
<b>Non-enveloped</b>							
AAV	ssDNA	<5 kb	Broad, with the possible exception of haematopoietic cells	Low	Episomal (>90%) Integrated (<10%)	Small packaging capacity	Non-inflammatory; non-pathogenic
Adenovirus	dsDNA	8 kb* 30 kb <sup>§</sup>	Broad	High	Episomal	Capsid mediates a potent inflammatory response	Extremely efficient transduction of most tissues

\*Replication defective. <sup>†</sup>Amplicon. <sup>§</sup>Helper dependent. AAV, adeno-associated viral vector; dsDNA, double-stranded DNA; HSV-1, herpes simplex virus-1; ssDNA, single-stranded DNA.

viral vector can be categorized in *two* groups according to whether their genomes:

Vector	Genetic material	Packaging capacity	Tropism	Inflammatory potential	Vector genome forms	Main limitations	Main advantages
<b>Enveloped</b>							
Retrovirus	RNA	8 kb	Dividing cells only	Low	Integrated	Only transduces dividing cells; integration might induce oncogenesis in some applications	Persistent gene transfer in dividing cells
Lentivirus	RNA	8 kb	Broad	Low	Integrated	Integration might induce oncogenesis in some applications	Persistent gene transfer in most tissues
<b>Non-enveloped</b>							
HSV-1	dsDNA	40 kb* 150 kb <sup>†</sup>	Strong for neurons	High	Episomal	Inflammatory; transient transgene expression in cells other than neurons	Large packaging capacity; strong tropism for neurons
AAV	ssDNA	~4.7 kb	possible exception of haematopoietic cells	Low	Integrated (<10%)	Small packaging capacity	Non-inflammatory; non-pathogenic
Adenovirus	dsDNA	8 kb* 30 kb <sup>§</sup>	Broad	High	Episomal	Capsid mediates a potent inflammatory response	Extremely efficient transduction of most tissues

**integrate** into host cellular chromatin

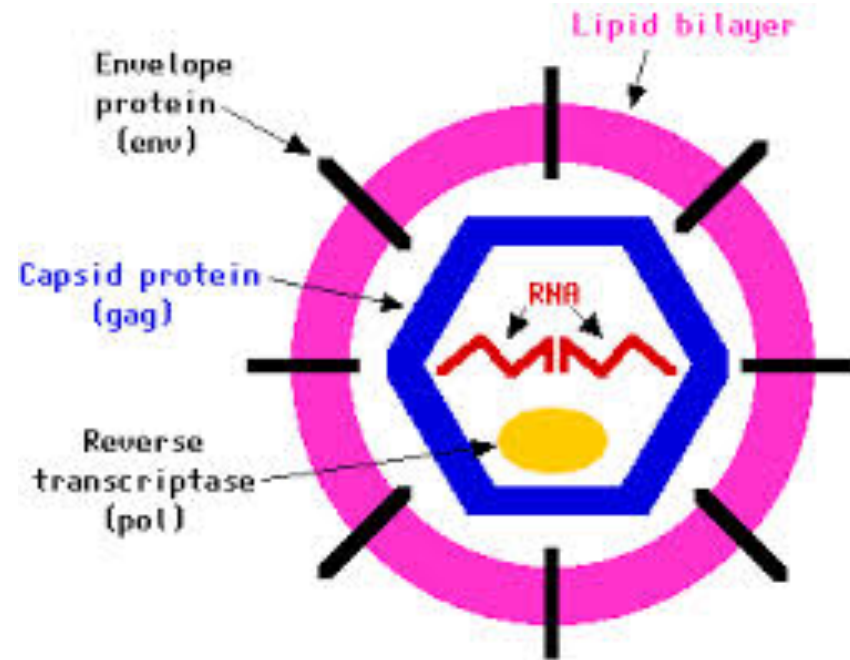
**persist** in the cell nucleus as extrachromosomal EPISOMES

\*Replication defective. <sup>†</sup>Amplicon. <sup>§</sup>Helper dependent. AAV, adeno-associated viral vector; dsDNA, double-stranded DNA; HSV-1, herpes simplex virus-1; ssDNA, single-stranded DNA.

This distinction is one important determinant of the suitability of each vector for particular applications: *integrating* vectors are, at present, the tools of choice if *stable* genetic alteration needs to be maintained in dividing cells.

# Vettori Retrovirali e Lentivirali

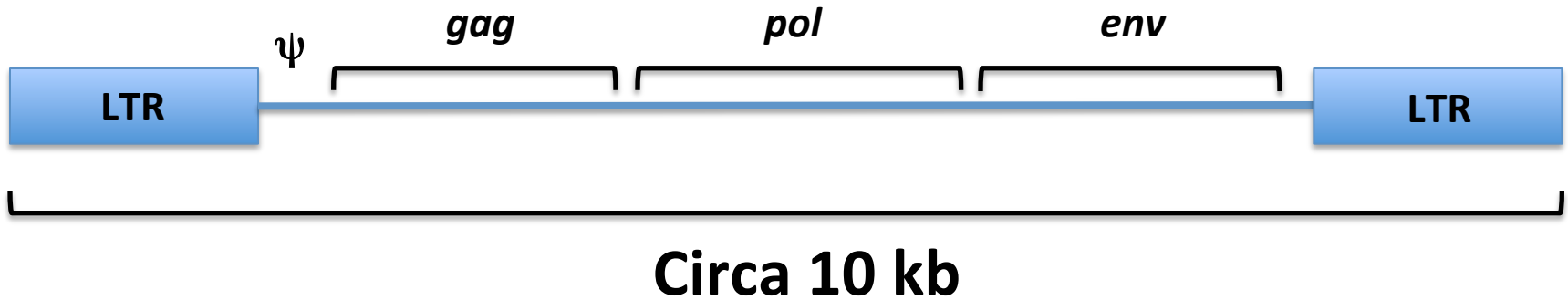
Sono stati i primi virus ad essere studiati nella terapia genica, di cui il capostipite è il *virus della leucemia murina* che nell'uomo non è associato ad alcuna malattia. Un retrovirus presenta *due* filamenti di **RNA** complessati con varie proteine, un **capside** ed un involucro lipidico, derivato dalla cellula ospite infettata.



Esso si lega a specifici **recettori** situati sulla **membrana cellulare**, il che innesca un meccanismo che porta alla fusione dell'involucro lipidico virale con quello della cellula.

In questo modo il virus viene rilasciato nel citoplasma e successivamente l'RNA viene liberato dall'involucro capsidico e può così fungere da stampo per una **DNA polimerasi RNA dipendente** (la **trascrittasi inversa**) che sintetizza, così, un filamento di DNA che, ad opera d'una **integrasi** virale, viene integrato nel genoma dell'ospite.

# Vettori Retrovirali e Lentivirali



**LTR:** Long Terminal Repeats, con attività di *promotori*

$\psi$ : sequenza di *incapsidamento*

**gag, pol, env:** *geni strutturali* che producono fattori necessari per la retrotrascrizione del genoma (copiatura del RNA in DNA) e produzione delle proteine del capside.

- **gag:** codifica per le *proteine del core*
- **pol:** codifica per la *trascrittasi inversa*
- **env:** codifica per le *proteine dell'envelope*

Nei vettori retrovirali le sequenze dei **geni strutturali** (circa 8 kb) vengono sostituite con i geni di interesse.

- **vettori retrovirali** REPLICAZIONE **COMPETENTI**

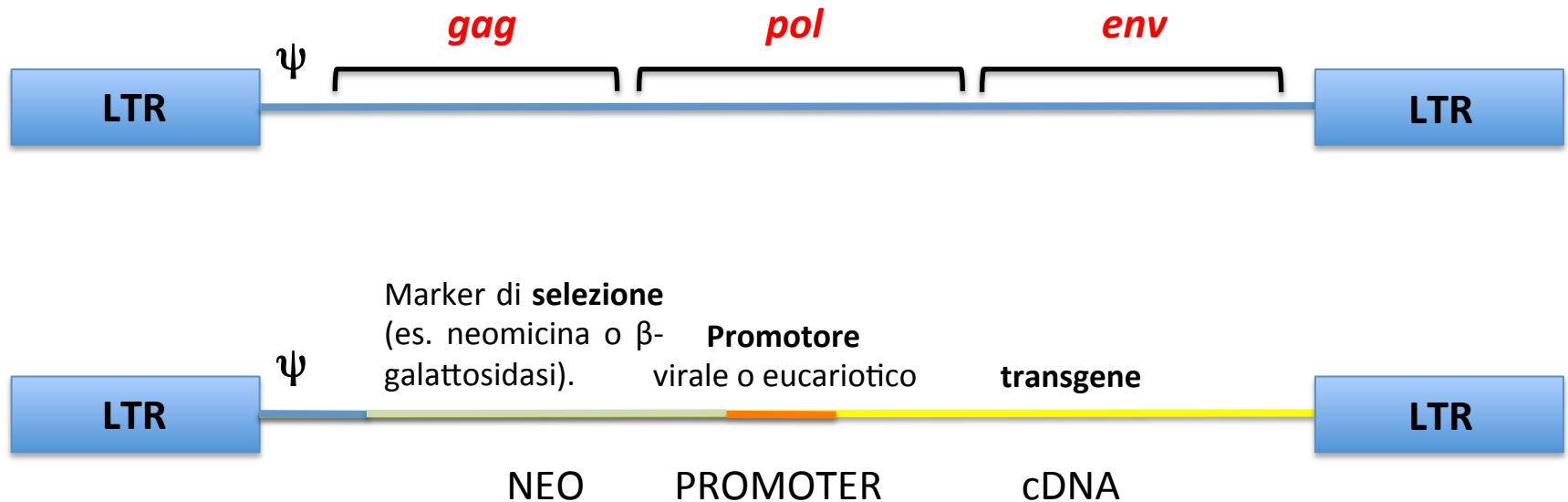
Sono virus integri nei geni che ne consentono la replicazione, ma vengono privati di sequenze indesiderabili (es src del RSV).

- **vettori retrovirali** REPLICAZIONE **DEFICIENTI**

La maggior parte delle applicazioni dei vettori retrovirali richiedono che *non* vi sia replicazione del virus dopo l'infezione iniziale.

Si possono sostituire *parte* o tutte le *sequenze codificanti* del retrovirus con quelle che si desidera trasferire: in questo modo il vettore stesso è incapace di produrre le proteine necessarie alla propria replicazione:

I geni virali *gag*, *pol* ed *env* sono *sostituiti* con il cDNA del gene di interesse. Viene *mantenuta* la regione essenziale che comprende i due LTR e la sequenza di packaging (elementi-cis). Il vettore che si ottiene NON è in grado di produrre le proteine virali necessarie per un altro ciclo di infezione (vettore difettivo nella replicazione).



Le **funzioni** richieste per l'infezione iniziale del vettore sono generalmente fornite da una linea cellulare detta "*packaging*", che consente la produzione di virus infettante ma incapace di replicarsi.



# Produzione dei vettori in cellule packaging

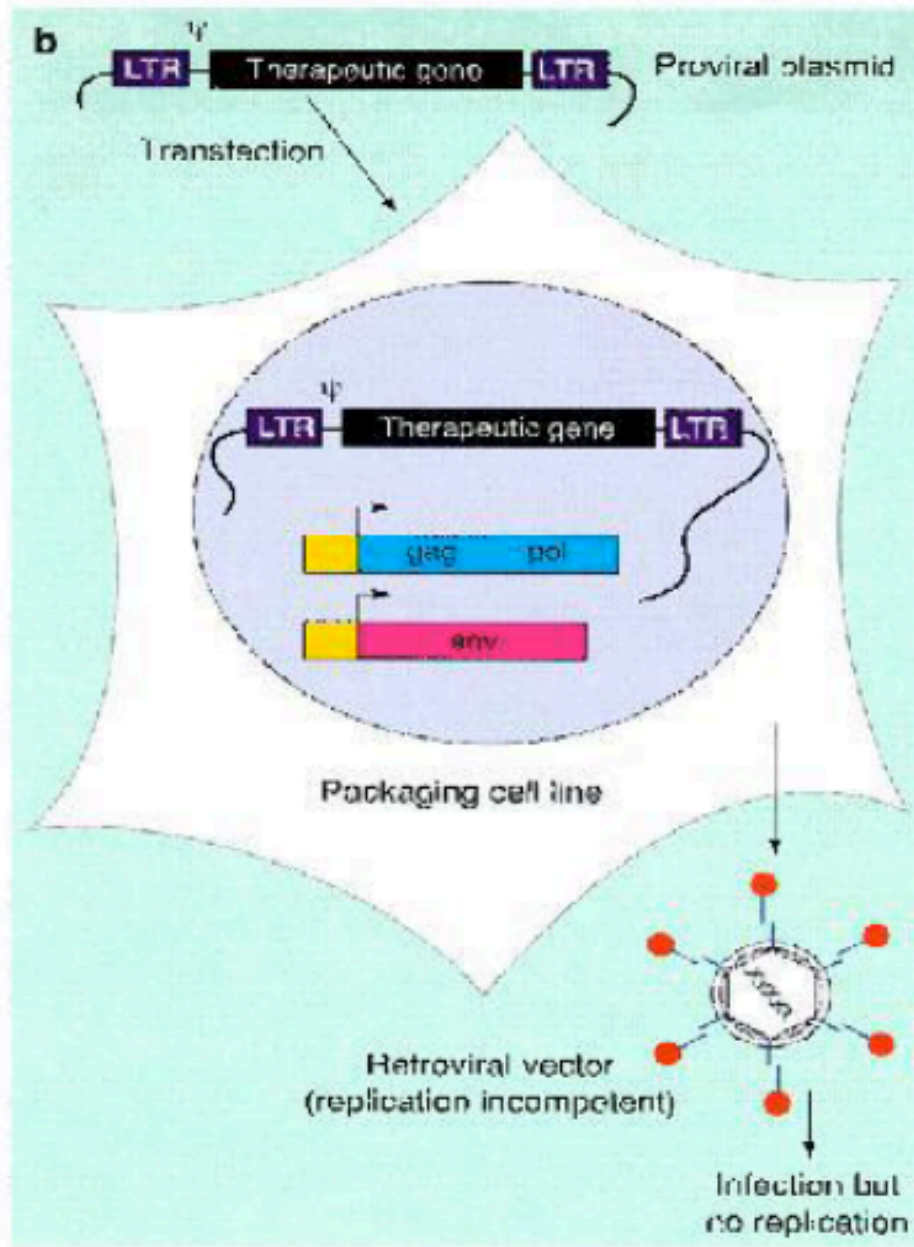
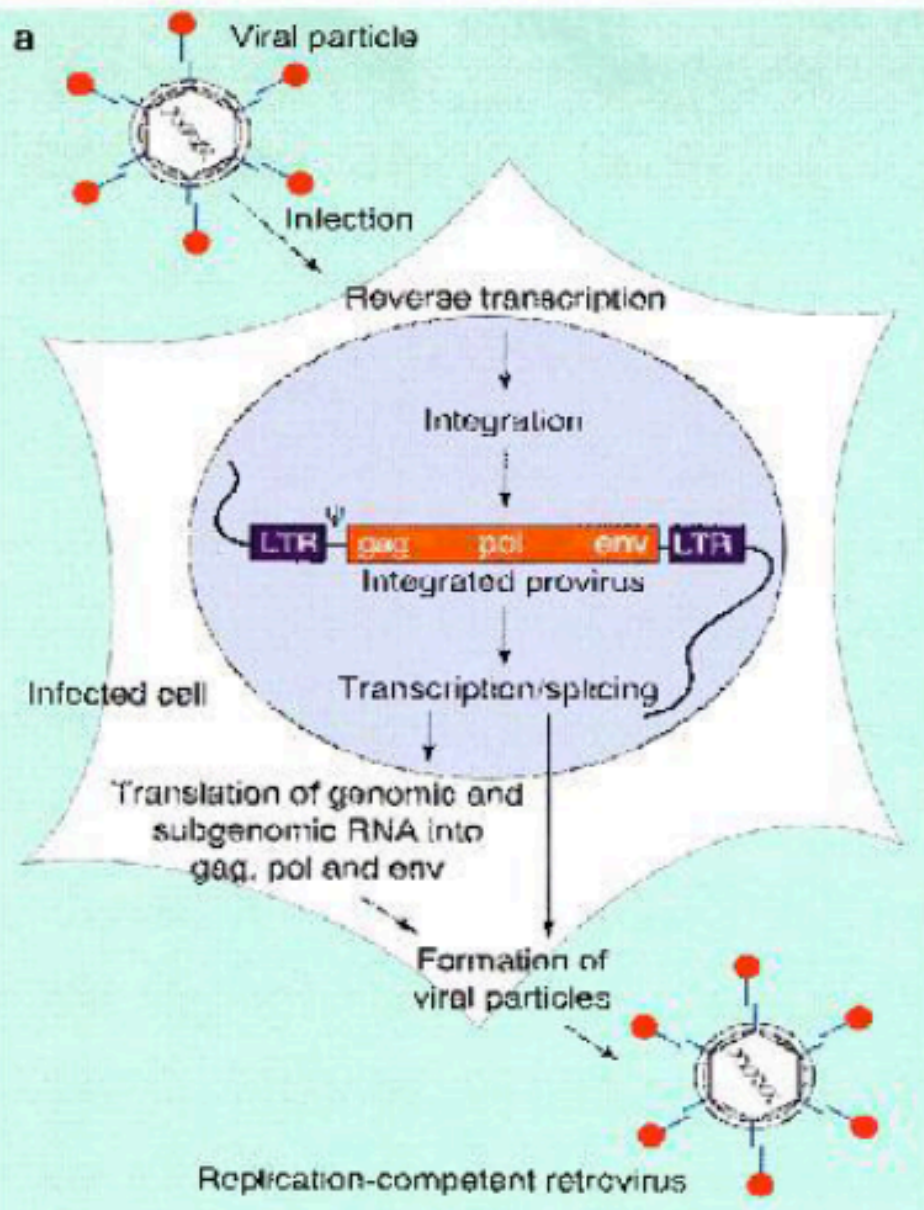
Le proteine virali necessarie per l'infezione iniziale vengono fornite in trans da :

- 1) **CELLULE DI PACKAGING** (es: NIH3T3)
- 2) **VIRUS HELPER**

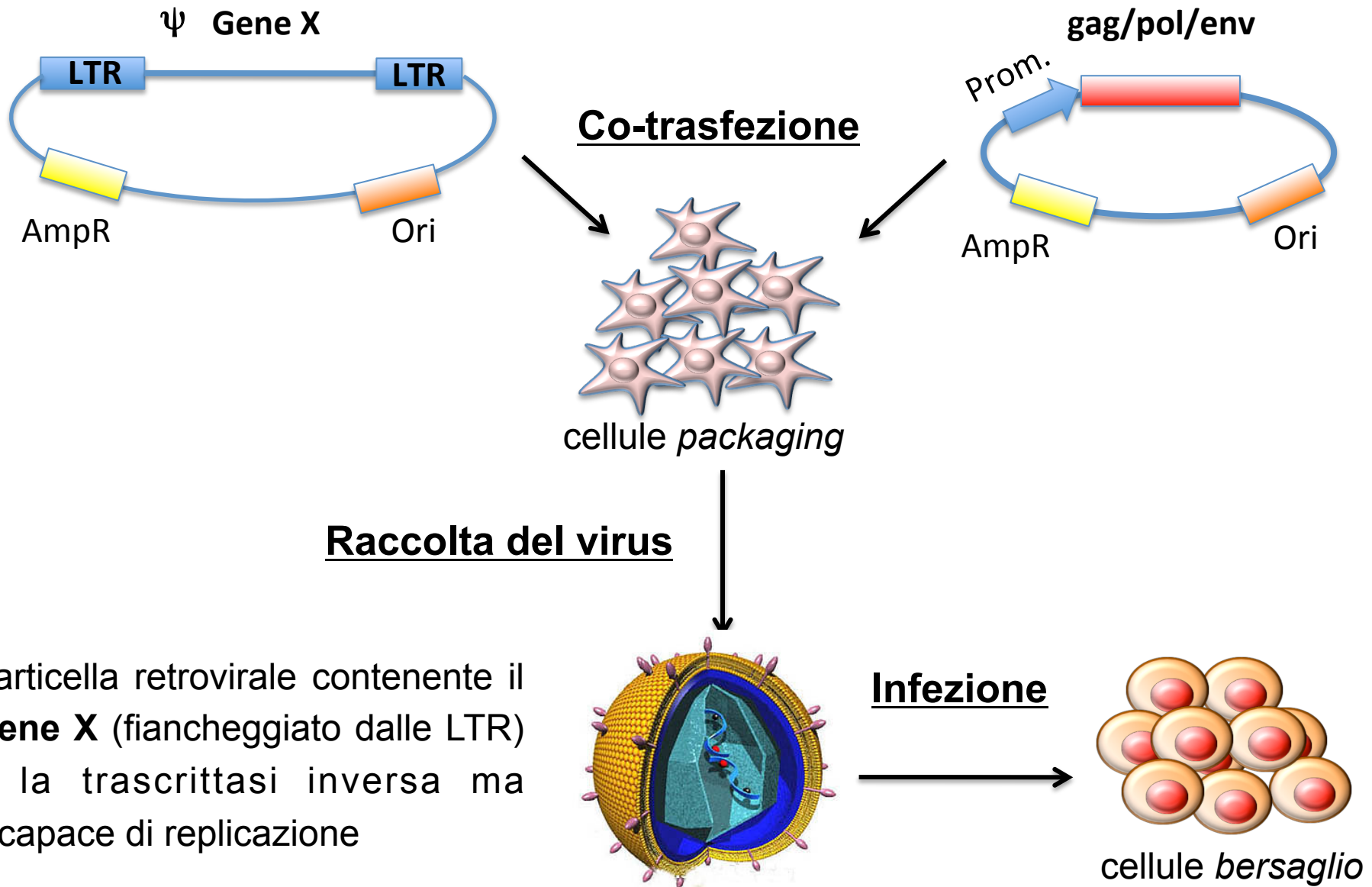
La prima linea fu ottenuta trasfettando permanentemente cellule **NIH3T3** (*fibroblasti* embrionici murini immortalizzati) **con un retrovirus MLV privato di  $\psi$** . La linea cellulare ottenuta *complementa* costrutti privi di gag, pol e env, ma i titoli ottenuti sono bassi e la frequenza di ricombinazione con produzione di revertanti replicazione competenti (RCR) è troppo elevata!!!!

## Strategia "*split genome*"

Per ridurre ulteriormente le possibilità di ricombinazione le proteine gag e pol sono state espresse su un plasmide diverso da quello esprime env (), e non più sotto il controllo di LTR.



# Produzione dei vettori in cellule packaging



## Vettori Retrovirali: *limitazioni*

A limitation to the usefulness of C-type retrovirus vectors is that they *can only gain access to the cell nucleus if the nuclear membrane breaks down*. Therefore

they can only transduce *dividing* cells

Recently, a *nuclear localization signal* was engineered in the matrix protein of an avian C-type retrovirus — spleen necrosis virus (SNV) — to enable an SNV vector to transduce non-proliferating cells.

# Lentivirus

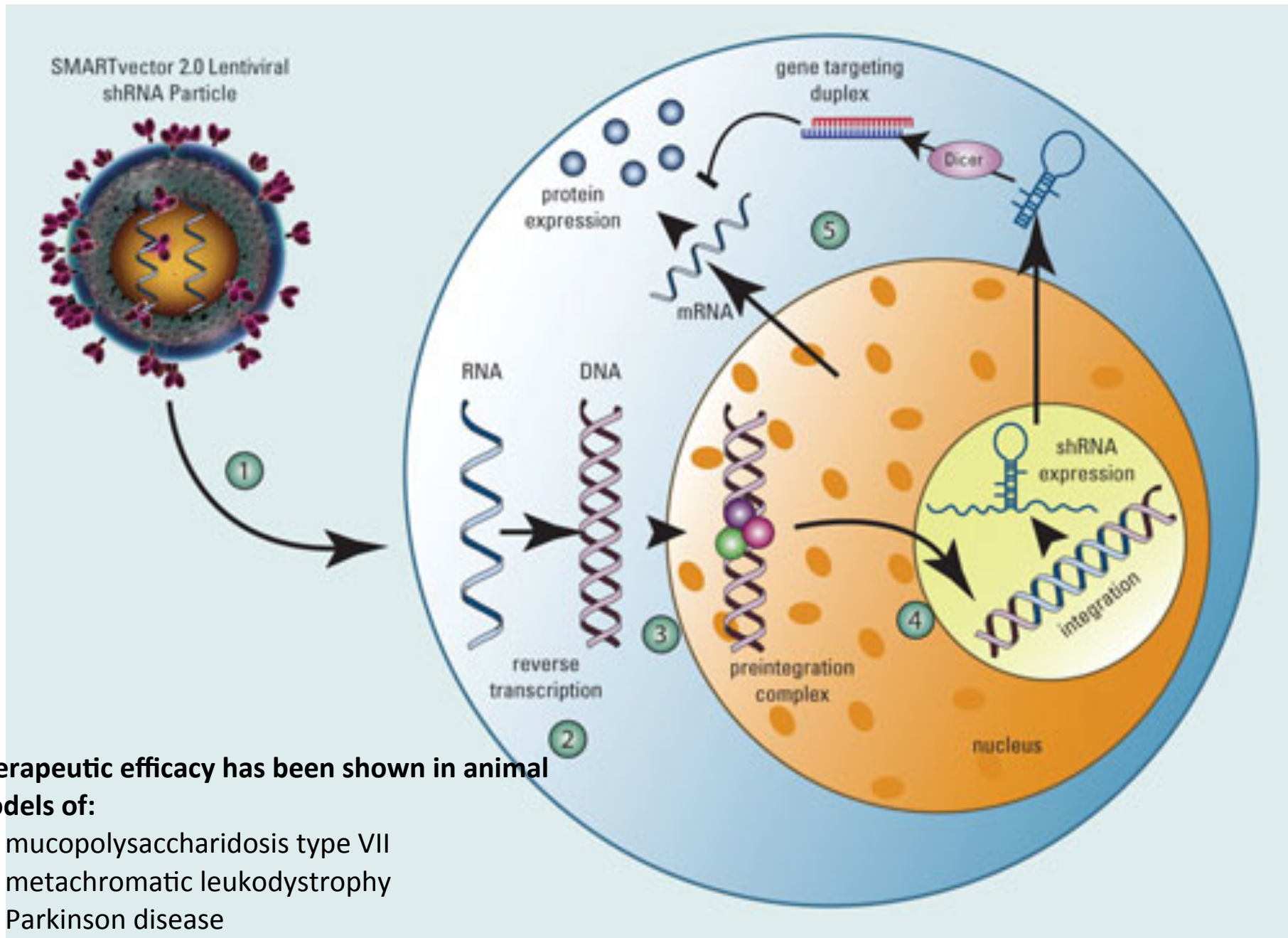
**Lentiviruses** are members of the retrovirus family that have been derived from human immunodeficiency virus (HIV) and other non-human lentiviruses. Vectors that are based on HIV retain **<5%** of the parental genome, and **<25%** of the genome is incorporated into packaging constructs, which minimize the possibility of the generation of revertant replication-competent.

Unlike C-type retroviruses, the lentiviral cDNA complexed with other viral factors — known as the **pre-integration complex (PIC)** — is able to translocate across the nuclear membrane and transduce non-dividing cells.

This characteristic enables lentivirus vectors to transduce **haematopoietic stem cells** *ex vivo* without first inducing them to proliferate with cytokine stimulation. Proven to be effective tools for gene delivery to the **central nervous system (CNS)**, generating long-term gene expression in the absence of inflammation.



# Lentivirus



Therapeutic efficacy has been shown in animal models of:

- mucopolysaccharidosis type VII
- metachromatic leukodystrophy
- Parkinson disease

La Terapia genica che si avvale dell'utilizzo del lentivirus, è stata utilizzata per la prima volta nella cura del deficit dell'enzima **Adenosina deaminasi (ADA)**

- Questo enzima interviene nel catabolismo delle Purine e catalizza la *deaminazione* di Adenosina e Desossiadenosina (in Inosina e Desossiinosina).
- L'accumulo di Adenosina, Deossiadenosina e desossi-ATP blocca i sistemi di sintesi, regolazione e riparo del DNA in particolare dei *linfociti B e T* che non riescono a duplicarsi allorché vengono stimolati durante le risposte immunitarie
- Mutazioni nel gene ADA causano immunodeficienza (SCID, Severe Combined Immunodeficiency)



# SCID, Severe Combined Immunodeficiency

Il deficit dell'enzima adenosina deaminasi (**ADA-SCID**) fa parte del gruppo delle immunodeficienze combinate gravi, di cui costituisce il 20-30%, ed è causata da una serie di mutazioni trasmesse con modalità autosomica recessiva. In tali patologie il **sistema immunitario** è gravemente **compromesso**, al punto che l'organismo è incapace di difendersi da qualsiasi agente infettivo.

Si manifesta già nelle prime settimane di vita con estrema *suscettibilità* a tutti i tipi di infezioni, anche da parte dei batteri e dei virus più innocui per soggetti sani. In assenza di trattamento, compaiono ben presto infezioni ricorrenti, soprattutto alle vie respiratorie, che possono risultare letali per i bambini affetti entro i primi anni di vita



# SCID, Severe Combined Immunodeficiency: le terapie

1) La migliore terapia consiste nel **trapianto di midollo** al fine di restaurare il sistema immunitario del soggetto (difficoltà di reperire un donatore perfettamente compatibile). Sono stati anche tentati protocolli che utilizzassero midollo di donatori semi-compatibili (genitori).

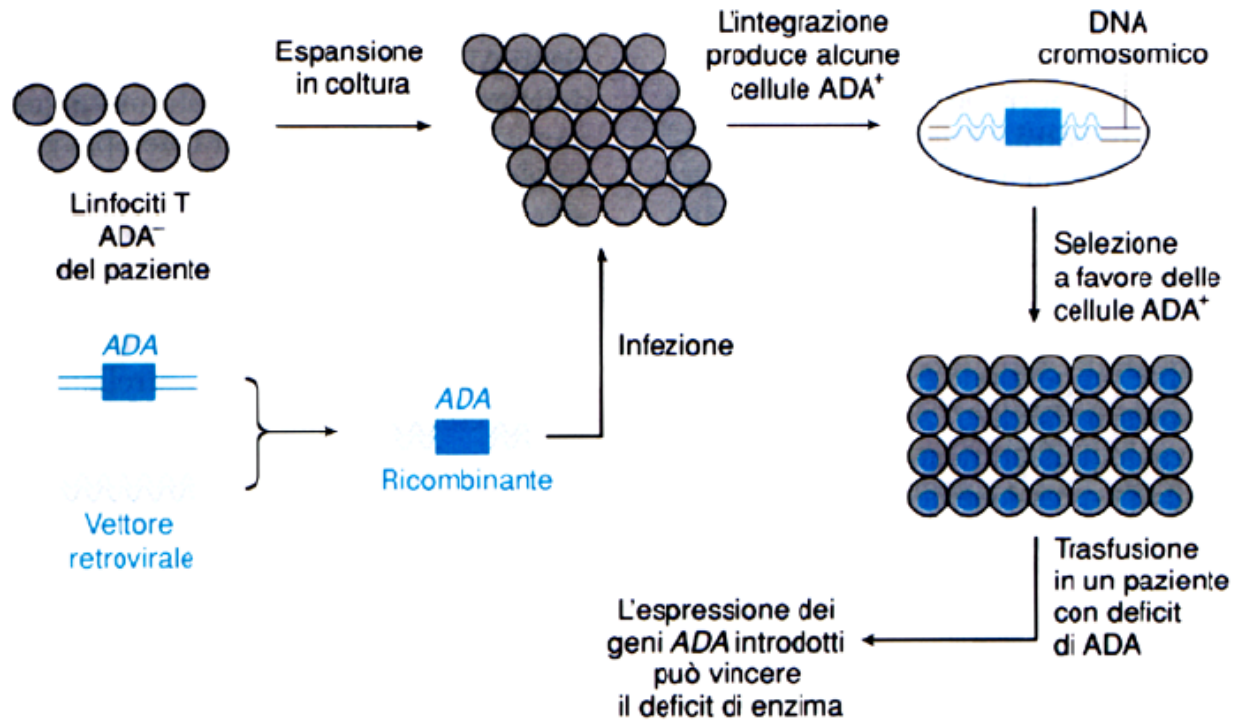
2) In alternativa si può fornire al bambino l'enzima **ADA purificato**, di origine bovina, coniugato con polietilenglicole (terapia Peg-Ada), che blocca la degradazione dell'enzima dalle proteasi dell'organismo consentendo così un *aumento della sua emivita*. Tale terapia tende a normalizzare i parametri immunologici ed a diminuire i metaboliti tossici ma *non* funziona con tutti gli individui. Oltre a quella bovina, si può anche utilizzare ADA umana..

3) **Terapia genica**

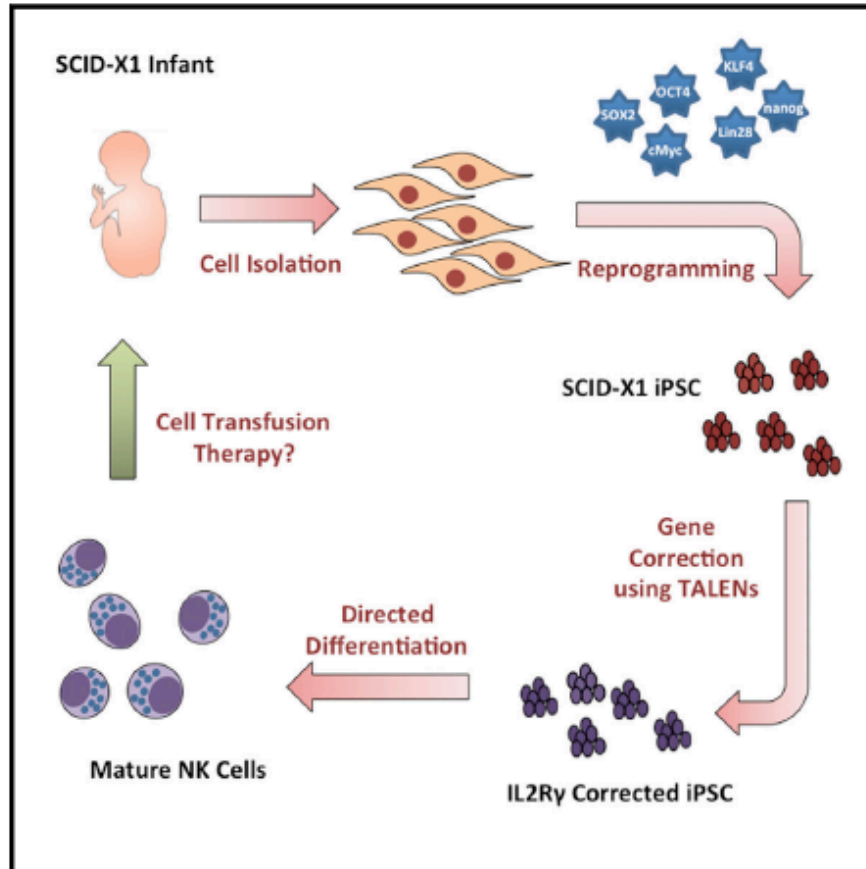
### 3) La Terapia genica nella cura della SCID

- estrazione dei linfociti T (ADA-) dal paziente
- crescita dei linfociti T in coltura e successiva infezione con retrovirus ricombinante ADA+ .
- Selezione delle cellule in cui ADA+ si è integrato nel genoma.
- Trasfusione delle cellule ADA+ nel paziente malato. L'espressione dei geni ADA introdotti sopperisce al deficit della deaminasi.

#### Il Protocollo:



## Graphical Abstract



## Highlights

- A splice site mutation in IL-2R $\gamma$  was corrected at the endogenous locus using TALENs

## Authors

Tushar Menon, Amy L. Firth, ...,  
Jerome A. Zack, Inder M. Verma

## Correspondence

verma@salk.edu

## In Brief

Menon, Firth, and colleagues show that TALEN-mediated correction of a novel splice site mutation in the IL-2R $\gamma$  gene rescues defective development of mature NK cells from iPSCs derived from a SCID-X1 subject. They demonstrate correction of the aberrant splicing of the IL-2R $\gamma$  in T cell precursors.

We have utilized induced pluripotent stem cell (iPSC) technology and genome editing mediated by TALENs to generate isogenic subject-specific mutant and gene-corrected iPSC lines. While the subject-derived mutant iPSCs have the capacity to generate hematopoietic precursors and myeloid cells, **only wild-type and gene-corrected iPSCs can additionally generate mature NK cells and T cell precursors expressing the correctly spliced IL-2R $\gamma$** . This study highlights the potential for the development of autologous cell therapy for SCID-X1 subjects.

# Vettori Adenovirali (Adenovirus)

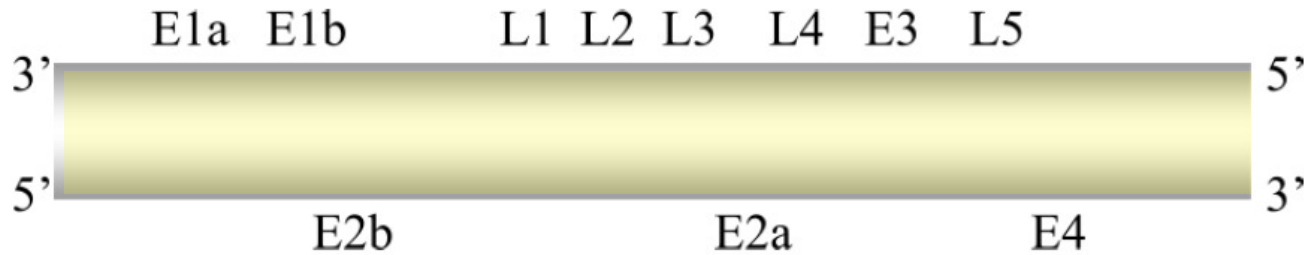
La piu' efficiente classe di vettori in termini di **capacita' di cargo** che puo' raggiungere le **35 kb** nei vettori di ultima generazione (**GUTLESS**).

- virus **senza envelope**, struttura icosaedrica regolare
- genoma di 36 Kb costituito da una molecola di **DNAdS**
- il genoma è fiancheggiato da sequenze ITR (Inverted Terminal Repeats) che servono come origine di replicazione
- dopo l'infezione il virus entra nel nucleo della cellula ospite e viene replicato
- non si integra nel genoma dell'ospite (resta *episomale*)
- infetta anche cellule *non* proliferanti
- dotato di ampio tropismo\*



\* **TROPISM**: The range of cell types or tissues in which a virus can sustain a productive infection.

# Vettori Adenovirali (Adenovirus)



Genoma virale **complesso** contenente vari geni Early (E) e Late (L) per l'infezione:

**E1a:** coinvolto nell'attivazione della trascrizione e nella promozione dell'entrata della cellula ospite in fase S (lega Rb - proteina del retinoblastoma che induce la produzione di proteine necessarie alla progressione da G1 a S)

**E1b:** blocca l'azione di p53 arrestando l'entrata della cellula in apoptosi

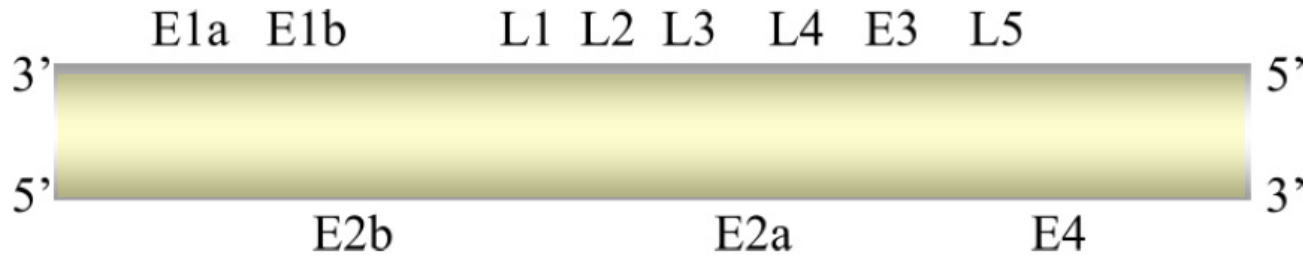
**E2:** codifica per 3 proteine coinvolte nella replicazione del DNA e nella modulazione della trascrizione (DNA-pol; proteina Terminale e DNA-binding protein)

**E3:** modula la risposta immunitaria

**E4:** regola la trascrizione, la transizione dell'espressione da early a late gene, la replicazione virale e l'assemblaggio dei virioni

**L1-5:** coinvolti nella produzione e nell'assemblaggio delle proteine del capside

# Vettori Adenovirali (Adenovirus)



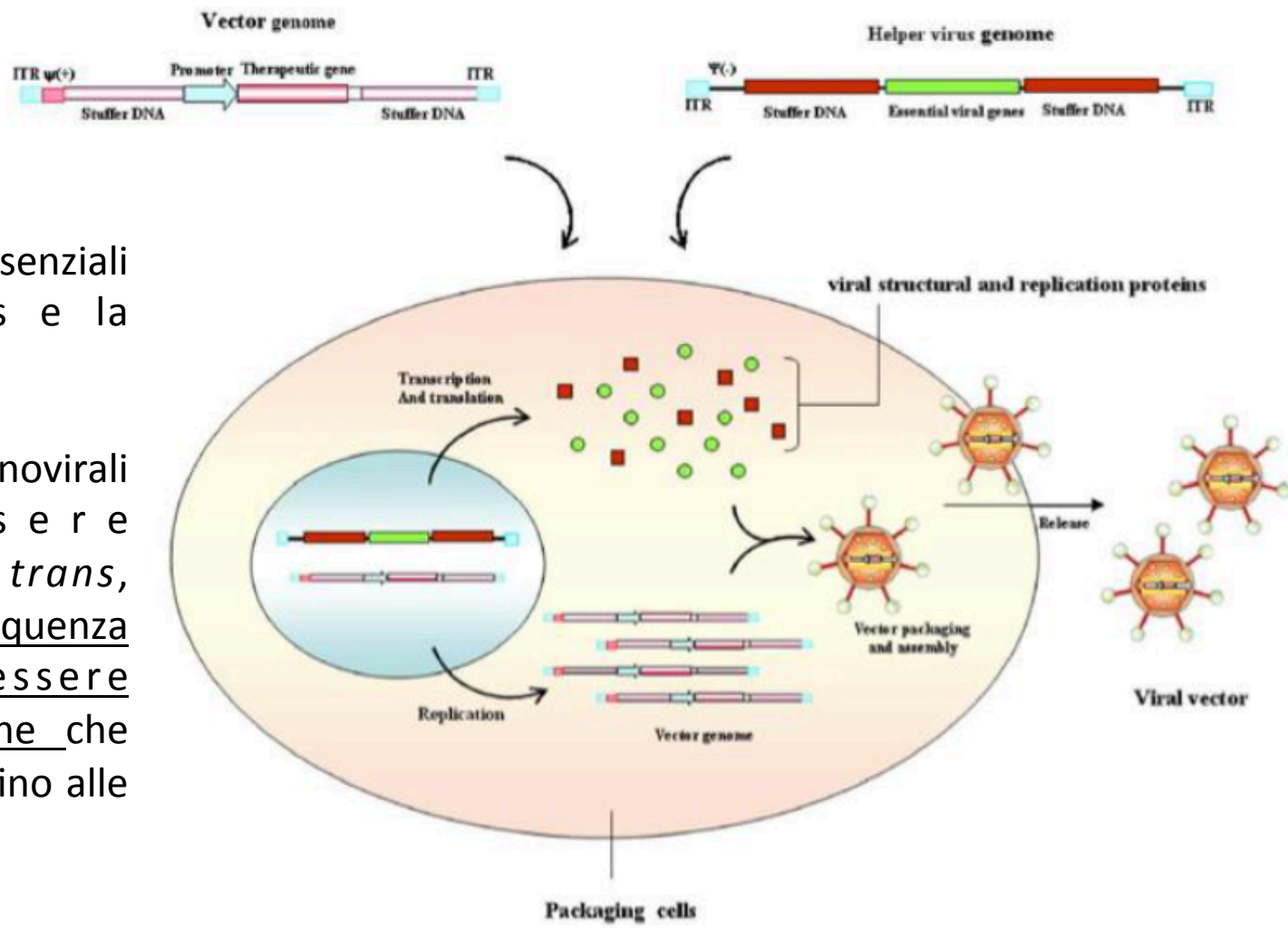
Adenovirus vectors have been extensively engineered to **reduce their *potent immunogenicity***.

- First-generation adenovirus vectors were deleted for only one or two viral EARLY GENES (**E1** and **E3**). Cells that were transduced with these vectors expressed other adenoviral genes at low levels, inducing *strong* cytotoxic T-cell responses that rapidly eliminated transgene expression.
- Second- and third-generation vectors that **contain additional deletions in other early genes (E2 and/or E4)** have shown reduced toxicity in animal models

The development of helper-dependent adenoviruses that are deleted for all viral genes has been the most important advance to decrease immunogenicity



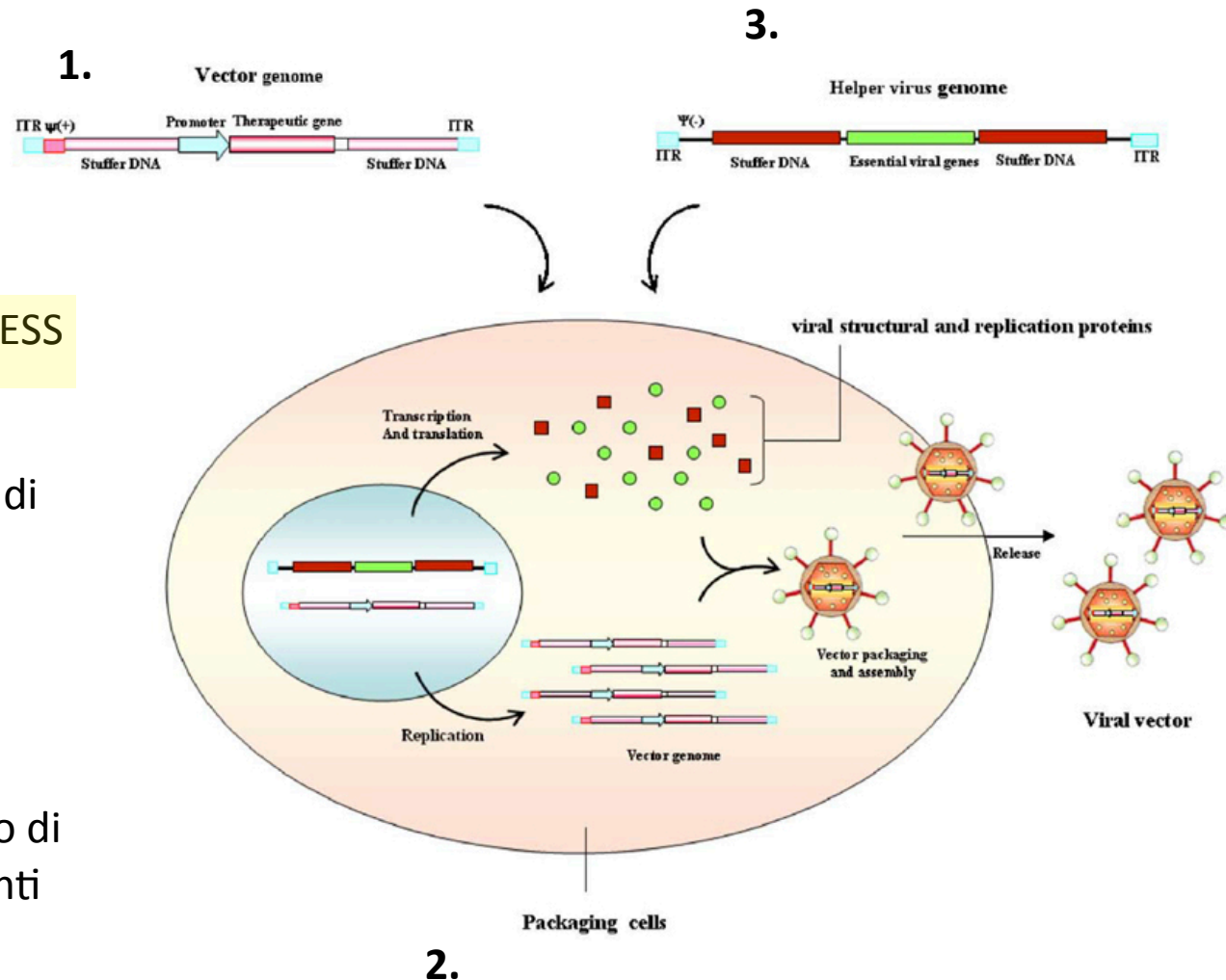
Vettori adenovirali helper-dipendenti di *III generazione* o GUTLESS: sono vettori ad alta capacità.



Le uniche sequenze essenziali in *cis* sono le ITRs e la sequenza  $\psi$ .

TUTTE le proteine adenovirali possono essere complementate in *trans*, quindi quasi tutta la sequenza codificante può essere sostituita dal transgene che può avere dimensioni fino alle 36 Kb.

# Vettori Adenovirali: GUTLESS



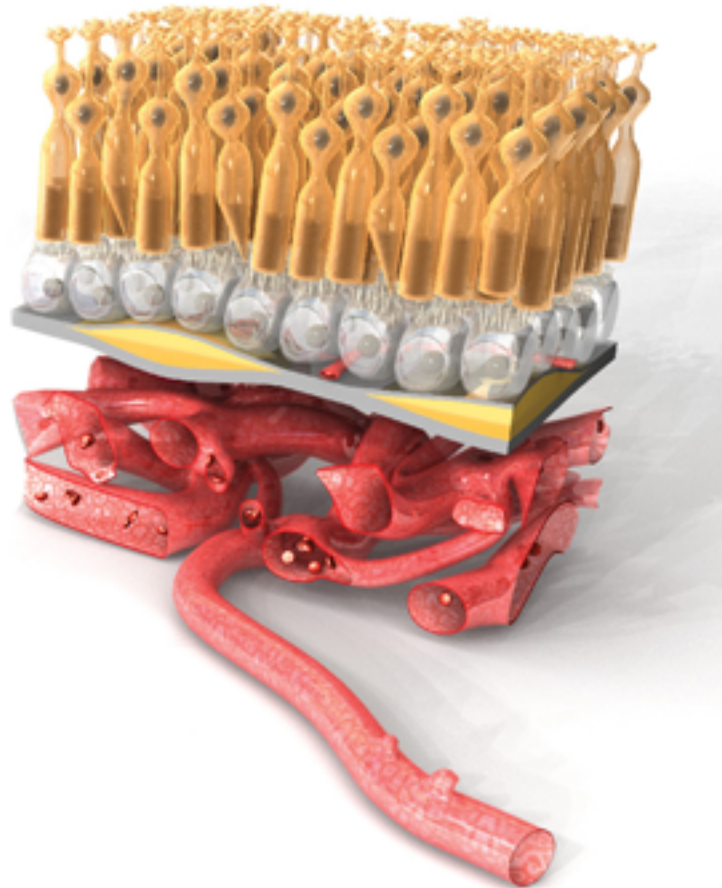
## PRODUZIONE DI VETTORI GUTLESS

**1. Vettore virale:** contiene solo sequenze ITRs e  $\psi$  + la cassetta di espressione del transgene

**2. Cellule di packaging (293):** esprimono E1

**3. Virus Helper:** E1-deleto, privo di sequenza  $\psi$ . Fornisce gli elementi *strutturali*

Oggi, l'adenovirus GUTLESS viene somministrato in diversi organi, come il *muscolo* , il *fegato*, o il *sistema nervoso centrale* raggiungendo una espressione del transgene ad **alto** livello e a **lungo** termine in roditori e primati.



# (AMD) Age-related macular degeneration

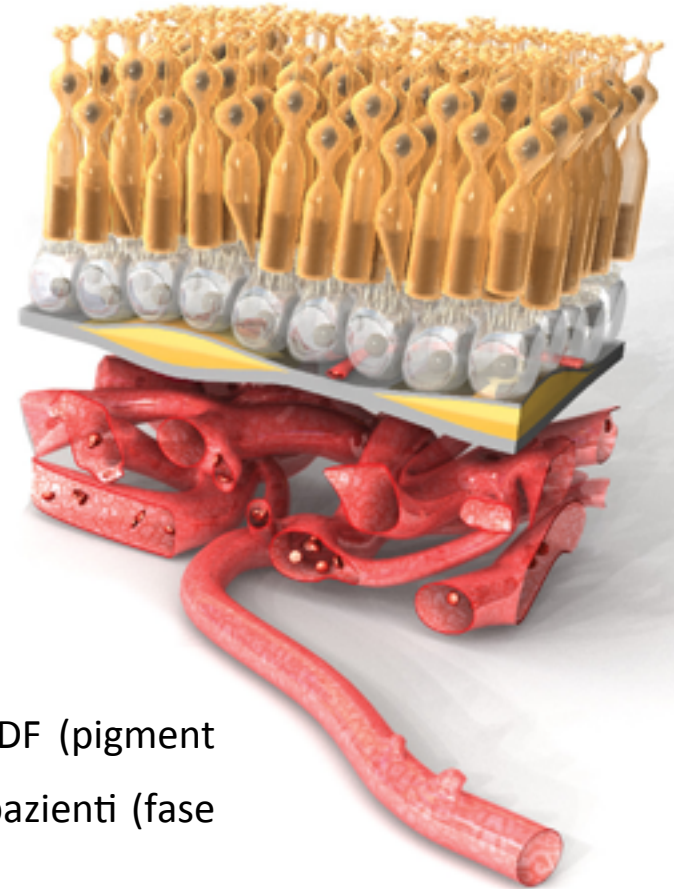
E' una patologia multifattoriale che colpisce la zona piu' centrale e sensibile della retina, detta *macula*, quella più ricca di cellule nervose deputate alla visione. Una delle cause di cecità più comuni nelle persone di età superiore ai 50 anni caratterizzata da una *angiogenesi* estesa sotto la macula.

Vettori adenovirali che esprimono il fattore anti-angiogenico PEDF (pigment epithelium-derived factor) sono stati inoculati localmente in 28 pazienti (fase I): ben tollerato.

S48 RETINA, THE JOURNAL OF RETINAL AND VITREOUS DISEASES • VOL 25 • No 8 • SUPPLEMENT 2005

## **Adenovector Pigment Epithelium-Derived Factor (AdPEDF) Delivery for Wet Age-Related Macular Degeneration**

LISA WEI, PhD



# PRODUZIONE DI VETTORI VIRALI

Diversi *fattori* determinano l'**efficienza** di produzione di un vettore virale:

1. La natura del vettore

2. La linea cellulare di packaging: modificazioni del ciclo cellulare al fine di favorire le fasi di replicazione virale e inibizione dell'apoptosi (es. alcuni virus, quali SV40 e Epstein-Barr hanno evoluto sistemi anti-apoptotici)

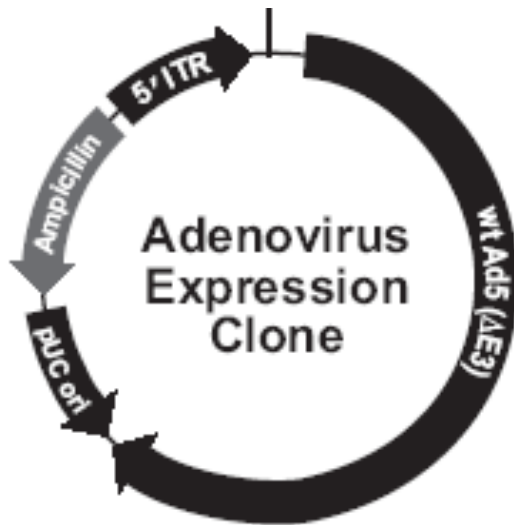
3. Le condizioni di coltura:

- temperatura di crescita
- concentrazione del siero
- tempo di infezione
- confluenza cellulare al momento dell' infezione

Es. retrovirus: emivita aumentata di 4 volte e titolo virale aumentato di 5-10 volte portando la temperatura di crescita da 37° C a 32° C.

# Es. PRODUZIONE DI VETTORI ADENOVIRALI

## 1) Vettore adenovirale:

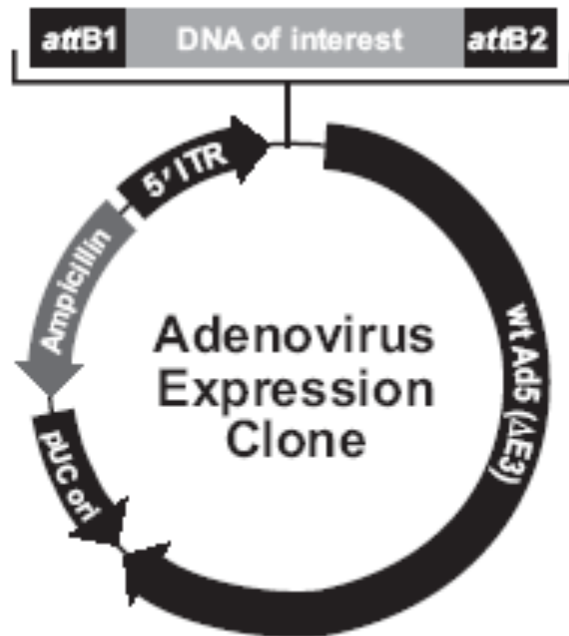


- vettore commerciale delecto in E1 e E3
- gene di interesse posto sotto il controllo di un promotore forte (es. CMV)
- sequenze necessarie per il packaging (ITRs, sequenza  $\psi$ , late gene)

## 2) Cellule di packaging:

linea cellulare 293A (cellule embrionali renali umane), che contiene una copia dei geni E1 integrata stabilmente (complementazione in *trans*)

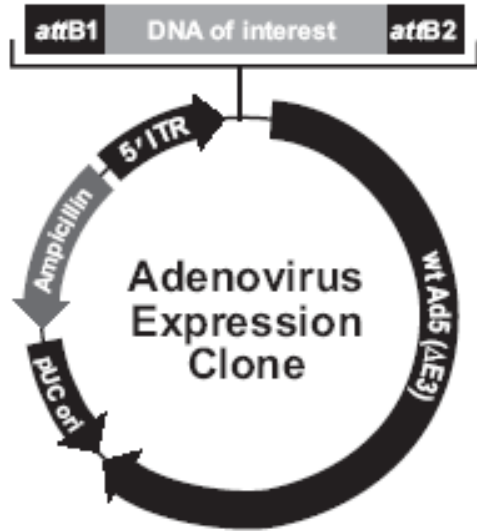
# 1. INSERZIONE DEL TRANSGENE NEL VETTORE



*Clonaggio* del DNA di interesse mediante taglio enzimatico del vettore, dell'inserto (estremità coesive) e successiva ligazione



## 2. TRASFEZIONE DELLA LINEA 293A CON IL VETTORE



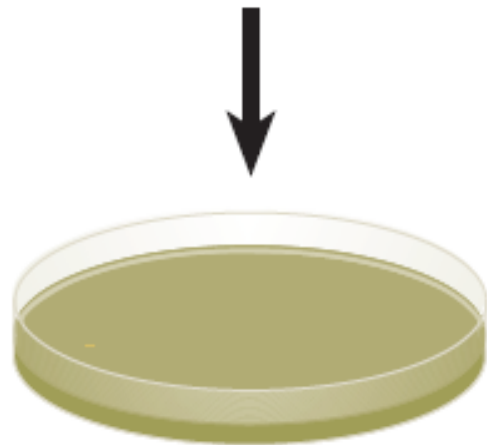
1. The day before transfection, trypsinize and count the 293A cells, plating them at  $5 \times 10^5$  cells per well in a 6-well plate. Plate cells in 2 ml of normal growth medium containing serum.

2. On the day of **transfection**, remove the culture medium from the 293A cells and replace with 1.5 ml of normal growth medium containing serum. **Do not** include antibiotics.

3. Prepare DNA-Lipofectamine complexes **for each transfection sample**.

4. Add the DNA-Lipofectamine complexes dropwise to each well. Mix gently by rocking the plate back and forth. Incubate the cells overnight at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator.

5. The next day, remove the medium containing the DNA-Lipofectamine complexes and replace with complete culture medium (*i.e.* D-MEM containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, and 1% penicillin/streptomycin).



293A Producer Cell Line

## 2. TRASFEZIONE DELLA LINEA 293A CON IL VETTORE

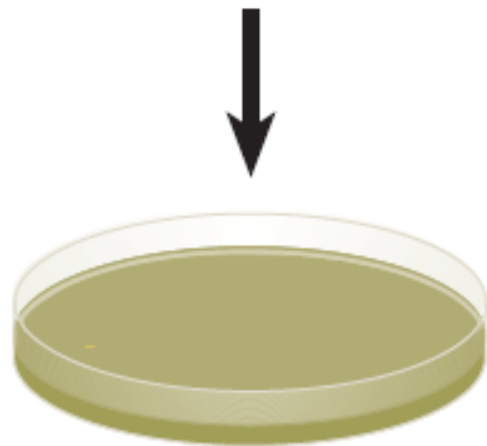
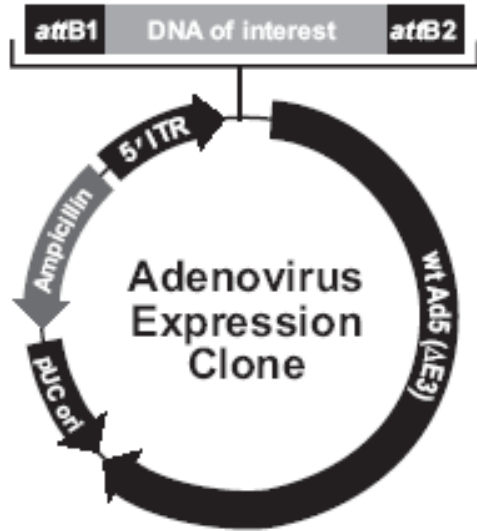
6. 48 hours post-transfection, trypsinize cells and transfer the contents of each well to a sterile 10 cm tissue culture plate containing 10 ml of complete culture medium.

**Caution:** Remember that you are working with infectious virus at this stage and in all subsequent procedures.

7. Replace culture medium with fresh, complete culture medium every 2-3 days until visible regions of cytopathic effect (CPE) are observed (typically 7-10 days post-transfection).

8. Replenish culture medium and allow infections to proceed until approximately 80% CPE is observed (typically 10-13 days post-transfection).

9. Harvest adenovirus-containing cells by squirting cells off the plate with a 10 ml tissue culture pipette. Transfer cells and media to a sterile, 15 ml, capped tube. Proceed to **Preparing a Crude Viral Lysate**.



293A Producer Cell Line

# Valutazione dell'effetto citopatico



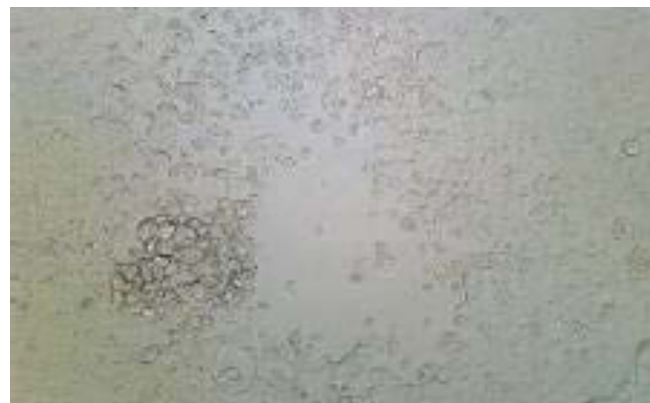
## Day 4-6 post-transfection

At this early stage, cells producing adenovirus first appear as patches of rounding, **dying** cells.



## Day 6-8 post-transfection

As the infection proceeds, cells containing viral particles lyse and infect neighboring cells. A plaque begins to form.



## Day 8-10 post-transfection

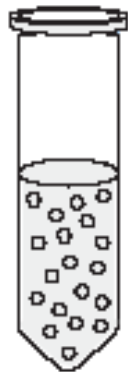
At this late stage, infected neighboring cells lyse, forming a plaque that is clearly visible.

### 3. PREPARAZIONE DEL LISATO VIRALE

After you have harvested adenovirus-containing cells and media, you will use several freeze/thaw cycles followed by centrifugation to prepare a crude viral lysate. **The freeze/thaw cycles cause the cells to lyse and allow release of intracellular viral particles.**



293A Producer Cell Line



1. Place the tube containing harvested cells and media from **Transfection Procedure**, Step 9, page 11 at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes. Remove tube and place in a  $37^{\circ}\text{C}$  water bath for 15 minutes to thaw. Repeat the freezing and thawing steps twice.

**Note:** Do not incubate samples at  $37^{\circ}\text{C}$  for longer than 15 minutes.

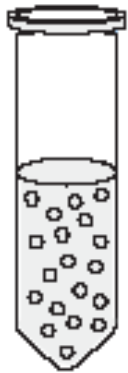
2. Centrifuge the cell lysate in a table-top centrifuge at 3000 rpm for 15 minutes at room temperature to pellet the cell debris.

3. Transfer the supernatant containing viral particles to cryovials in 1 ml aliquots. Store the viral stocks at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3. PREPARAZIONE DEL LISATO VIRALE



293A Producer Cell Line



Once you have prepared a crude viral stock, you may:

- **Amplify** the viral stock by infecting 293A cells (see the next section for details). This procedure is recommended to obtain the highest viral titers and optimal results in your transduction studies.
- Determine the **titer**
- Use this viral stock to *transduce* your mammalian cells of interest to verify the functionality of your adenoviral construct in preliminary expression experiments.

## 4. AMPLIFICAZIONE DELLO STOCK DI VETTORI ADENOVIRALI

The day before infection, trypsinize and count the 293A cells, plating them at  $3 \times 10^6$  cells per 10 cm plate. Plate cells in 10 ml of normal growth medium containing serum.

2. On the day of infection, verify that the cells are at 80-90% confluency before proceeding. Add the desired amount of crude adenoviral stock to the cells.

3. Incubate the cells at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator and allow infection to proceed until 80-90% of the cells have rounded up and are floating or lightly attached to the tissue culture dish (typically 2-3 days post-infection). This indicates that cells are loaded with adenoviral particles.

4. Harvest adenovirus-containing cells by squirting cells off the plate with a 10 ml tissue culture pipette. Transfer cells and media to a sterile, 15 ml, capped tube.

5. Place the tube containing harvested cells and at -80°C for 30 minutes. Remove tube and place in a 37°C water bath for 15 minutes to thaw. Repeat the freezing and thawing steps twice.

6. Centrifuge the cell lysate in a table-top centrifuge at 3000 rpm for 15 minutes at room temperature to pellet the cell debris.

7. Transfer the supernatant containing viral particles to cryovials in 1 ml aliquots. Store the viral stocks at -80°C. Proceed to Titering Your Adenoviral Stock

# 5. TITOLAZIONE DELLO STOCK DI VETTORI ADENOVIRALI

Before proceeding to transduce the mammalian cell line of interest

To determine the titer of an adenoviral stock, you will:

1. Plate 293A cells in 6-well tissue culture plates.
3. Prepare 10-fold serial dilutions of your adenoviral stock.
5. Infect 293A cells overnight with serial dilutions of adenoviral stock.
7. Perform a plaque assay by overlaying the infected 293A cells with an agarose/plaquing media solution. Allow 8-12 days for plaques to form.
5. Stain and count the number of plaques in each dilution



## 5. TITOLAZIONE DELLO STOCK DI VETTORI ADENOVIRALI

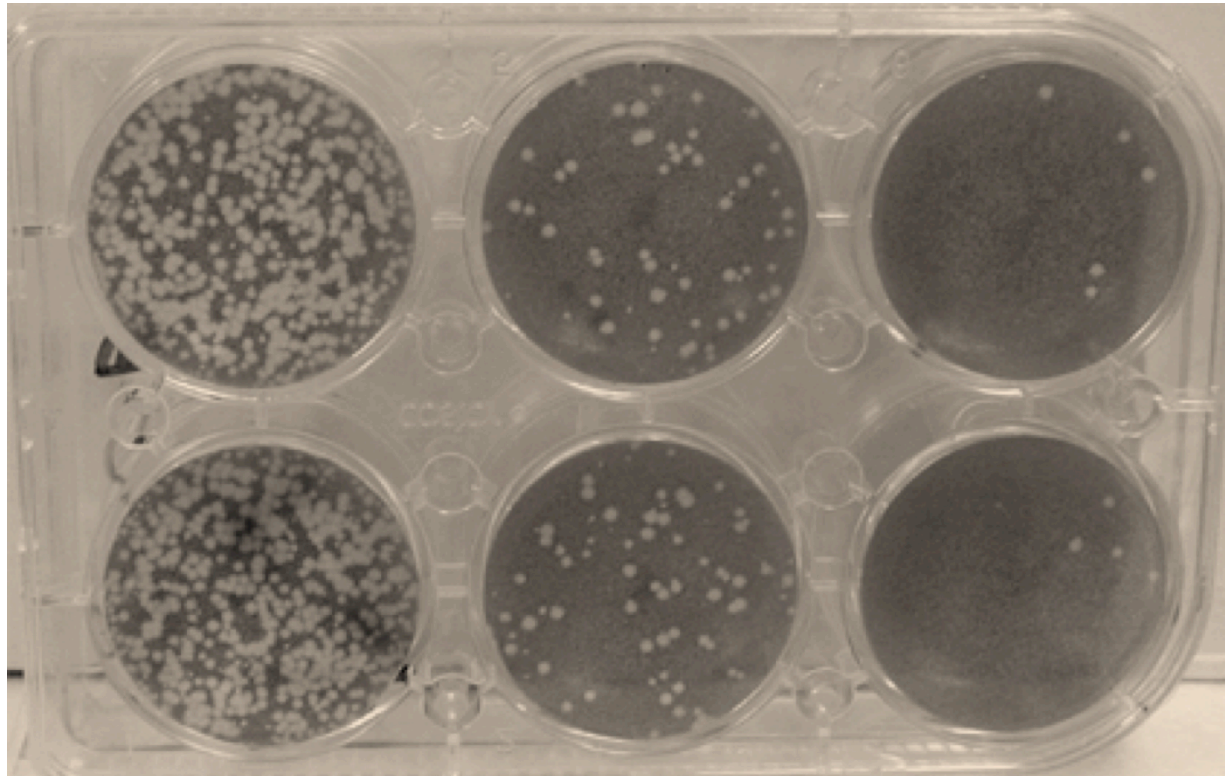
### Plaque assay

*Serial* dilutions of virus have been plated on confluent monolayer cultures of cells. The cells are stained after a period of time in which a single virus infects a cell, produces new virus particles and infects surrounding cells. The white areas show areas of the culture in which the cells have been killed. Each "plaque" is the result of the presence of one original infectious virus particle.

$10^{-4}$

$10^{-5}$

$10^{-6}$



$10^{-4}$  dilution: confluent; undeterminable

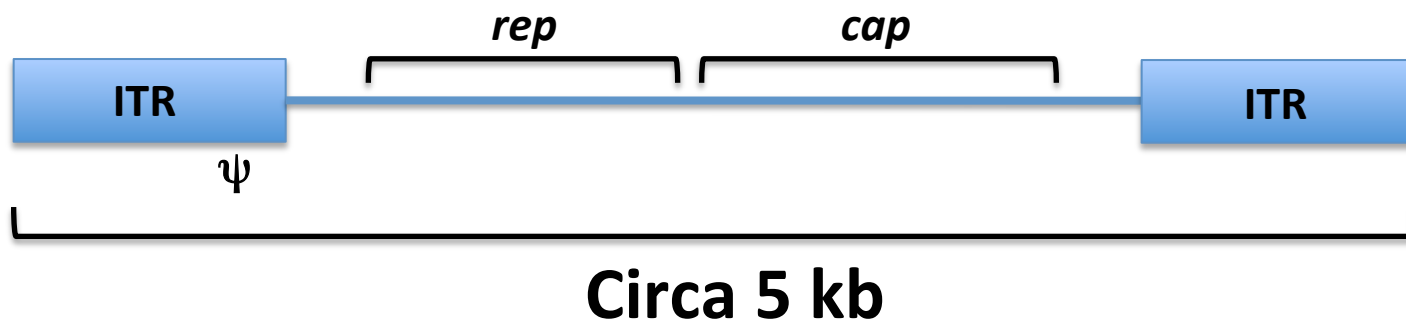
$10^{-5}$  dilution: 59

$10^{-6}$  dilution: 4.5

Quindi il *titolo* di questo stock virale è  $5,2 \times 10^6$  PFU/ml (i.e. average of  $59 \times 10^5$  and  $4.5 \times 10^6$ ).

# Vettori Virali Adeno-Associati (AAV)

- virus a DNA a singolo filamento (con polarità + o -)
- capsidico icosaedrico
- no envelope
- genoma fiancheggiato da sequenze ITRs, che contengono la sequenza di packaging



**ITR:** Inverted terminal repeats.

$\psi$ : sequenza di incapsidazione

**rep:** gene codificante per proteine della replicazione virale

**cap:** gene codificante per proteine del capsidico

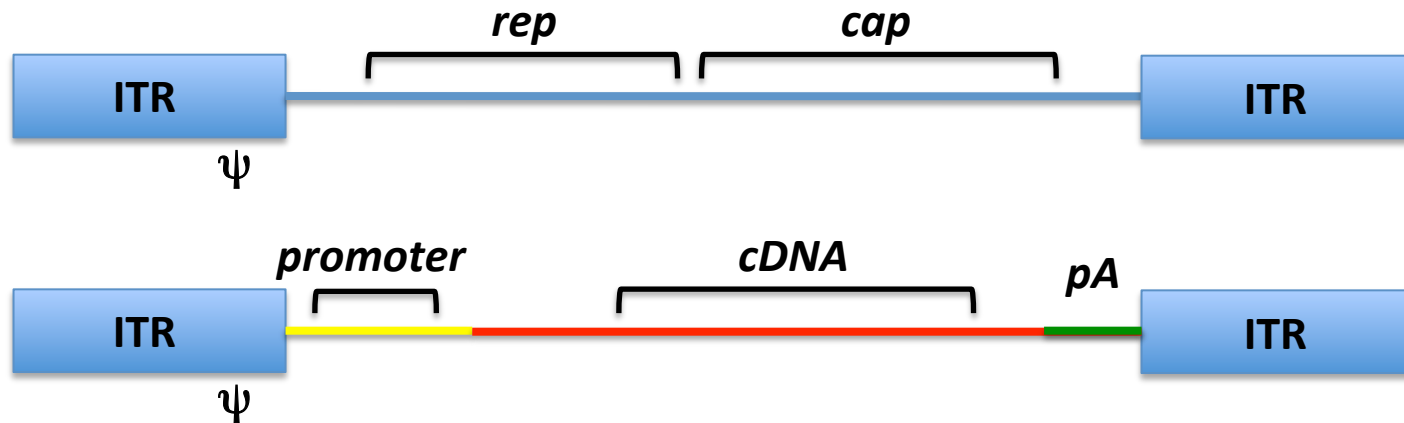
solo due tipi di geni

# Vettori Virali Adeno-Associati (AAV)

I virus AAV non sono in grado di replicarsi in modo autonomo, ma necessitano di un **adenovirus** o di un **herpes simplex virus (virus helper)**

- Il virus AAV wild-type e' in grado di integrarsi in modo **sito specifico** nel genoma ospite, in una regione del cromosoma 19. Questa integrazione sembra non comportare conseguenze nella cellula bersaglio (ad esempio, interferenza con geni dell'ospite o attivazione di oncogeni).
- Uno svantaggio nell'uso di vettori AAV e' legato alla **bassa capacita' di cargo**, intorno alle 4 kb, che ne limita l'utilizzo a geni di piccole dimensioni
- Tuttavia, la bassa immunogenicit  e la persistenza per anni nelle cellule ospiti senza integrazione rendono gli AAV strumenti molto promettenti nella **terapia genica**.

- Il vettore: è costruito sostituendo il transgene a **cap** e **rep**, in quanto le sequenze **ITRs** contengono tutte le informazioni necessarie per l'integrazione e per il packaging.



- Le cellule di packaging: linea cellulare 293 (cellule embrionali umane) trasfettata con un plasmide contenente i geni **cap** e **rep** e successivamente infettata con un adenovirus helper difettivo per E1 e privo della sequenza  $\psi$ .

# Vettori Virali Adeno-Associati (AAV)

## Vantaggi

- *Non* sono patogeni per l'uomo
- *Sono* stabili
- Vengono ottenuti con *alti* titoli
- Alta *efficienza* di trasferimento genico
- Ampio tropismo
- Infettano sia cellule in divisione che non
- Integrazione del transgene

## Svantaggi

- Dimensioni ridotte del transgene (4.7 Kb)
- Vettore ricombinante non ha integrazione sito specifica e talvolta resta episomale



# Applicazioni

- **Malattie della retina (Amaurosi Congenita):** il 10% e' dovuto a difetti nel gene RPE65 (uno dei 120 individuati) trials in fase I/II con AAVII
- **Fibrosi cistica:** trials con AAVII nessun successo
- **Deficienza da  $\alpha$ -1 anti-tripsina:** proteina secreta nel plasma con molteplici funzioni come anti-proteasico, anti infiammatorio e anti-apoptotico. Fase I con AAV2 e poi AAV1.
- **Parkinson:** perdita delle cellule che producono dopamina nella *substantia nigra*. Fase II usando acido glutammico decarbossilasi GAD nel nucleo subtalamico e rendendolo da sistema eccitatorio a inibitorio

# L' AMAUROSIS congenita di Leber

L'*Amaurosi congenita di Leber* è una malattia *genetica* che colpisce la retina, provocando cecità o grave danneggiamento della vista fin dalla infanzia (in genere l'esordio è nei primi sei mesi di vita). È la causa più frequente di cecità infantile ereditaria, con un'incidenza di 3 casi ogni 100.000 nati vivi. Oltre alla marcata *ipovisione*, un altro sintomo tipico è il *nistagmo*, cioè il movimento continuo e incontrollato degli occhi.

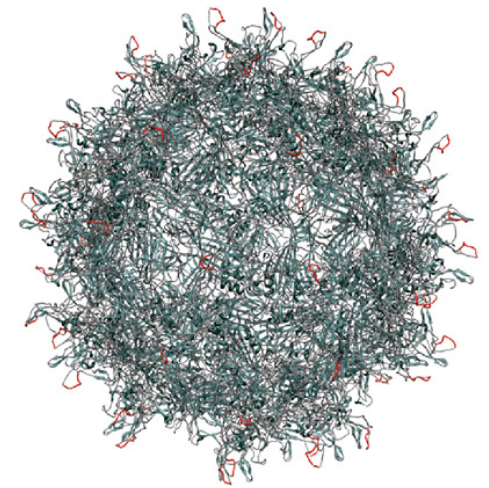
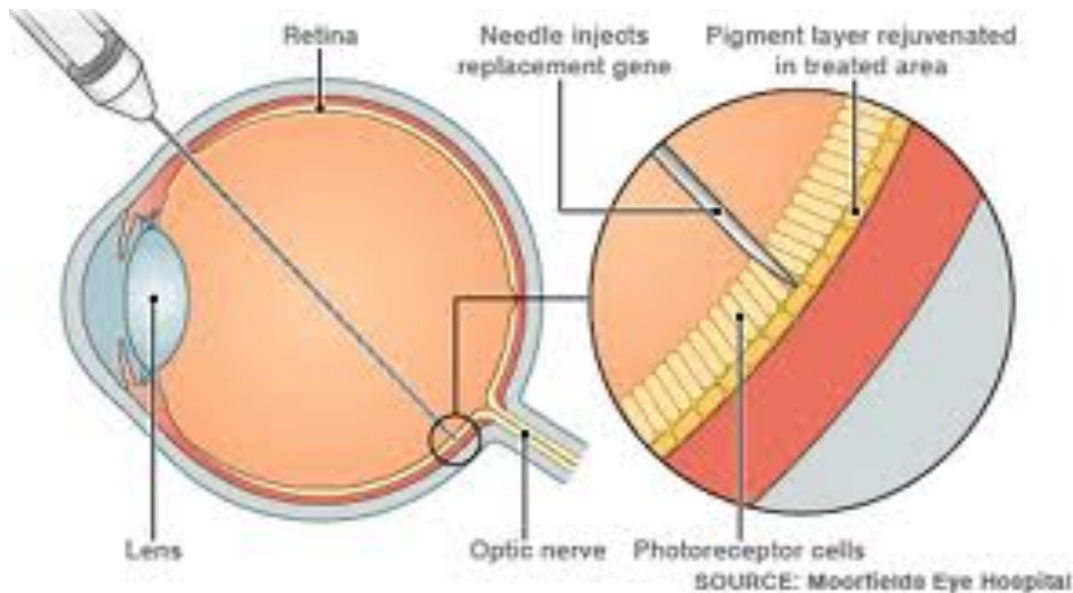


Diagram of the adeno-associated virus showing the proteins that decorate its coat. Berkeley researchers changed 10 amino acids in one of the coat proteins (orange) to get it to pass through retinal cells to the target photoreceptors.

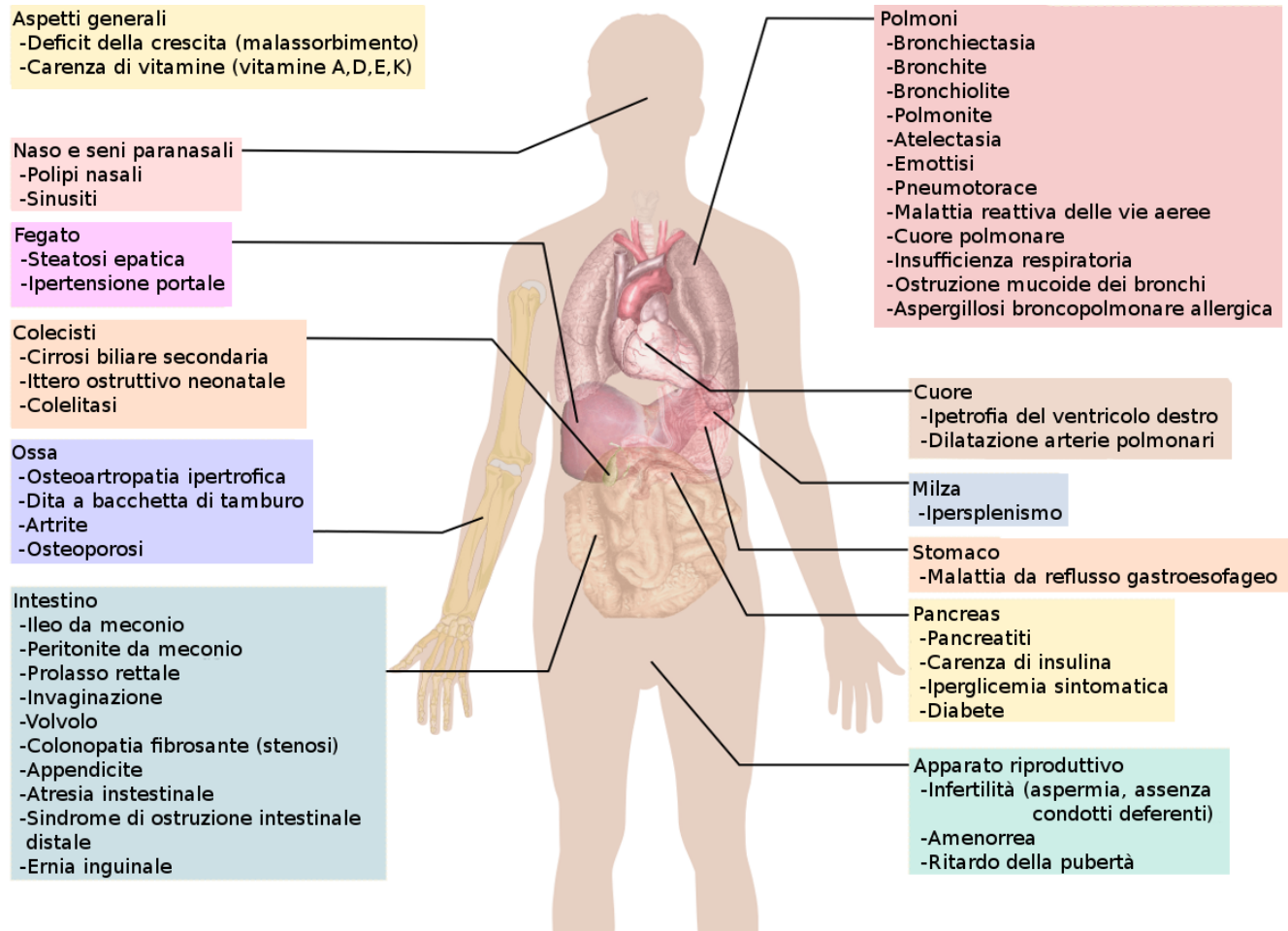


La terapia prevede la somministrazione del gene terapeutico tramite un vettore virale inoculato direttamente nell'occhio dei pazienti.

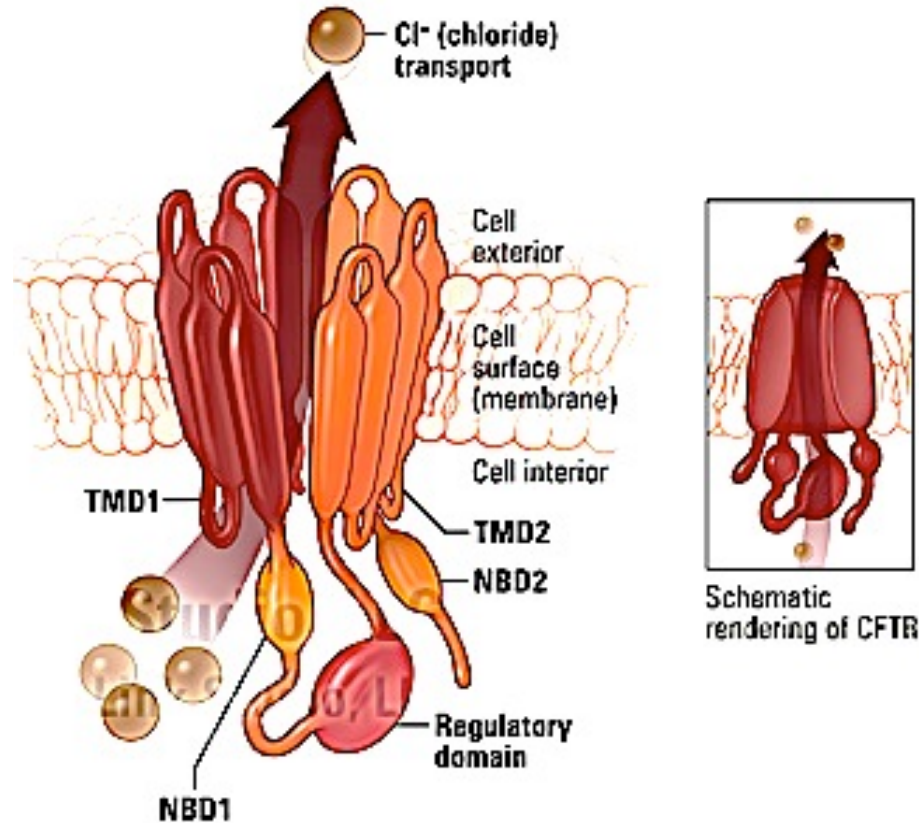


# La FIBROSI CISTICA

E' un disordine ereditario causato da una mutazione nel gene regolatore della conduttanza transmembrana (**CFTR**). Caratterizzata da un trasporto anormale di Cloro e Sodio attraverso l'epitelio che determina la produzione di secrezioni mucose spesse.



Il gene CFTR codifica per una proteina canale del cloro localizzata a livello apicale della membrana delle cellule epiteliali.

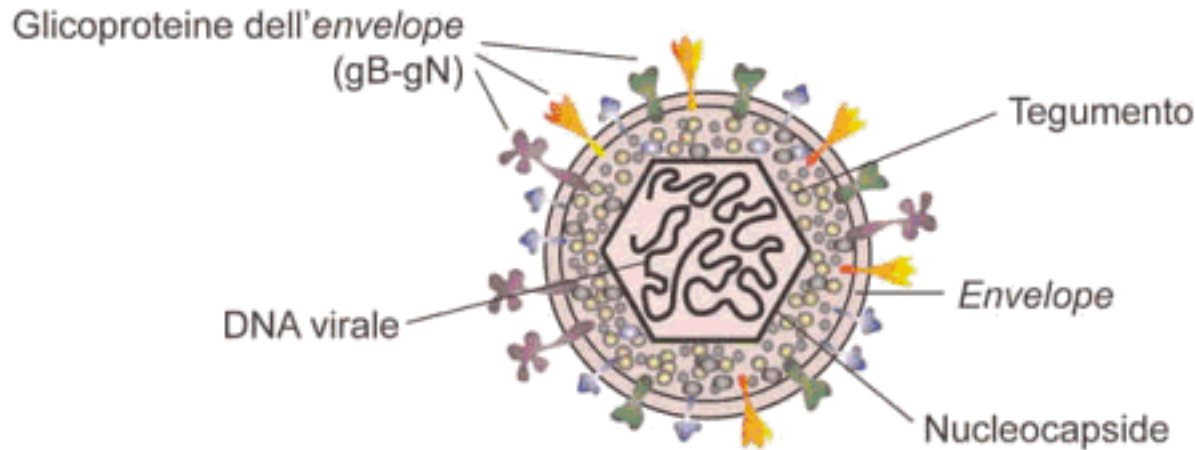


Vettori adenovirali umani E1-replicazione-deficienti che *esprimono* il gene CFTR. Ottimi risultati ottenuti in animali (espressione per almeno 6 settimane), *scarsi risultati nell'uomo* (espressione per 2-4 settimane).

#### Possibili spiegazioni:

- *muco* presente nel tratto respiratorio ostacola l'infezione virale
- il recettore riconosciuto dall'adenovirus si trova sulla membrana basolaterale delle cellule epiteliali
- alta immunogenicità
- la terapia prevede una somministrazione reiterata del vettore (1-2 volte al mese).

# VETTORI Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1)



Grazie alla loro naturale capacità di stabilire infezioni latenti nei neuroni, vengono utilizzati per il trasporto di geni nel CNS. L'espressione a lungo termine del transgene viene ottenuta utilizzando dei promotori neurone specifici, attivati durante il periodo di latenza.

Possono trasportare geni di grosse dimensioni (**152Kb**)!!!!

# VETTORI Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1)

Una delle maggiori limitazioni imposte dai vettori derivati da HSV-1 è legata al fatto che il virus *wild type* è altamente patogeno *in vivo*, e che la sua iniezione intracerebrale causa un'encefalite di solito fatale. Risulta quindi essenziale rimuovere gli elementi di patogenicità dal genoma virale prima di poter utilizzare il virus come vettore.

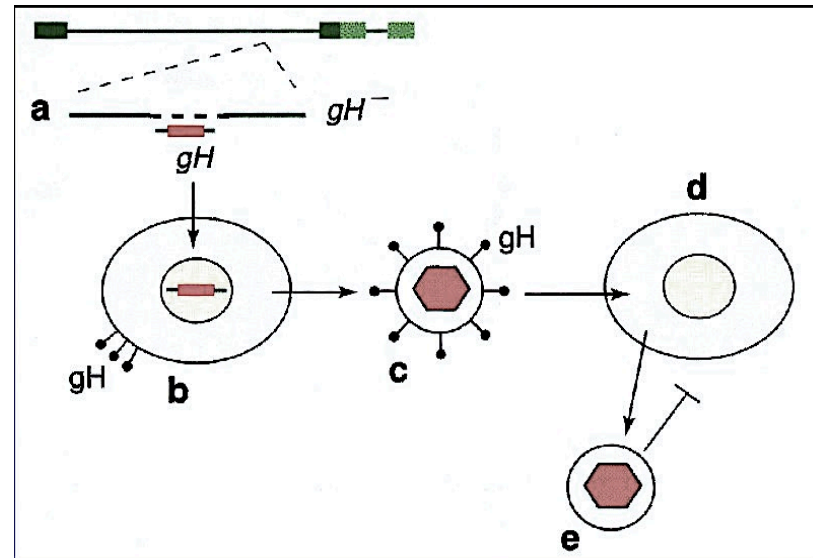
Esistono due tipi di vettori HSV-1:

1. *Disabled* HSV vectors
2. *Amplicon* HSV vectors

# 1. DISABLED HSV VECTORS

*The glycoproteins H and L (gH and gL) of herpes simplex virus type 1 are essential for the cell-to-cell spread of virions and for the penetration of virions into cells.*

I replication **disabled** vectors sono prodotti **eliminando** il gene che codifica per la glicoproteina-H di HSV-1 e cresciuti in una linea cellulare che complementa questa proteina. I virus ottenuti sono infettivi, ma possono effettuare un solo ciclo di infezione.



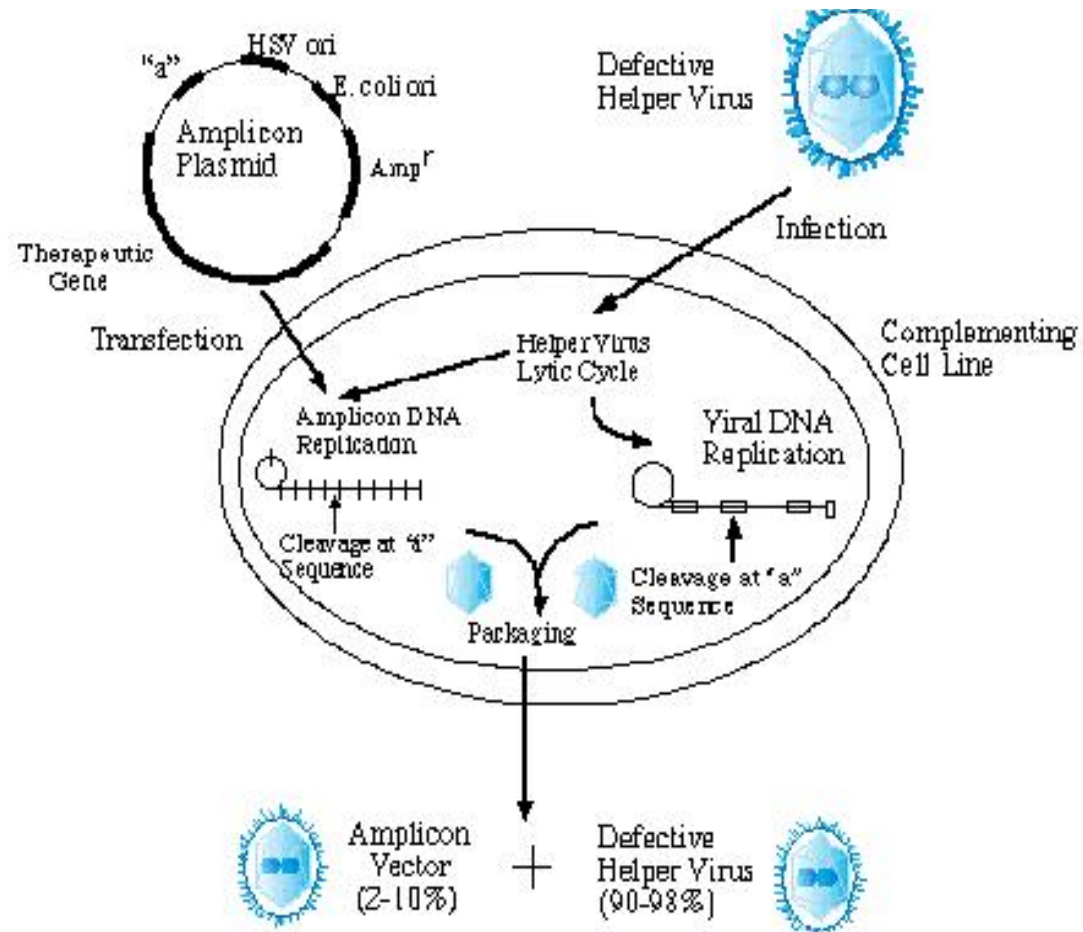
The resulting progeny are gH negative and noninfectious: **the virus is self-limiting!**  
Production of **vaccines**

## 2. AMPLICON HSV VECTORS

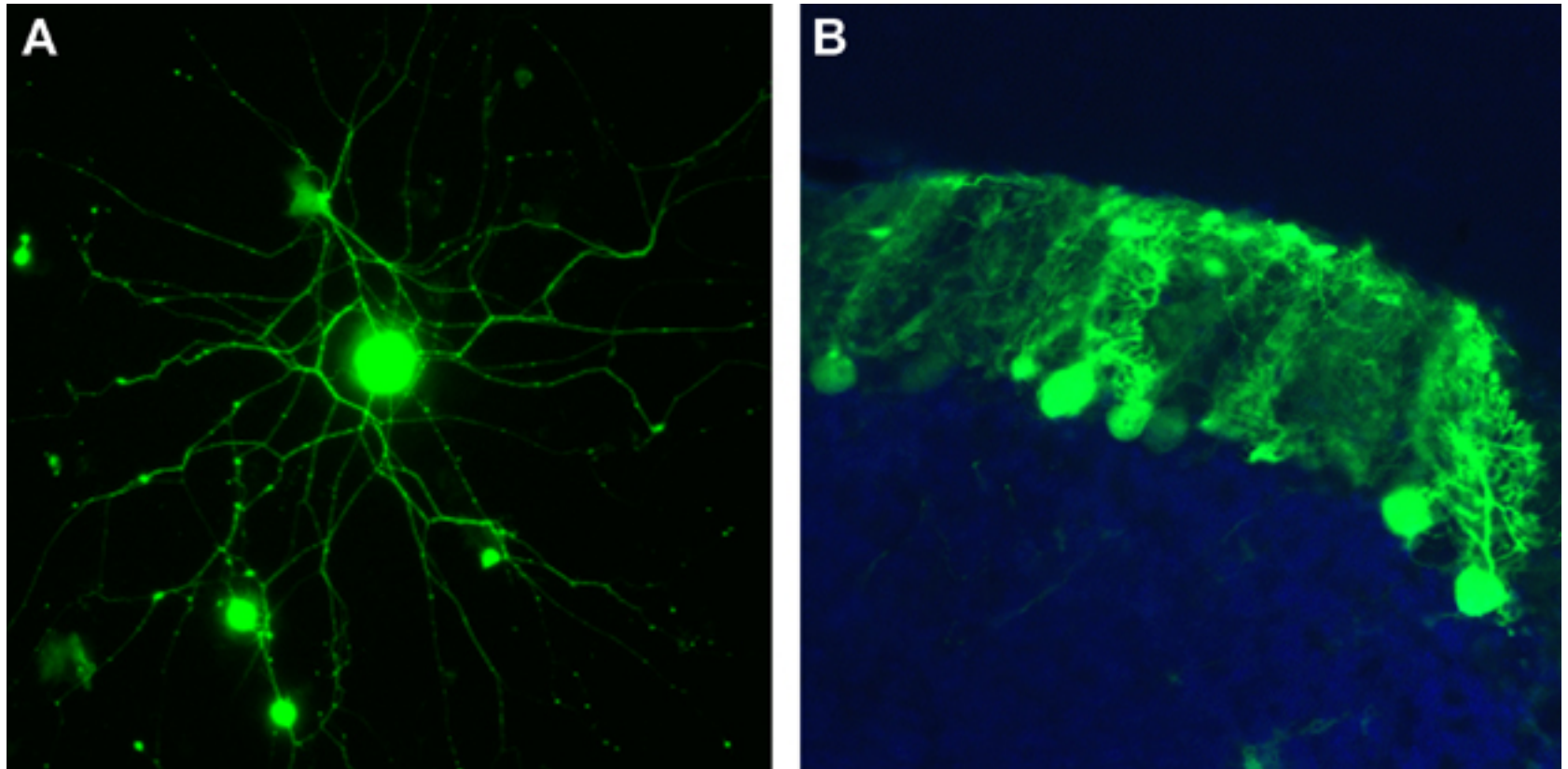
Si usa un amplicone, un plasmide contenente:

- un'origine di replicazione batterica (generalmente da Escherichia coli)
- un'origine di replicazione di HSV-1 (OriS)
- la sequenza di packaging di HSV-1
- il transgene

Il tutto viene inserito in una linea cellulare infettata da un virus helper contenente i geni regolatori e strutturali mancanti.



## 2. AMPLICON HSV VECTORS



Infection of neurons with HSV amplicon vector encoding GFP. **A** Sensory neurons in dissociated cultures of adult mouse. **B** cerebellar cortex of adult mice



# VIRUS ONCOLITICI: TRATTAMENTO DEL CANCRO

## 1) TUMORE-SELETTIVITA' INTRINSECA:

Si utilizzano dei virus che selettivamente lisano cellule tumorali.

Es:

Newcastle-disease virus (NDV)

Virus della stomatite vescicolare (VSV)

Virus a *RNA sensibili all'interferone* → non si riproducono nelle cellule normali.

# VIRUS ONCOLITICI: TRATTAMENTO DEL CANCRO

## 2) ATTENUAZIONE DEI VIRUS WT

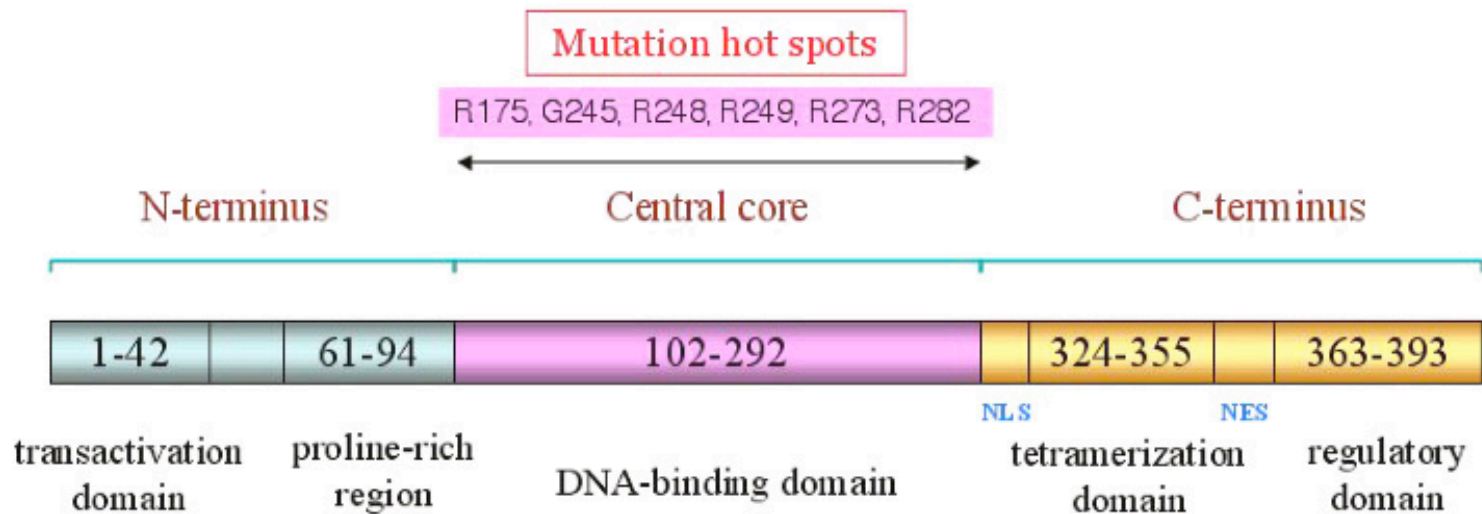
Vengono deleti alcuni geni virali essenziali per la replicazione, che sono poi complementati in trans solo nelle cellule tumorali → la replicazione è ristretta alle cellule tumorali

Es:

HSV privo del gene che codifica per la  **timidino chinasi**  e/o ribonucleotide riduttasi. Questi enzimi non vengono espressi nelle cellule quiescenti, ma vengono up-regolati in fase G1 e S (**generano i dNTPs necessari per la sintesi del DNA**) → virus replica solo nelle cellule in elevata proliferazione (tumorali).

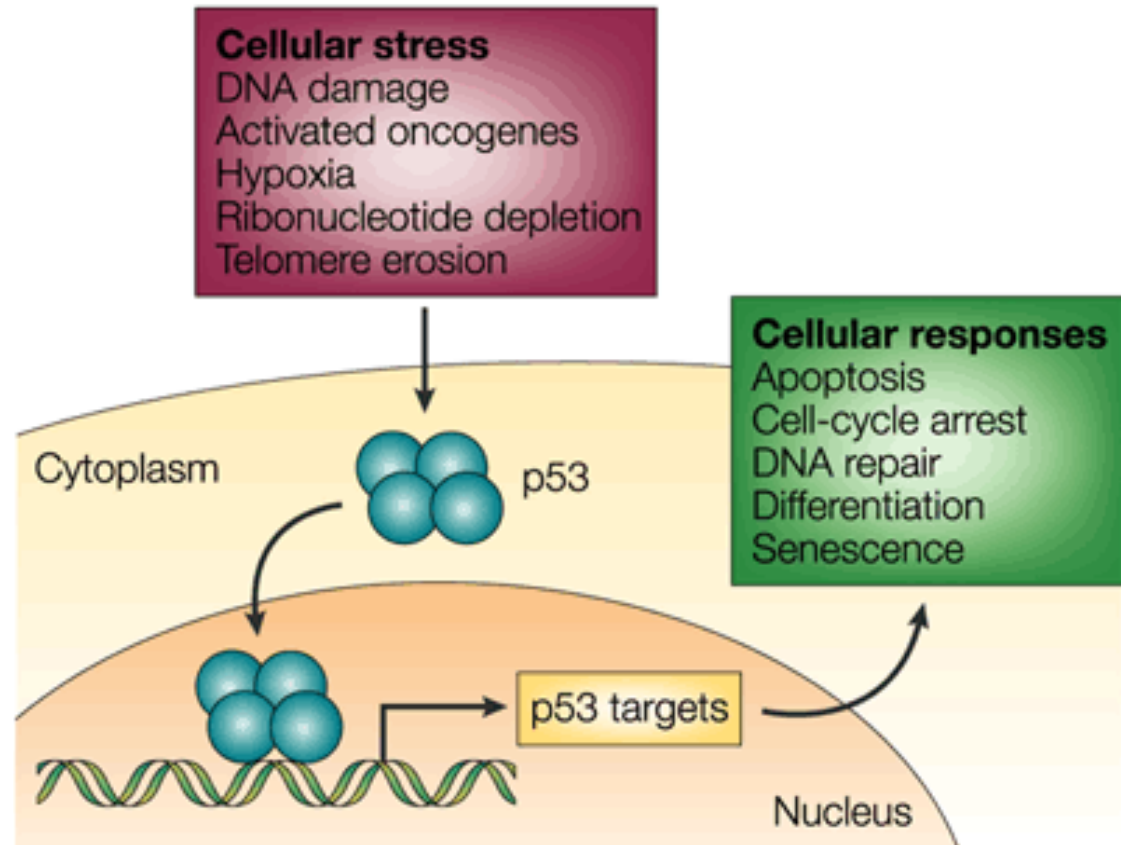
# p53: Structure, Function and Therapeutic Applications

Human p53 is a nuclear phosphoprotein of MW 53 kDa, encoded by a 20-Kb gene containing 11 exons and 10 introns [16], which is located on the small arm of chromosome 17. By the early 1990s, data from the first p53 knockout mice provided inarguable evidence in support of the potent tumor suppressor action of wt p53.



As a tumor suppressor, **p53** is essential for *preventing* inappropriate cell proliferation and maintaining genome integrity following genotoxic stress.

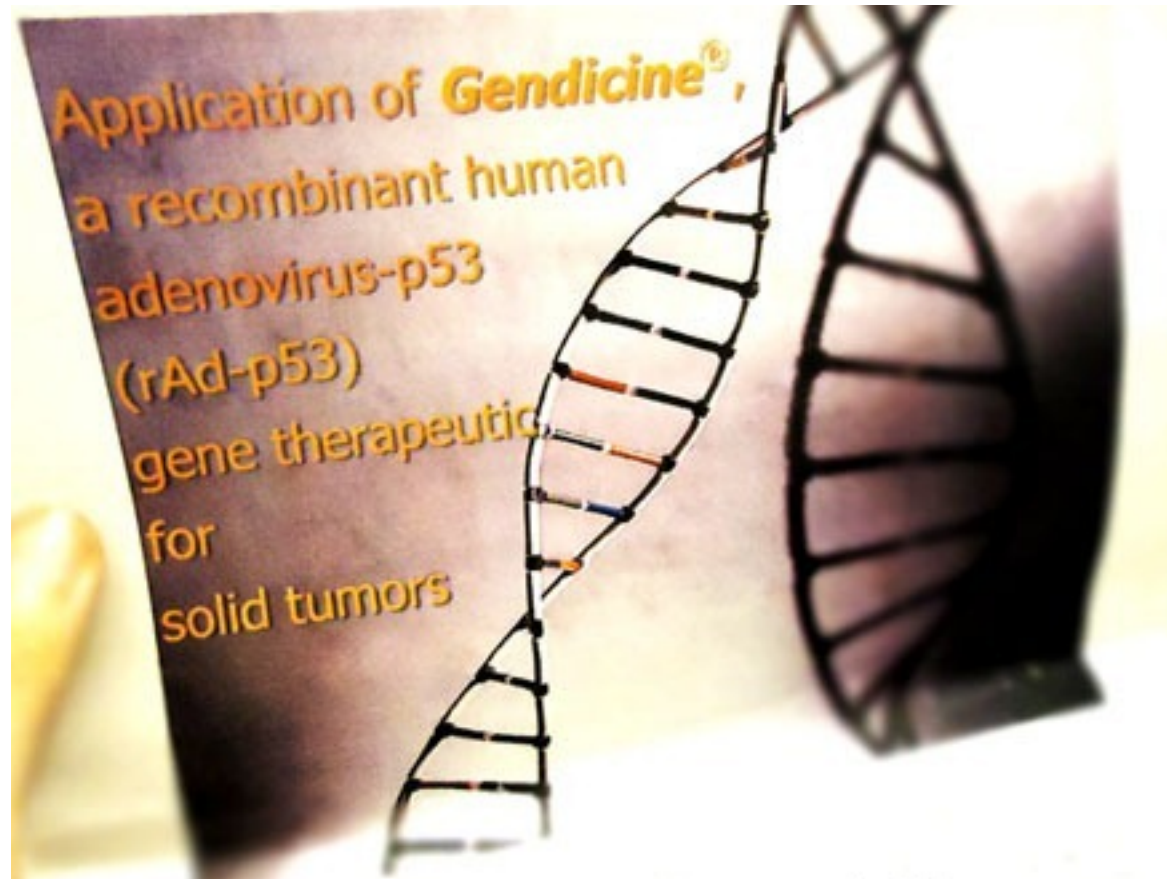
Following various intracellular and extracellular stimuli, such as DNA damage (by means including ionizing radiation, UV radiation, application of cytotoxic drugs or chemotherapeutic agents, and infectious virus), heat shock, hypoxia, and oncogene over-expression, **wt p53 is activated** and emerges as a pivotal regulatory protein which triggers diverse biological responses, both at the level of a single cell as well as in the whole organism.



Under normal circumstances, wt p53 is maintained at very low concentrations within the cells and exists mainly in an inactive latent form. The regulation of p53 level and activity involves a complex network of a multitude of cellular proteins.

**MDM2** *inhibits p53 activity by blocking its transcriptional activity, favoring its nuclear export and stimulating its degradation.* In normally growing cells, the half-life of p53 is limited to minutes, whereas cellular stress or exposure to DNA- damaging agents prolongs it to hours.

Diversi studi hanno dimostrato che, utilizzando vettori virali (*retrovirus* e *adenovirus*), l'introduzione di **p53 wt** mediante il rilascio virus mediato, **sopprime** la crescita di linee tumorali umane sia in sistemi *in vivo* che *in vitro*



# VIRUS ONCOLITICI: TRATTAMENTO DEL CANCRO

## 2) ATTENUAZIONE DEI VIRUS WT

Es.

- AV privo del gene che codifica per E1b-55K: **Onyx-015** (primo AV replicazione-selettivo entrato in trials clinici). La proteina E1b 55-kDa protein, lega p53 e la degrada. In seguito all'infezione con il virus attenuato, p53 viene stabilizzata portando ad arresto del ciclo cellulare (nelle cellule normali). In cellule tumorali difettive in p53 il virus continua a replicare portando alla lisi cellulare.

Trials clinici in fase I e II per il trattamento del carcinoma delle cellule squamose della testa e del collo (SCCHN).

Onyx-015 iniettato intratumoralmente:

Effetti collaterali: sintomi influenzali.

**20%** dei pazienti positivi alla replicazione virale, **14%** mostrano benefici

Onyx-015 iniettato intratumoralmente + chemioterapia:

**27%** dei pazienti mostrano completa eliminazione della massa tumorale; **36%** dei pazienti mostra riduzione del 50% del volume della massa tumorale. In *nessuno* dei pazienti che aveva mostrato risposta è ricomparso il tumore dopo 6 mesi, *mentre in tutti i pazienti sottoposti alla sola chemioterapia* si è osservata ricomparsa della massa tumorale

# VIRUS ONCOLITICI: TRATTAMENTO DEL CANCRO

## 3) TRASCRIPZIONAL TARGETING

I geni virali essenziali per la replicazione vengono posti sotto il controllo di promotori e/o enhancers cellulo-specifici

Es.

-AV replicazione-competenti in cui E1A e E1B sono posti sotto il controllo di **promotori prostata-specifici** (es. promotore per il PSA, antigene prostata-specifico, e/o per la probasina) sono usati per il trattamento del carcinoma prostatico.

-HSV con early genes posti sotto il controllo del promotore dell'albumina usati per il trattamento del **carcinoma del fegato**.



# VIRUS ONCOLITICI: TRATTAMENTO DEL CANCRO

## 4) CELLULAR TARGETING

Modificazione del tropismo virale mediante ingegnerizzazione delle proteine del coat.

Es.

-HSV-1 modificati: eliminazione delle glicoproteine B e C di superficie e inserimento dell'interleuchina 13 → virus che infettano selettivamente cellule che esprimono il recettore  $\alpha 2$  dell'interleuchina 13 (IL-13), come le cellule tumorali cerebrali.

# VIRUS ONCOLITICI: TRATTAMENTO DEL CANCRO

Table 2. Clinical trials with oncolytic viruses

Virus species	Virus	Administration	Cancer type	Stage of clinical development	Status	Refs or source
Adenovirus	Onyx-015	Intratumoral injection	Head and neck cancer	Phase II	Completed	[49]
		Intratumoral injection	Pancreatic cancer	Phase II	Completed	[51]
		Mouthwash	Oral dysplasia	Phase I	Completed	[52]
		Intraperitoneal injection	Ovarian cancer	Phase I	Completed	[53]
		Hepatic intraarterial infusion	Liver metastases of colorectal	Combined Phase I and Phase II	Completed	[54,55]
		Intravenous	Metastatic colorectal cancer	Phase II	Completed	[57]
	CV706	Intraprostatic injection	Prostate cancer	Phase I	Completed	[58]
Ad5-CD/TKrep	CG7870	Intraprostatic injection	Prostate cancer	Combined Phase I and Phase II	Ongoing	Cell Genesys <sup>a</sup>
		Intraprostatic injection	Prostate cancer	Phase I	Completed	[59,60]
Herpes simplex virus	G207	Intratumoral injection	Glioma	Phase I	Completed	[61]
	NV1020	Hepatic intraarterial infusion	Liver metastases of colorectal cancer	Combined Phase I and Phase II	Ongoing	[62], MediGene AG <sup>b</sup>
	HSV1716	Intratumoral injection	Glioma	Phase I	Completed	[64]
		Intratumoral injection	Metastatic melanoma	Pilot study	Completed	[65]
	OncoVEX	Injection into skin metastases	Skin metastases of solid cancers	Phase I	Ongoing	BioVex <sup>c</sup>
Newcastle disease virus	MTH-68	Intravenous	Glioma	Pilot study	Completed	[66]
	PV701	Intravenous	Advanced solid cancers	Phase I	Completed	[67]
Reovirus	Reolysin	Intratumoral	Skin metastases of solid cancers	Phase I	Completed	Oncolytics Biotech <sup>d</sup>
		Intratumoral	Prostate cancer	Phase I	Completed	
		Intratumoral	Glioma	Phase I	Ongoing	
		Intravenous	Advanced solid cancers	Phase I	Ongoing	

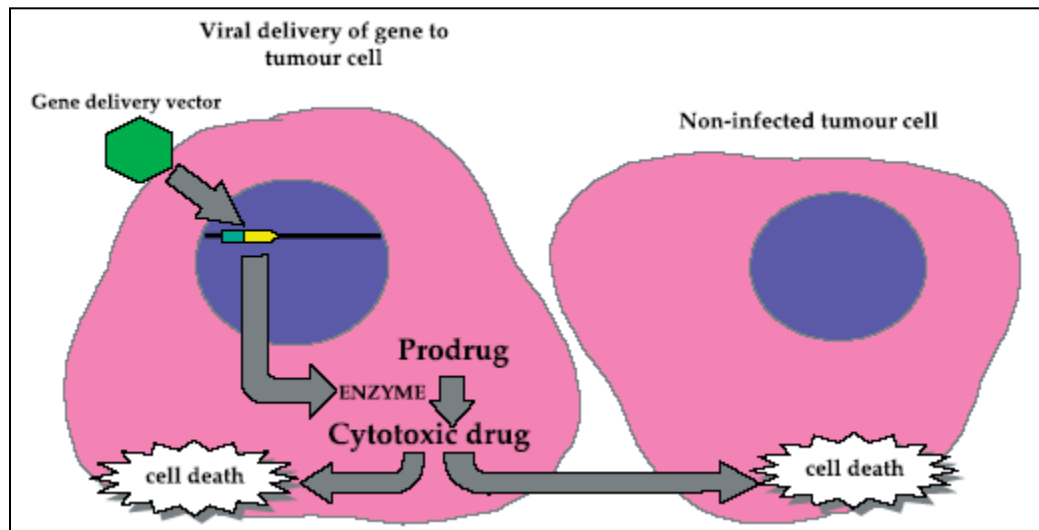
<sup>a</sup><http://www.cellgenesys.com>; <sup>b</sup><http://www.medigene.com>; <sup>c</sup><http://www.biovex.com>; <sup>d</sup><http://www.oncolyticsbiotech.com>.

# VIRUS-DIRECTED ENZYME PRODRUG THERAPY (VDEPT)

## o TERAPIA DEL GENE SUICIDA: TRATTAMENTO DEL CANCRO

Si basa sulla somministrazione di un agente chemioterapico in forma di pro-farmaco (non tossico), combinata con l'espressione cellula-tumorale specifica dell'enzima capace di convertirlo nella forma tossica. L'enzima viene veicolato mediante un vettore virale.

*N.B. la forma attiva dell'agente chemioterapico deve avere una tossicità elevata, per ottenere un EFFETTO BYSTANDER, e un emivita breve, per minimizzare la tossicità sistemica.*



# VIRUS-DIRECTED ENZYME PRODRUG THERAPY (VDEPT)

## o TERAPIA DEL GENE SUICIDA: TRATTAMENTO DEL CANCRO

Es.

### 1) SISTEMA TIMIDINO CHINASI-GANCICLOVIR:

vettore retrovirale che esprime l'enzima timidino chinasi di HSV “somministrato” *in situ* in tumori cerebrali.

### 2) SISTEMA CITOSINA DEAMINASI-5-FLUOROCITOSINA

sperimentazione in corso per il trattamento del tumore al seno.

### 3) SISTEMA NITROTIROSINA-CB1954

### 3) SISTEMA NITROTIROSINA-CB1954 (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide)

VOLUME 22 · NUMBER 9 · MAY 1 2004

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

ORIGINAL REPORT

## Virus-Directed Enzyme Prodrug Therapy: Intratumoral Administration of a Replication-Deficient Adenovirus Encoding Nitroreductase to Patients With Resectable Liver Cancer

Daniel H. Palmer, Vivien Mautner, Darius Mirza, Simon Oliff, Winald Gerritsen, Joost R.M. van der Sijp, Stefan Hubscher, Gary Reynolds, Sarah Bonney, Ratna Rajaratnam, Diana Hull, Mark Horne, John Ellis, Andrew Mountain, Simon Hill, Peter A. Harris, Peter F. Searle, Lawrence S. Young, Nicholas D. James, and David J. Kerr

CB1954 viene convertito da una forma alchilica monofunzionale debolmente tossica ad una forma alchilica bifunzionale molto tossica, per azione dell'enzima NITROREDUTTASI codificata dal gene *nfsB* di *Escherichia coli* B.

Vettore adenovirale umano (sierotipo 5) replicazione deficiente (deleto in E1 e E3) che contiene il gene *nfsB* sotto il controllo di un promotore specifico.

#### *Vantaggi:*

- la forma attiva di CB1954 diffonde attraverso la membrana senza bisogno di gap junction → maggiore effetto bystander;
- indipendenza dal ciclo cellulare;
- CB1954 può essere attivato solo all'interno della cellula (necessita di un cofattore)  
→ rischio ridotto di tossicità.

# Situazione attuale e prospettive future

- Sperimentazione clinica iniziata nel 1990
  - eccessivo ottimismo
- Valutazione generale da parte del NIH nel 1995
  - **LA TERAPIA GENICA NON FUNZIONA**
    - il potenziale terapeutico con i mezzi allora a disposizione era stato sovrastimato;
    - le basi scientifiche nel settore non erano sufficientemente solide;
    - occorreva lavorare molto sulla costruzione di nuovi vettori, sulla efficienza della loro somministrazione e sulla regolazione dell'espressione del transgene
- 1995-2002: generazione e ottimizzazione di vettori di TG
  - prime evidenze (anche se preliminari) di efficacia terapeutica per la emofilia B (vettori AAV) e per la X-SCID (vettori retrovirali)
- Prospettive future
  - il continuo miglioramento dei vettori disponibili si tradurrà in un aumento dei successi in campo clinico

## **PROGRESS AND PROBLEMS WITH THE USE OF VIRAL VECTORS FOR GENE THERAPY**

Clare E. Thomas, Anja Ehrhardt and Mark A. Kay

Nature reviews. Genetics 2003 Vol: 4(5):346-358. [DOI: 10.1038/nrg1066](https://doi.org/10.1038/nrg1066)