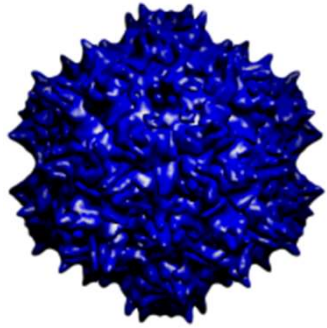




Vectors virals adenoassociats

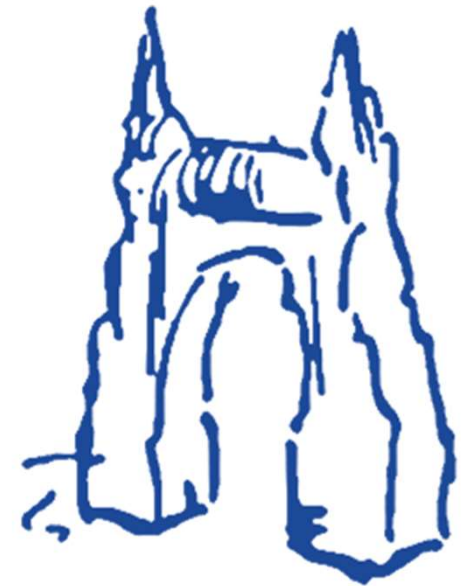
Medicaments de teràpies avançades

Dra. Laia Vilà Prats

Professora Lectora
Departament de Farmacologia, Toxicologia i
Química Terapèutica
Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia



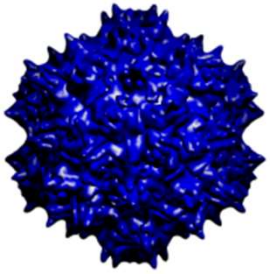
UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Índex

- Què són els vectors virals adenoassociats o AAVs?
- Quins factors cal tenir en compte per a incrementar eficiència?
- Estudis específics en medicaments de teràpies avançades basats en AAVs quan arriben als assaigs clínics
- Exemples d'estudis de recerca bàsica utilitzant AAVs

Biologia dels virus Adenoassociats



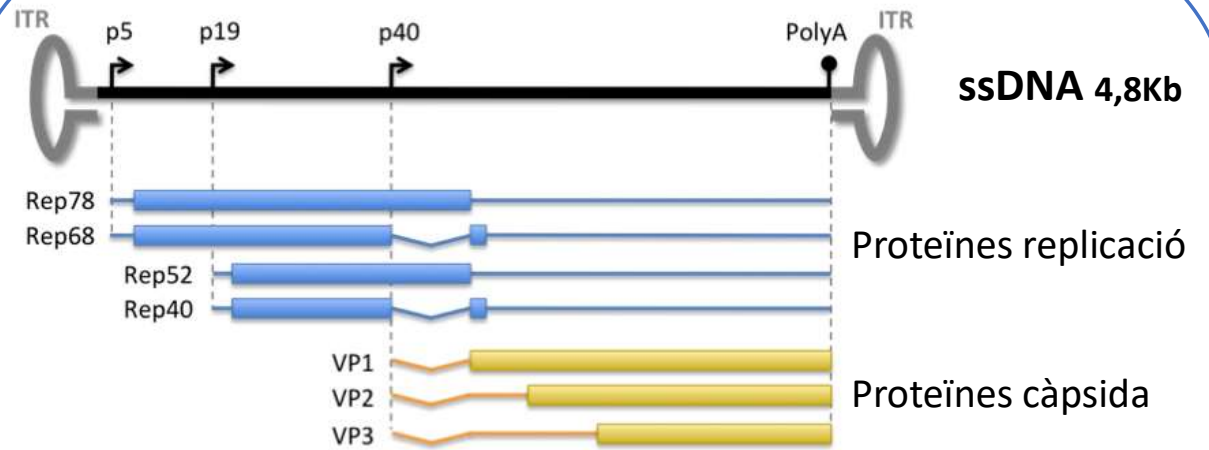
Família *Parvoviridae*
Gènere Dependovirus



- No patògens en humans
- No autònoms: necessiten un virus auxiliar per a completar el seu cicle vital
- Genoma viral roman episomal



Seguretat

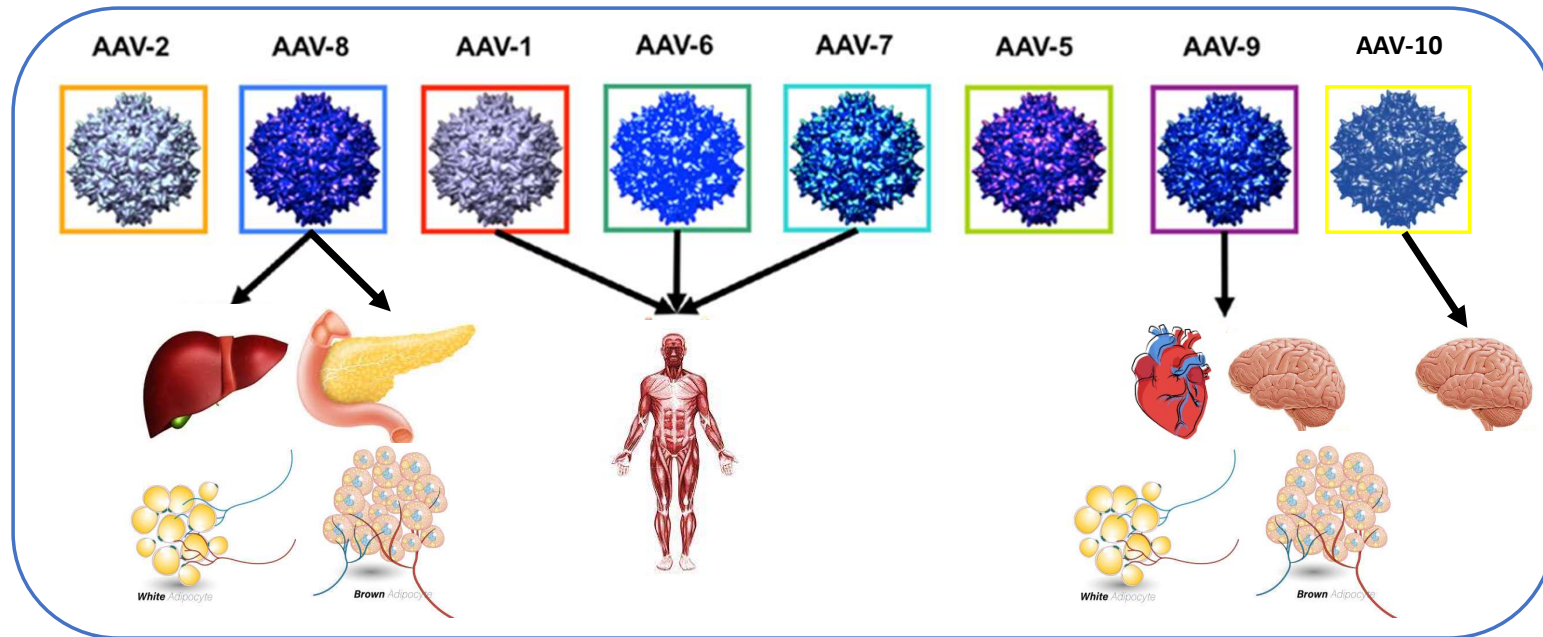


Existeixen diferents serotips amb diferent tropisme



Diferent afinitat per receptors cel·lulars

Biologia dels virus Adenoassociats - Serotips

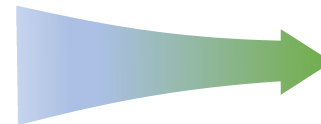


AAV9 capaç de creuar la barrera hematoencefàlica

Seguretat



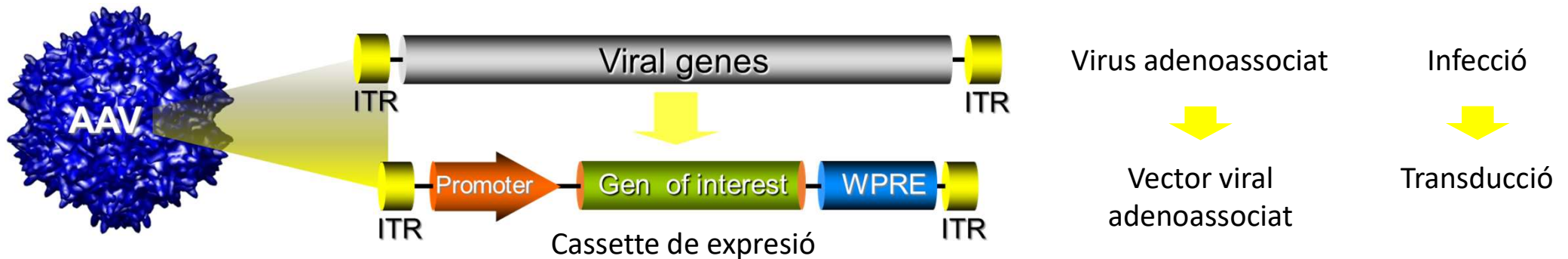
Diferents serotips



Bon candidat com a vector viral
per a teràpia gènica

Vectors Virals recombinants Adenoassociats (rAAV)

¿Què hem de fer per a que un virus adenoassociat es converteixi en un AAV?



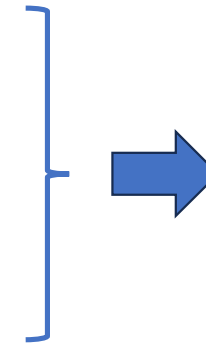
- **Transducció de cèl·lules quiescents i en divisió**
- **Expressió a llarg termini (fins a 10 anys) amb tan sols un únic tractament**
- **Es poden obtenir preparacions en concentracions elevades**
- **Baixa capacitat de clonació (4.7 Kb)**

ITR: Inverted terminal repeats

Teràpia gènica amb rAAV

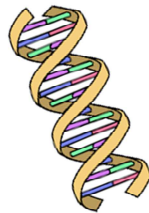
¿Quins objectius podem aconseguir amb l'ús de AAV?

- Introduir nous gens
- Modular l'expressió de gens existents (incrementar, disminuir o silenciar)
- Corretgir la seqüència amb edició gènica (Zincfinger nucleases, CRISPCas...)

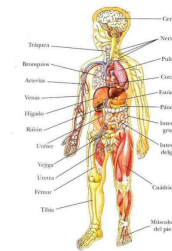


En les cèl·lules o teixits diana amb la finalitat de prevenir o curar una malaltia

Els primers paràmetres que hem de definir per a tractar una malaltia mitjançant una estratègia de teràpia gènica són:

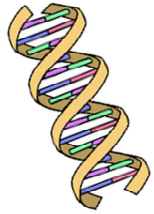


El gen d'interès



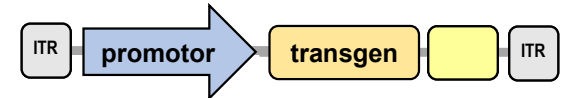
Cèl·lules o teixit diana

Selecció del gen d'interès



El gen d'interès

Sobreexpressió

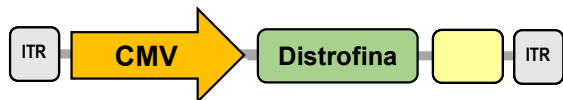


Introduir la seqüència d'ADN del gen que codifica per la proteïna que volem sobreexpressar

Malalties **monogèniques**
on no es produeix una proteïna o es
produeix una proteïna no funcional



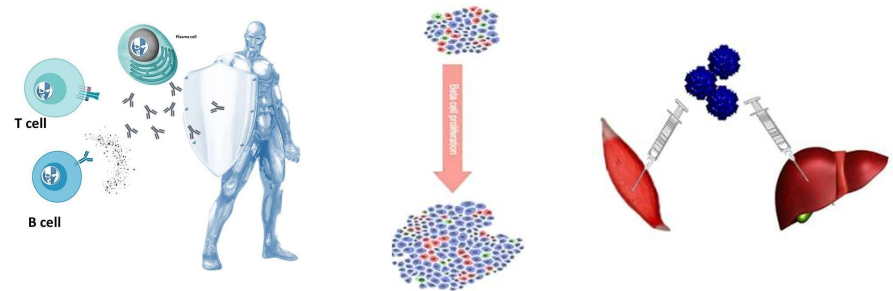
Expressió còpia corregida del gen deficient



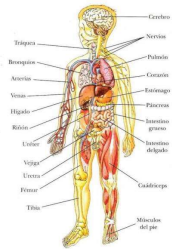
Malalties **complexes**



No hi ha un únic gen responsable (Ex. DM1)



Selecció de cèl·lules o teixits diana



Cèl·lules o teixit diana

Proteïna NO secretable

Transducció teixits que requereixen
l'expressió del transgèn



Transducció el més restringida possible per
a evitar efectes secundaris indesitjables

Proteïna secretable

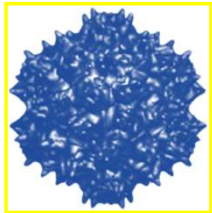
Teixit que produeix la proteïna
de forma natural

o

Teixits amb capacitat de
sintetitzar i secretar proteïnes
fàcilment accessibles



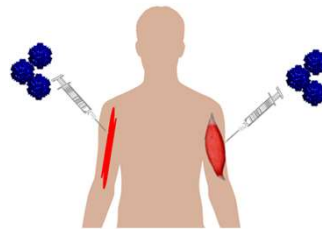
Factors per incrementar l'especificitat tissular



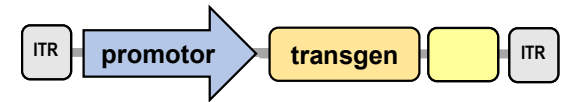
**Serotip
AAV**



Que la major part de partícules virals
arribin al teixit diana



Via d'administració

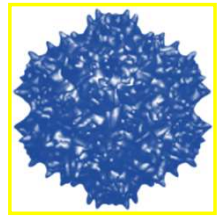


**Seqüència
Cassette d'expressió**

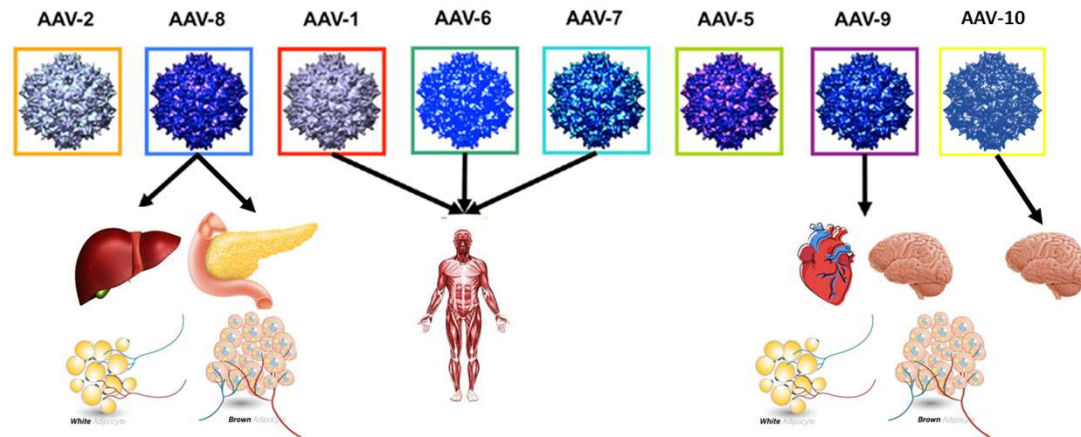


Que el gen d'interès s'expressi en
els teixits que ens interessin

Factors per incrementar l'especificitat tissular

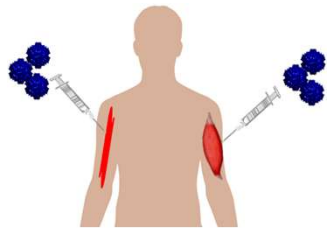


Serotip
AAV



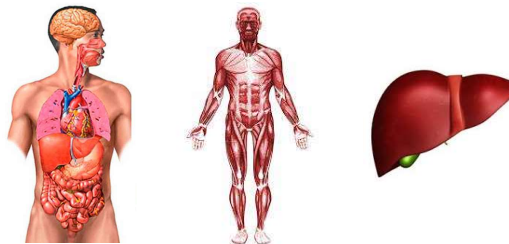
Serotips modificats
genèticament

AAVMYO3
AAVLK03

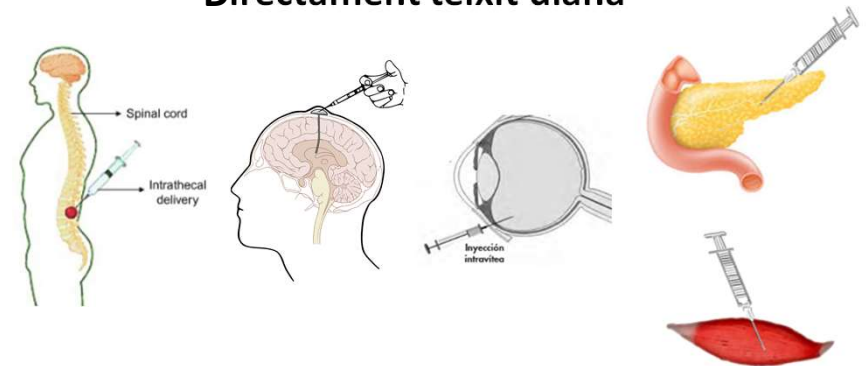


Via d'administració

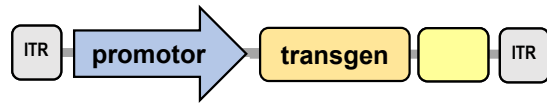
Intravenosa
torrent sanguini



Directament teixit diana



Factors per incrementar l'especificitat tissular



**Seqüència
Cassette d'expressió**

Promotors: regió d'ADN proximal a un gen que regula la seva expressió

Ubics: s'expressen en tots els tipus cel·lulars

- CMV, CAG, RSV...



Fets, permeten reduir dosi d'AAV però poden ser tòxics

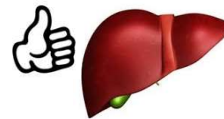
Específics de teixit

- Fetge: hAAT, albumina
- Skm: desmina, creatina cinasa
- Neurones: Synapsin
- Teixit adipós: Ucp1, adiponectina

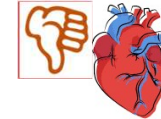


Evitar efectes indesitjats en altres teixits

Sobreexpressió Sirt1



Reducció lípids i inflamació



Baixa funció cardíaca



Depressió ansietat

Medicaments de teràpies avançades



Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP)

 agencia española de
medicamentos y
productos sanitarios



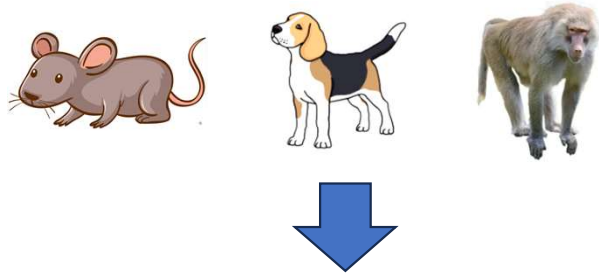
- Elevats requisits de qualitat, eficàcia i seguretat
- Segueixen la mateixa normativa d'assaigs clínics que els fàrmacs convencionals, amb algun estudi addicional degut a la pròpia naturalesa dels AAVs

Estudis de Farmacocinètica amb AAVs

Biodistribució: *in vivo* distribució, persistència i eliminació de l'AAV des del punt d'injecció a la resta de teixits

Difícil en persones, només n'hi ha un complet en un pacient injectat amb un AAV9 que va morir per causes alienes al tractament

Es realitza en estudis preclínics



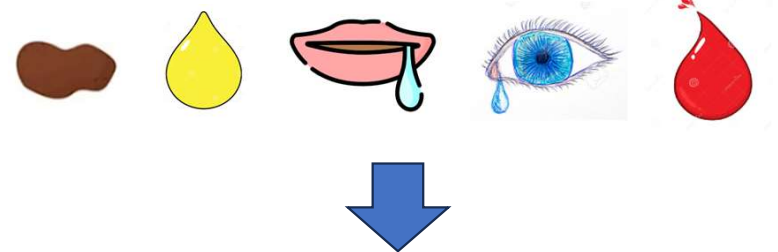
Anàlisi còpies vg en diferents teixits per qPCR

Excreció (Shedding) del vector viral a través de

- Femta
- fluids corporals: orina, saliva, fluids nasals, llàgrimes, suor
- Sang
- semen

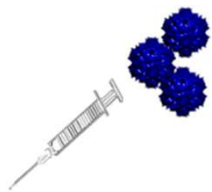
Per a saber si poden afectar a altres persones o al medi ambient

Prendre mostres durant els 3 primers mesos post-tractament



Anàlisi còpies vg per qPCR

Estudis de Farmacodinàmica amb AAVs – Dosi/Exposició/Resposta



Dosi d'AAV ÚNICA

Escalat de dosi de l'animal a l'humà és complex.

S'estableix durant les fases I/II i III de l'assaig clínic

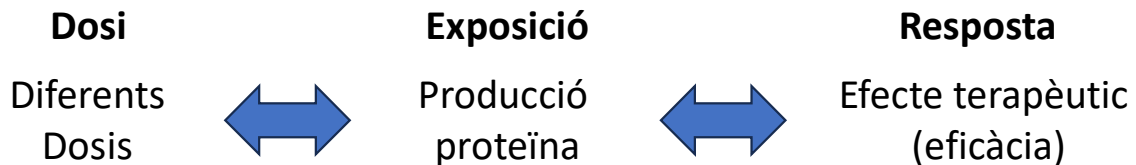
Risc/benefici

Injecció IV

No es recomana superar 10^{14} vg/Kg



Evitar efectes adversos graves (hepatotoxicitat, microangiopaties trombóticas)



No sempre pot ser analitzada
No accés a biòpsia del teixit

Hemofília A

Proteïna secretable (Factor VIII)

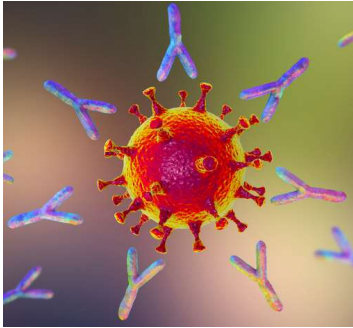
Avaluació concentració Factor VIII en sang
+ nº hemorràgies en un any

Atrofia Muscular Espinal

Teixit transduït SN central i perifèrica
Proteïna no es pot quantificar

Avaluació de la funció motora

Anàlisi d'anticossos neutralitzants (NAb)



Un anticòs neutralitzant (NAb) és un anticòs que defensa una cèl·lula d'un patògen o partícula infecciosa neutralitzant qualsevol efecte biològic que tingui



Són el resultat d'haver passat algunes malalties i de l'administració de vacunes

Pacients amb elevats títols de NAb són exclosos dels assaigs clínics



Los NAb destrueixen els AAVs i el tractament de teràpia gènica queda sense efecte

Pocs dies després del tractament amb AAVs, es comencen a produir NAb



No permet readministració
Reactivitat creuada serotips

S'estan buscant alternatives

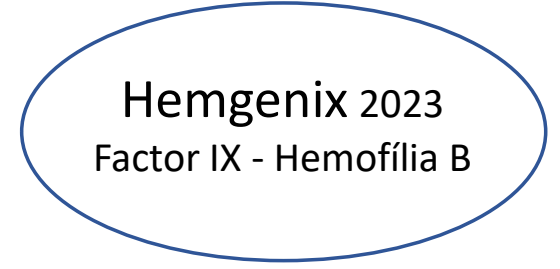


Plasmafèresis
Disseny de Càpsides
Via d'administració no IV

Teràpies amb AAVs aprovades per l'EMA



**Advanced Therapy
Medicinal Products (ATMP)**

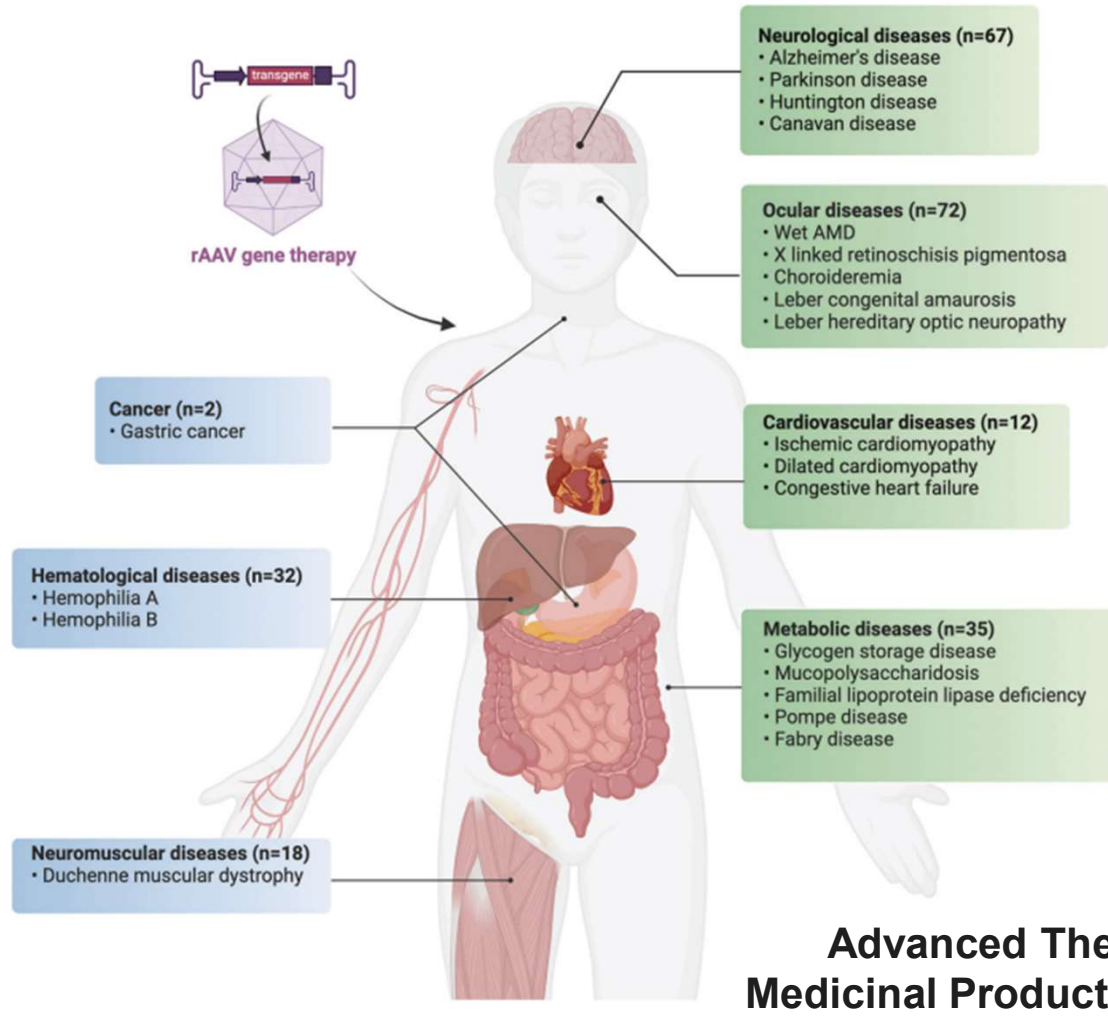


Tractament de malalties
rars monogèniques

Ofereixen noves oportunitats a pacients amb
malalties que no tenen cura o que no tenen
tractaments prou eficaços



Teràpies avançades amb AAVs en estudis clínics



238 clinical trials employing
rAAV-based gene therapy



Catalunya és referent en la participació en **assaigs clínics en teràpies avançades**, es situa en la cinquena posició a Europa i la vuitena del món



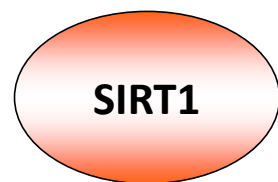
Exemples estudis de recerca amb estratègies de teràpia gènica basades en AAVs



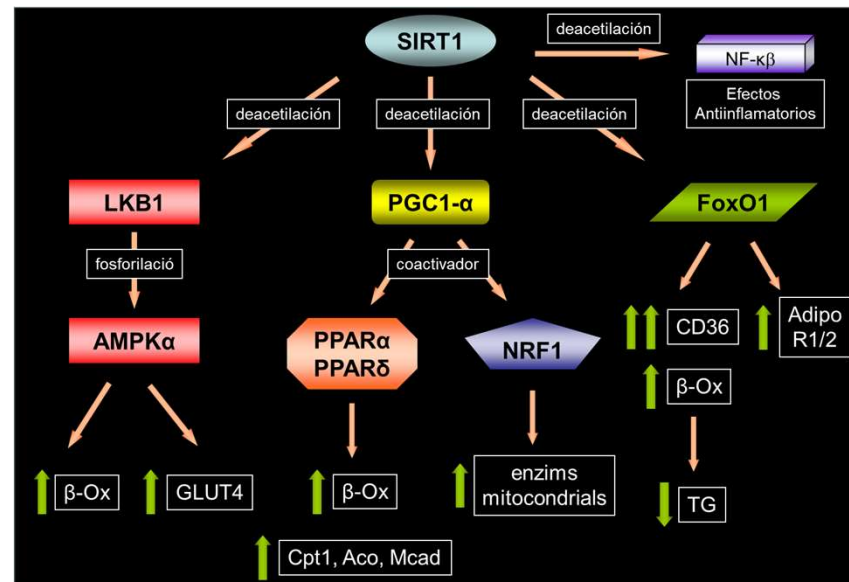
Estudis amb teràpia gènica pel tractament del fetge gras i la resistència a la insulina



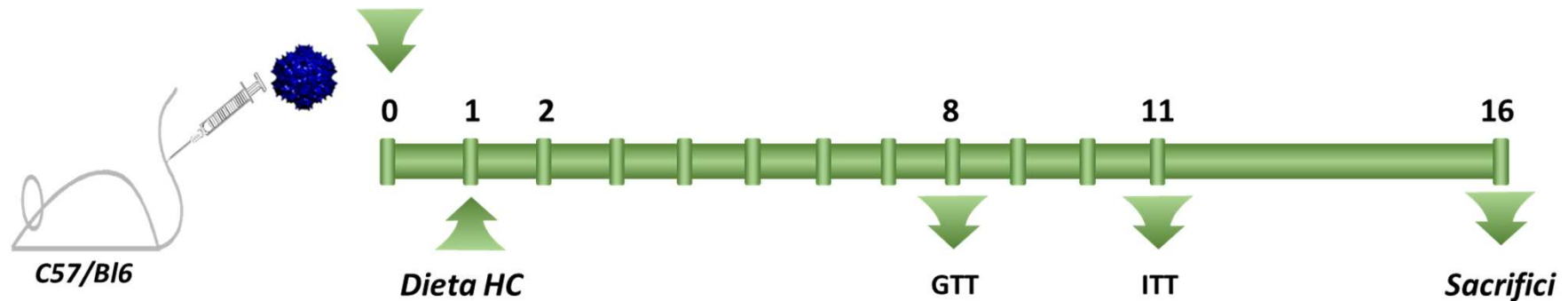
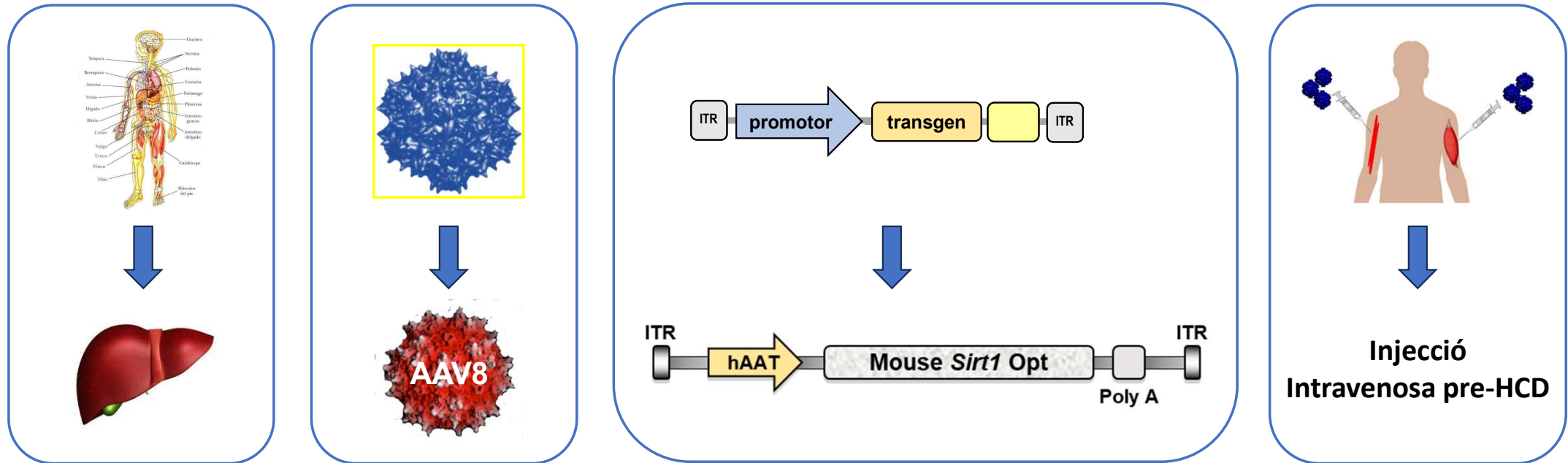
Incrementar la capacitat oxidativa del fetge per a reduir l'acumulació lipídica i així evitar l'aparició o revertir la resistència a la insulina



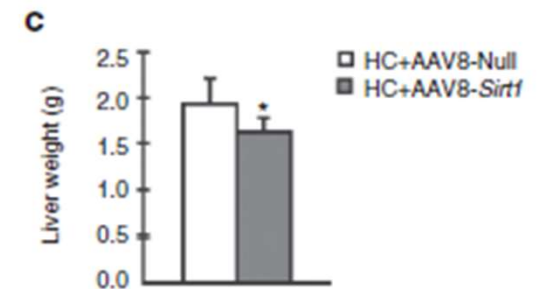
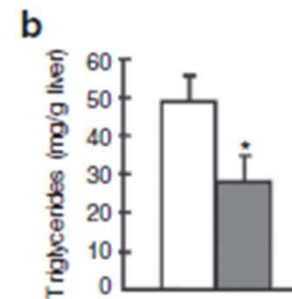
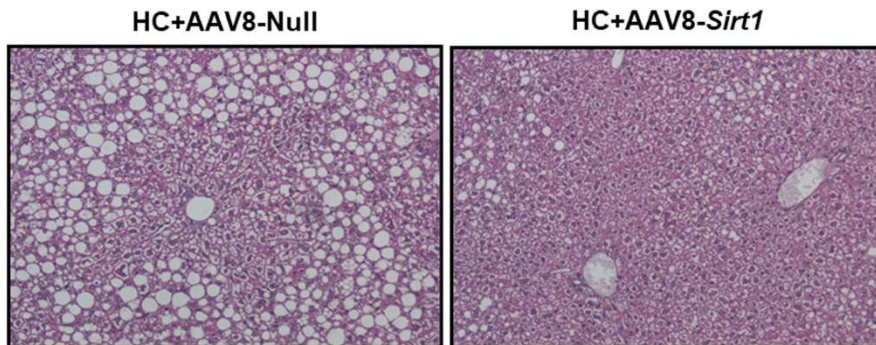
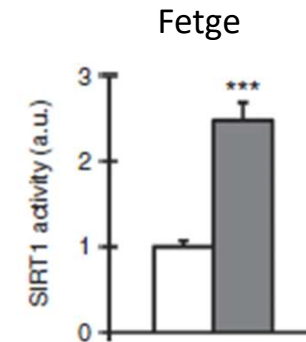
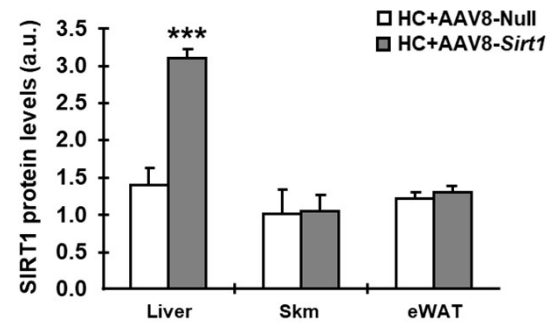
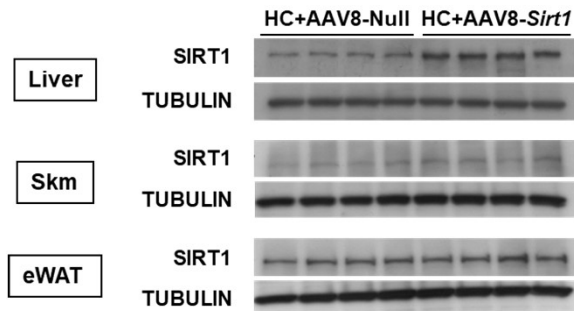
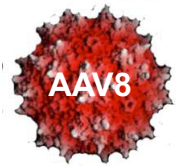
Sobreexpressió



Selecció de paràmetres per a incrementar l'especificitat tissular

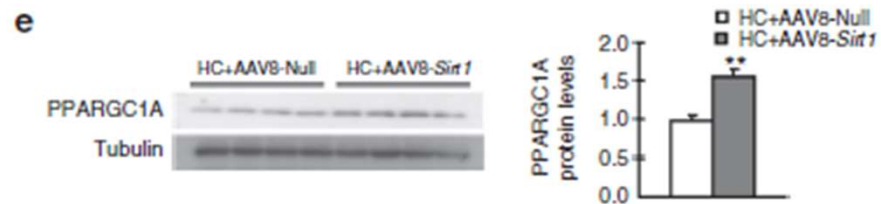
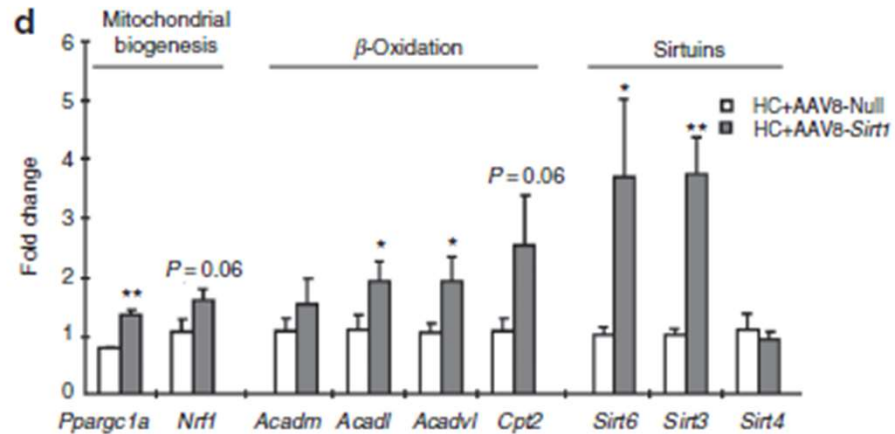


Sobreexpressió hepàtica de Sirt1: menor acumulació lipídica

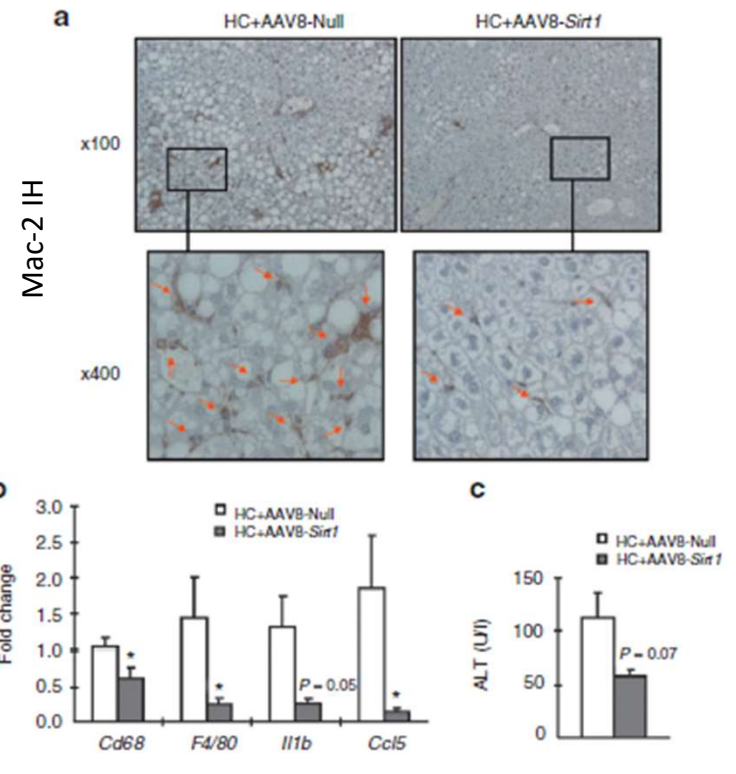


Acumulació lipídica en el fetge

Sobreexpressió hepàtica de Sirt1: reducció inflamació hepàtica

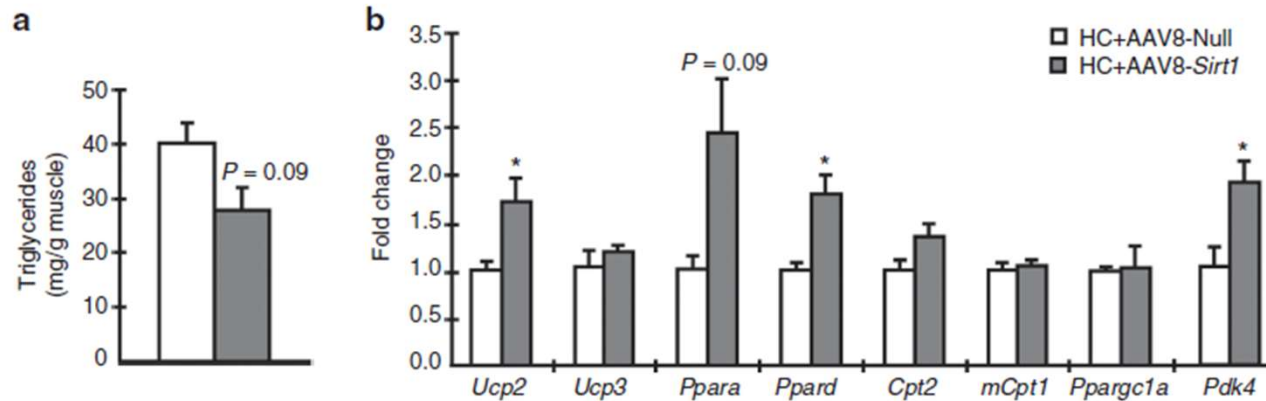


↑ Expressió gens catabolisme AG

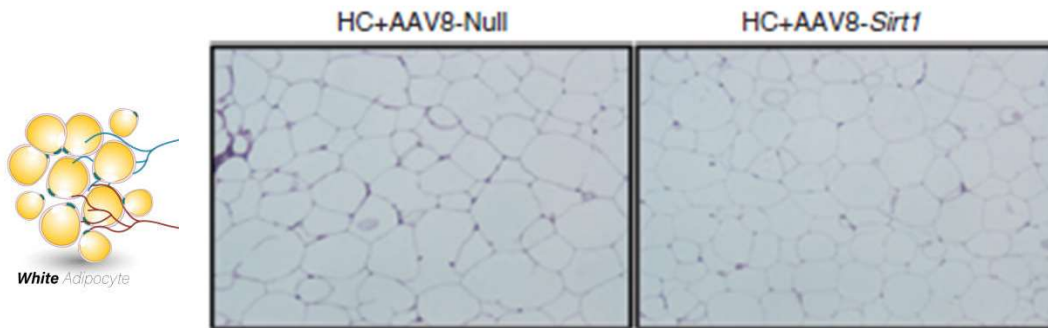


↓ Infiltració i inflamació en el fetge

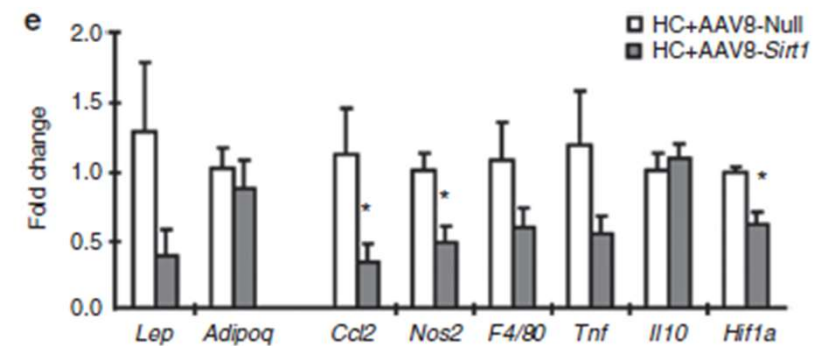
Efectes en altres teixits metabòlicament actius



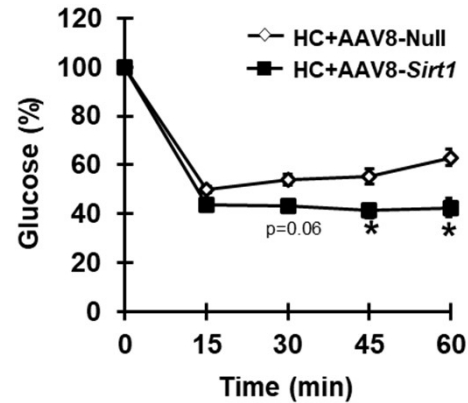
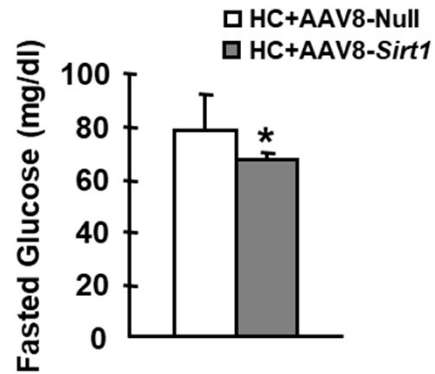
Menor acúmul lipídic
en múscul esquelètic



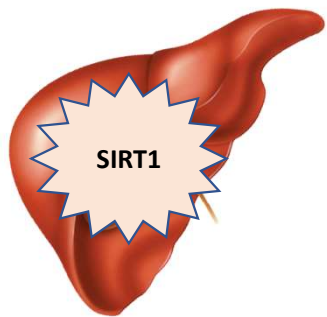
Reducció atròfia i inflamació en el teixit adipós



La sobreexpressió hepàtica de Sirt1 millora la sensibilitat a la insulina



ITT - Sensibilidad a la insulina



- ↓ Hepatic steatosis and inflammation
- ↓ Inflammation in WAT
- ↑ Lipid oxidation in skeletal muscle
- ↑ Insulin sensitivity

Citation: Molecular Therapy — Methods & Clinical Development (2014) 1, 14039; doi:10.1038/mtm.2014.39
© 2014 The American Society of Gene & Cell Therapy All rights reserved 2329-0501/14



ARTICLE

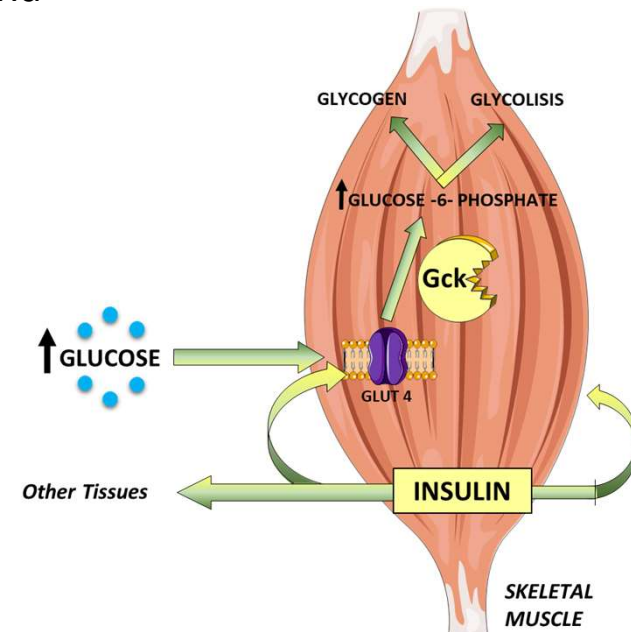
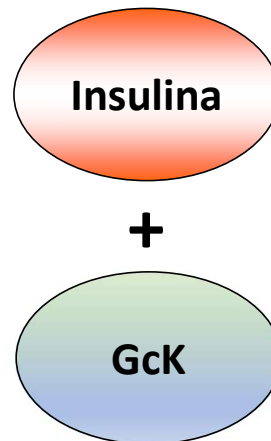
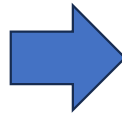
AAV8-mediated *Sirt1* gene transfer to the liver prevents high carbohydrate diet-induced nonalcoholic fatty liver disease

Laia Vilà^{1,2,3}, Ivet Elias^{1,2,3}, Carles Roca^{1,2,3}, Albert Ribera^{1,2,3}, Tura Ferré^{1,3}, Alba Casellas^{1,3}, Ricardo Lage^{1,2}, Sylvie Franckhauser^{1,3} and Fatima Bosch^{1,2,3}

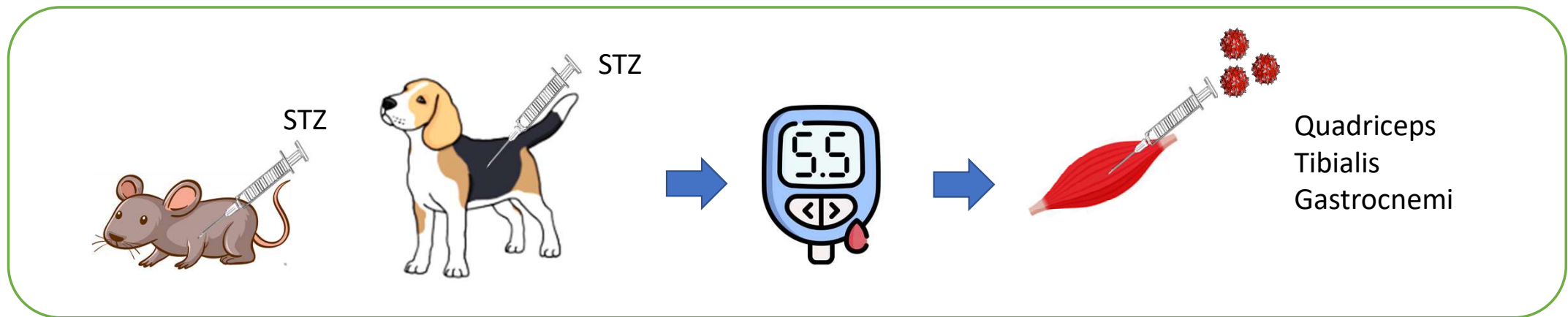
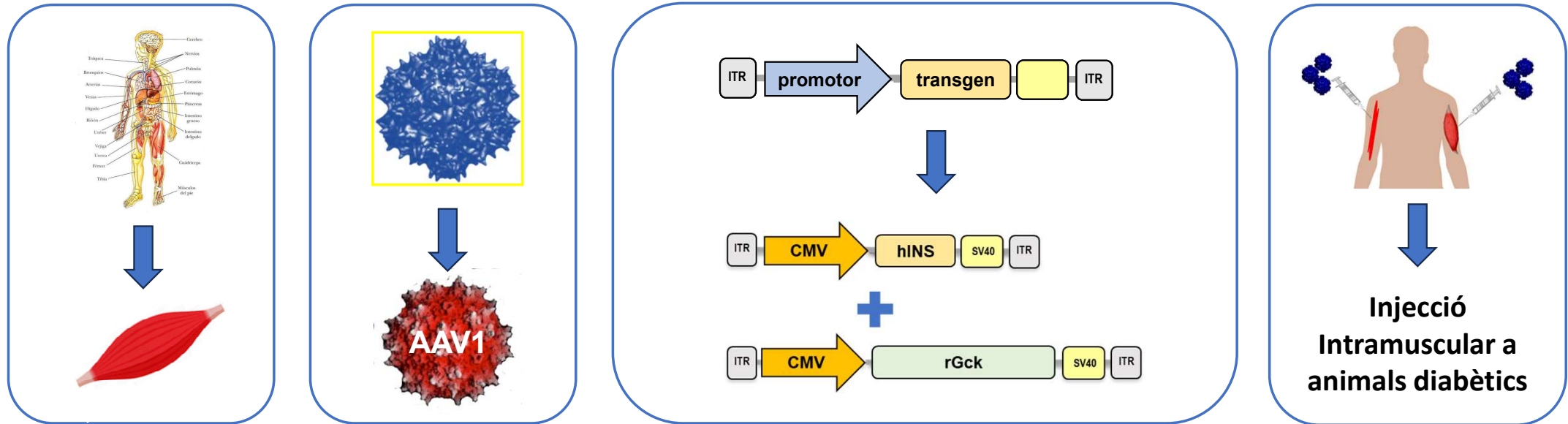
Estudis amb teràpia gènica pel tractament de la diabetis mellitus tipus 1



Crear un sensor de glucosa en el múscul esquelètic, incrementant la captació de glucosa i alliberant insulina



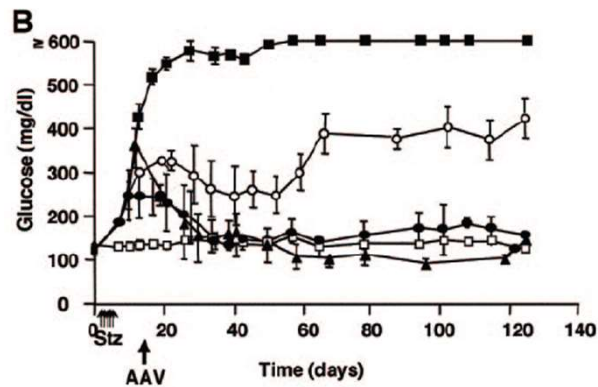
Selecció de paràmetres per a incrementar l'especificitat tissular



Sobreexpressió Ins+GcK en ratolins diabètics



Mas et al. 2006

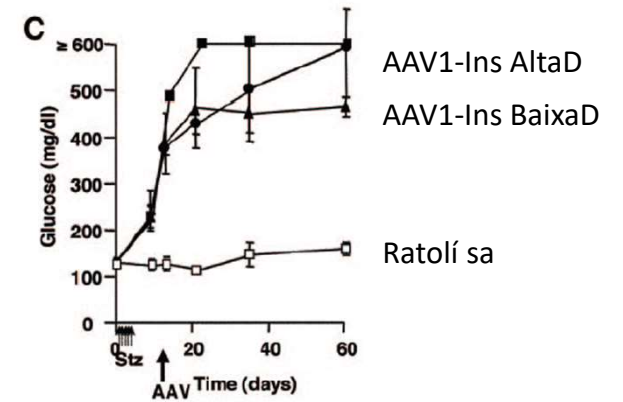


NT ratolí diabètic

AAV1-Ins+GcK baixaD

AAV1-Ins+GcK MitjaD

AAV1-Ins+GcK AltaD



AAV1-Ins AltaD

AAV1-Ins BaixaD

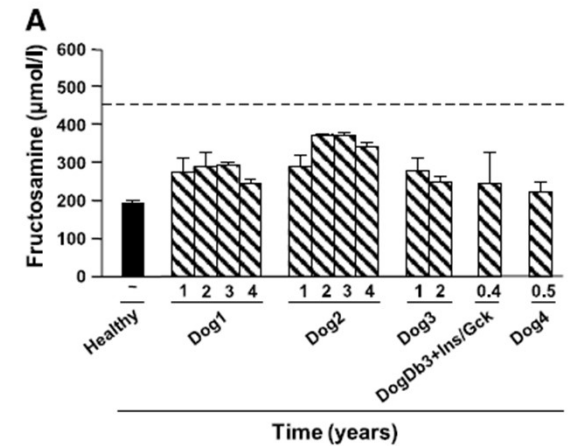
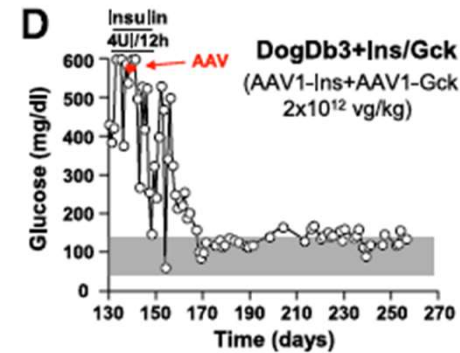
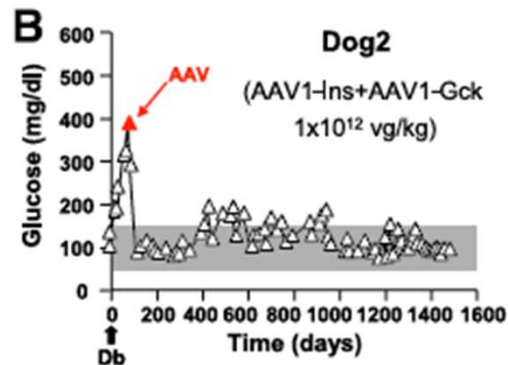
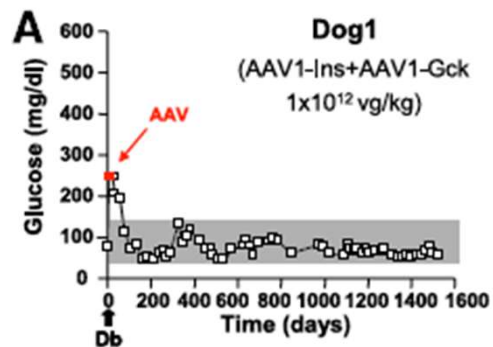
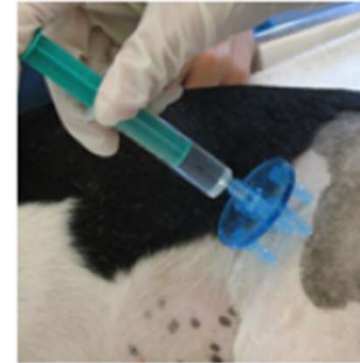
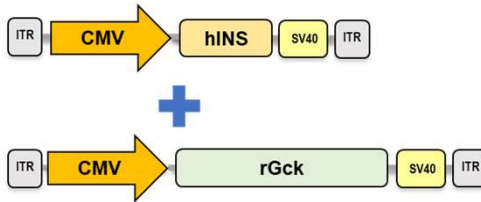
Ratolí sa

L'administració de AAV1-Ins+GcK IM redueix nivells de glucosa de manera dosi-depenent

Sobreexpressió Ins+Gck en gossos diabètics



Callejas et al. 2013

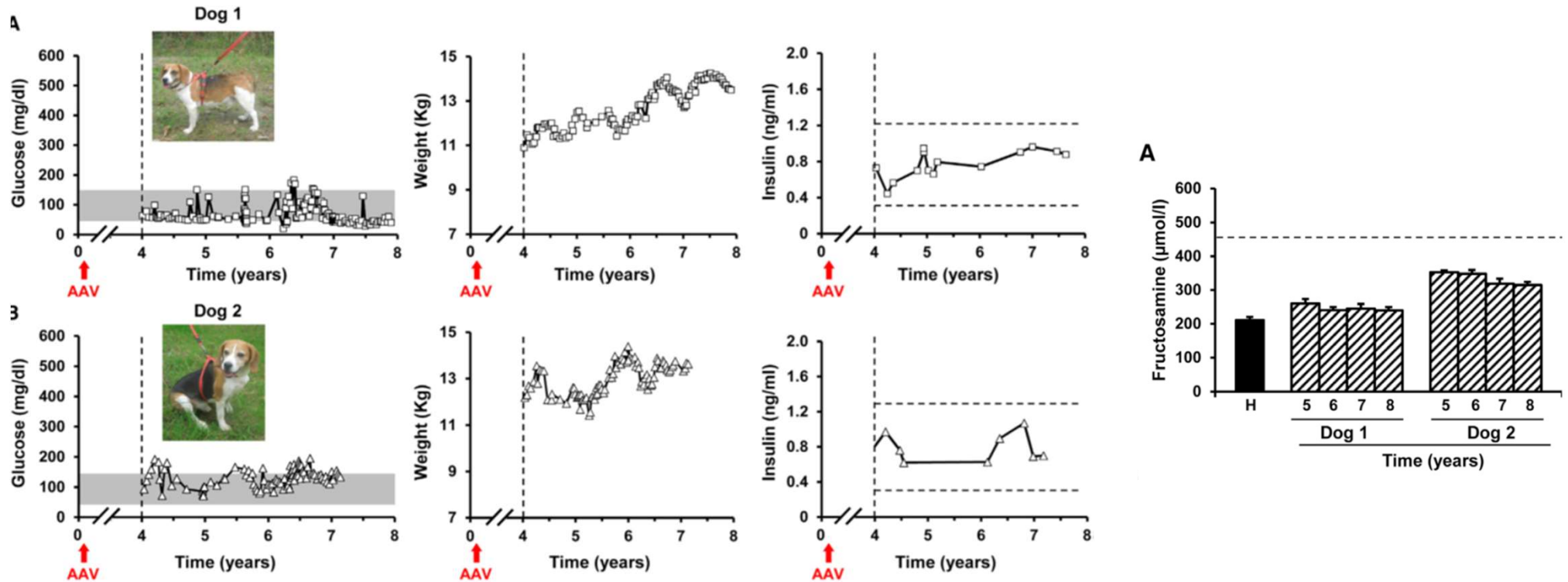


Transferència gènica de Ins+Gck al múscul esquelètic corregeix la diabetis tipus 1 en gossos

Sobreexpressió Ins+GcK en gossos diabètics

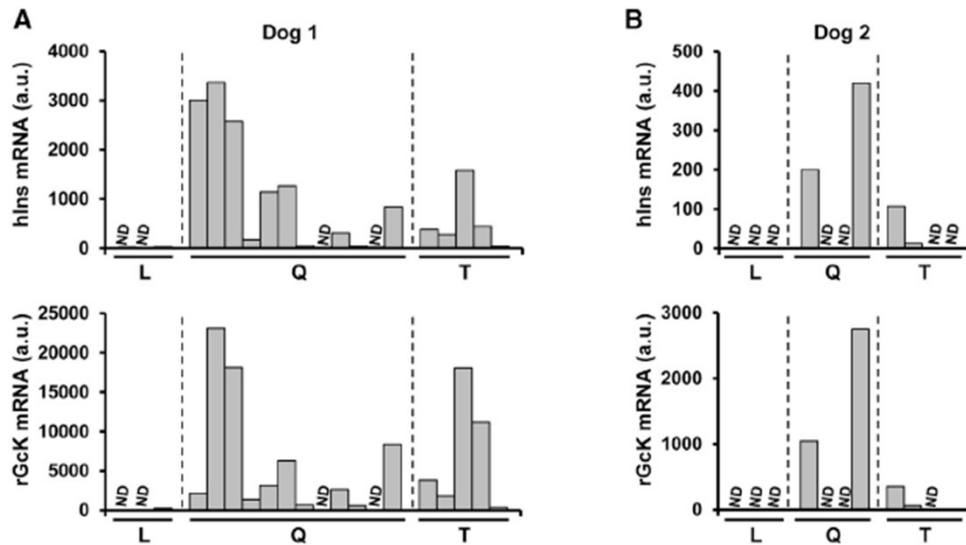
Dog 2 vídeo

Sobreexpressió Ins+Gck en gossos diabètics - Estudi a llarg termini



Fins a 8 anys post-tractament, la sobreexpressió de Ins+Gck al múscul esquelètic manté controlada la diabetis tipus 1 sense la necessitat d'insulina exògena

Sobreexpressió Ins+GcK en gossos diabètics - Estudi a llarg termini



8 anys després d'una única administració dels vectors virals, els gossos encara expressaven els transgens

Molecular Therapy

Methods & Clinical Development

Original Article



Long-Term Efficacy and Safety of Insulin and Glucokinase Gene Therapy for Diabetes: 8-Year Follow-Up in Dogs

Maria Luisa Jaén,^{1,2,5} Laia Vilà,^{1,2,5} Ivet Elias,^{1,2,5} Veronica Jimenez,^{1,2,5} Jordi Rodó,^{1,2,5} Luca Maggioni,^{1,2,5} Rafael Ruiz-de Gopegui,³ Miguel Garcia,^{1,2,5} Sergio Muñoz,^{1,2,5} David Callejas,^{1,2,5} Eduard Ayuso,^{1,2,5} Tura Ferré,^{1,2,5} Iris Grifoll,^{1,2,5} Anna Andaluz,³ Jesus Ruberte,^{1,4,5} Virginia Haurigot,^{1,2,5} and Fatima Bosch^{1,2,5}

Take home message



- Els vectors virals adenoassociats s'utilitzen com a eina per introduir seqüències d'ADN dins les cèl·lules
- La correcta combinació entre via d'administració, serotip d'AAV i promotor incrementaran l'especificitat tissular de la teràpia
- Aquests medicaments de teràpia avançada són regulats pels mateixos organismes que els medicaments convencionals (Agència Espanyola del Medicament i EMA)
- Existeixen medicaments de teràpies avançades basats en AAVs acceptats per al tractament de malalties monogèniques

Moltes gràcies!!!