



Vetores

- **Agentes utilizados na transferência gênica**
- **Definidos como os veículos que carregam a informação genética terapêutica**

Vetor ideal

- Possibilidade de regular a expressão do gene exógeno no tempo e/ou na quantidade;
- Baixo custo;
- Fácil produção e manipulação;
- Baixa imunogenicidade e citotoxicidade;

Tipos de Vetores

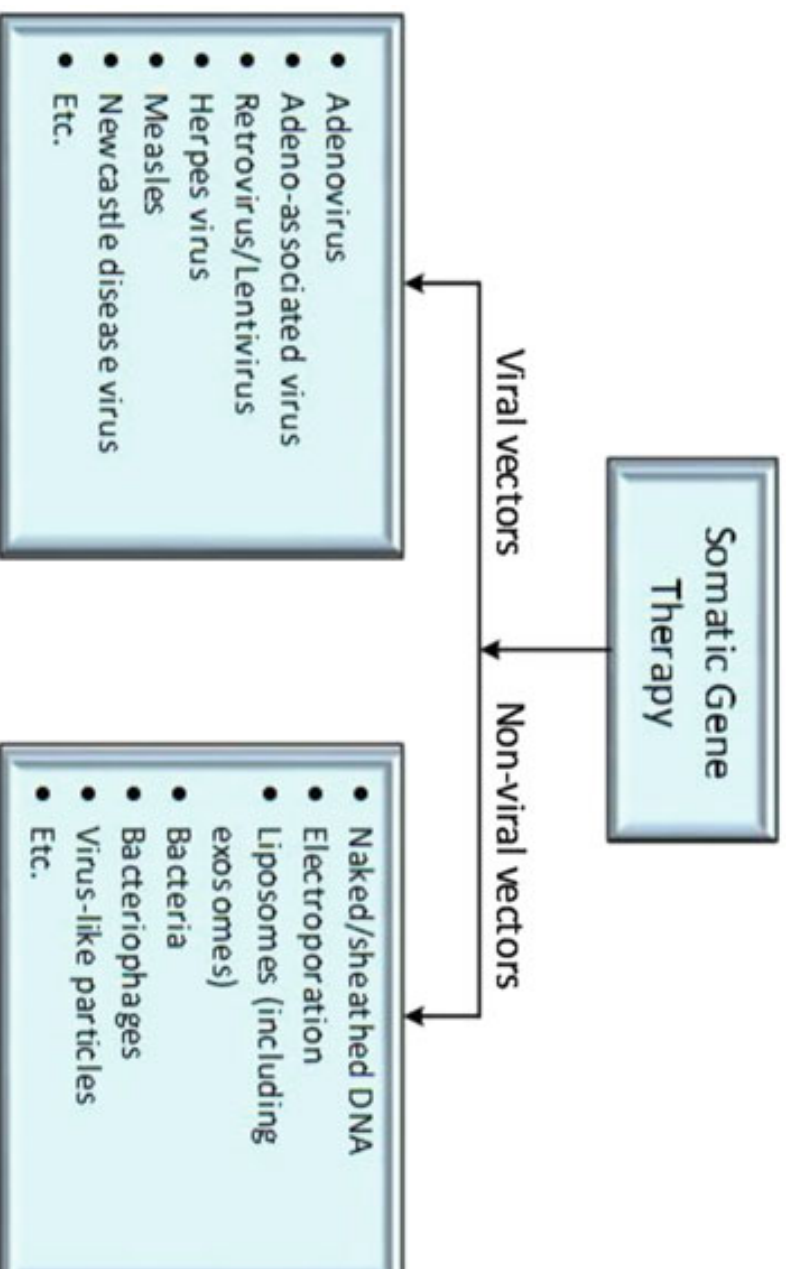


Fig. 2 Viral and non-viral vectors for somatic cell gene therapy

Fabiana T.M.C. Vicentini

Tipos de Vetores

❖ **Não-virais ou Sintéticos** – dependem da transferência direta da informação genética na célula-alvo, e incluem DNA plasmidial, DNA nu ou DNA associado com algum sistema de liberação

TABLE 13.2
Methods of Nonviral Gene Transfer

Method	Size of DNA	Target Cells	Transfection Efficiency	Transfection	Cellular Toxicity	Gene Expression	Preparation	Application
Naked DNA	No limit	Especially myocytes	10–30% of cells at injection site	Extra chromosomal	Lymphocytic infiltration	Until death of cell	Easy and cheap	<i>In vivo</i>
Microinjection	No limit	Mitosis/resting	Stable <0.1–1%	Integration possible	30% survival		200–400 injections/hr	<i>In vitro</i>
Electroporation	150 Kb	Mitosis/resting	Stable <0.1–1%	1–2 copies	20–60% survival		Easy	<i>In vitro</i>
Particle bombardment	10,000 copies	Mitosis/resting	Stable <0.1–1%, transient <20%	Persistent and integration?	85–95% survival	2–12 month	Easy	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>
Lipofection	No limit	Mitosis/resting	Stable <0.1–1%, transient 80%	Integration possible	Membrane toxic		Easy	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>
Ligand mediated	>48 Kb	Mitosis/resting	Up to 50%	Extra chromosomal	High	High, Transient	Labor intensive	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>
Calcium phosphate precipitation	No limit	Mitosis/resting	Stable <0.1%	Often multiple copies	High	High, Transient	Labor intensive and time consuming	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>

Escolha do Tipo de Vetor

- **Compreensão das vantagens e desvantagens de cada sistema;**
- **Entendimento da patofisiologia da doença;**
- **Célula-alvo;**
- **Tipo de aplicação;**



Maiores dificuldades TG

- Design do vetor;
- Regulação gênica;
- Evitar resposta imune

Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials

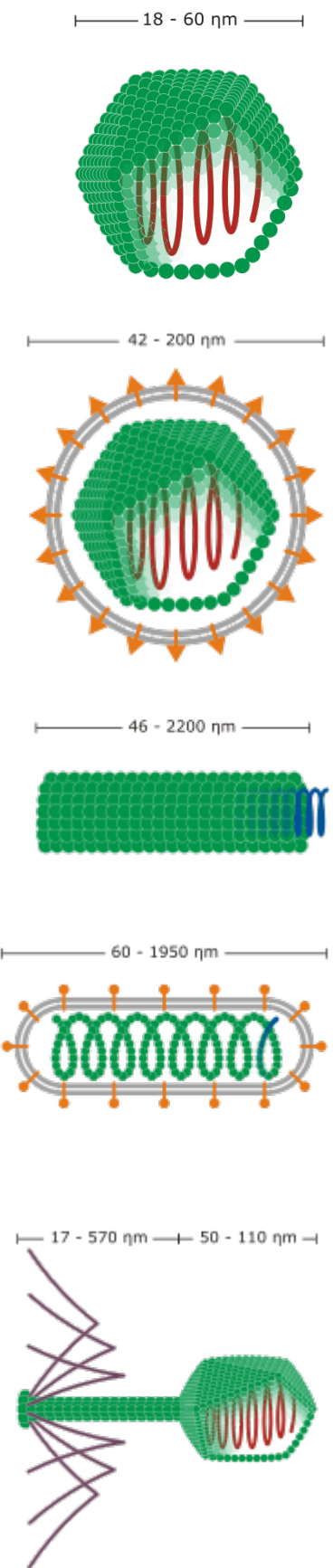


- Adenovirus 18.6% (n=574)
- Retrovirus 17.0% (n=524)
- Naked/Plasmid DNA 15.1% (n=466)
- Lentivirus 9.9% (n=304)
- Adeno-associated virus 7.9% (n=244)
- Vaccinia virus 6.8% (n=211)
- Lipofection 3.9% (n=119)
- Poxvirus 3.6% (n=111)
- Herpes simplex virus 3.2% (n=99)
- Other vectors 7.1% (n=218)
- Unknown 6.8% (n=211)

The Journal of Gene Medicine, © 2019 John Wiley and Sons Ltd

Fabiana T.M.C. Vicentini

Vírus



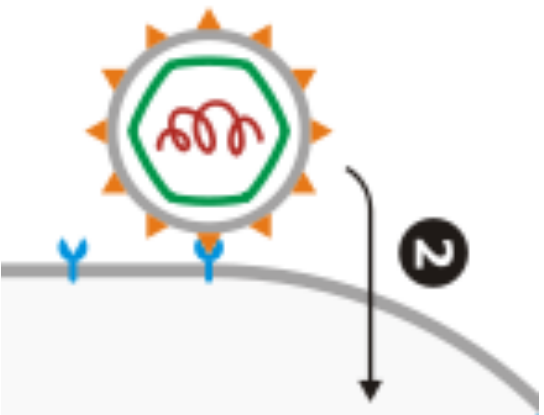
- **Ácido nucléico:** molécula de DNA ou RNA que constitui o genoma viral.
- **Capsídeo:** envoltório protéico que envolve o material genético dos vírus.
- **Nucleocapsídeo:** estrutura formada pelo capsídeo associado ao ácido nucléico que ele engloba.
- **Capsômeros:** subunidades proteicas que agregadas constituem o capsídeo.
- **Envelope:** membrana rica em lipídios que envolve a partícula viral externamente. Deriva de estruturas celulares, como membrana plasmática e organelas.
- **Peplômeros:** estruturas proeminentes, geralmente constituídas de glicoproteínas e lipídios, que são encontradas ancoradas ao envelope, expostas na superfície.

1. Adsorção



Interação entre proteínas virais, presentes no envelope ou no capsídeo, e receptores celulares que se encontram ancorados a membrana plasmática, expostos ao ambiente extracelular

2. Entrada



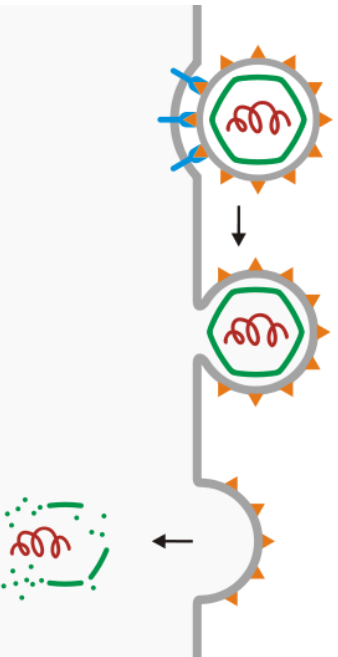
Mecanismo particular para cada vírus

Principais mecanismos estão:

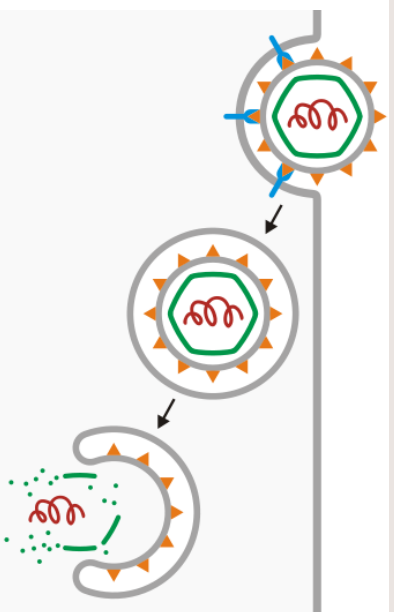
- Endocitose;
- Fusão;
- Translocação;

2. Entrada por Fusão

Entrada por fusão de membranas



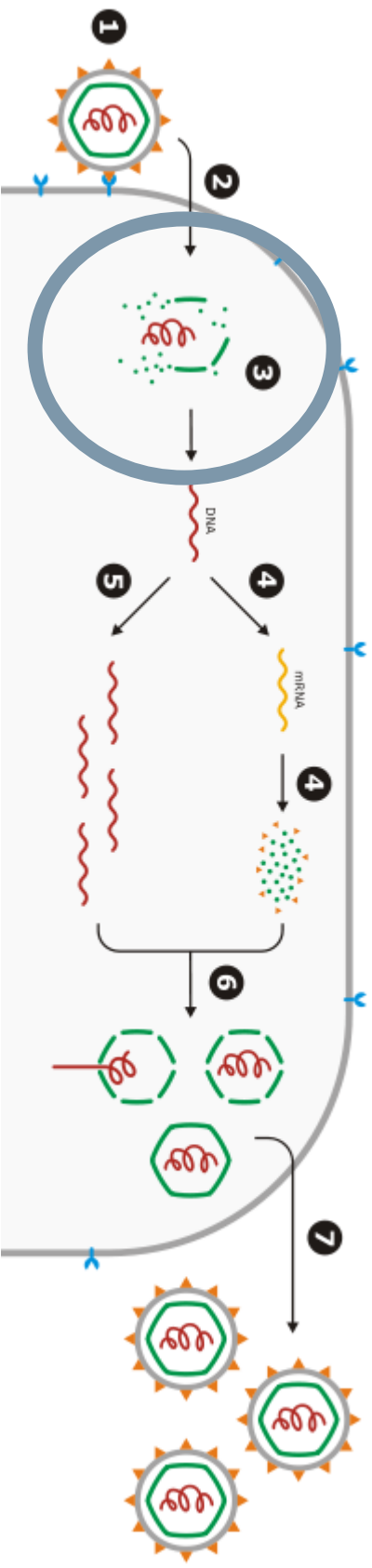
Endocitose seguida por fusão de membranas



(1) **Direta:** fusão do envelope viral com a membrana plasmática, a partir do meio extracelular;

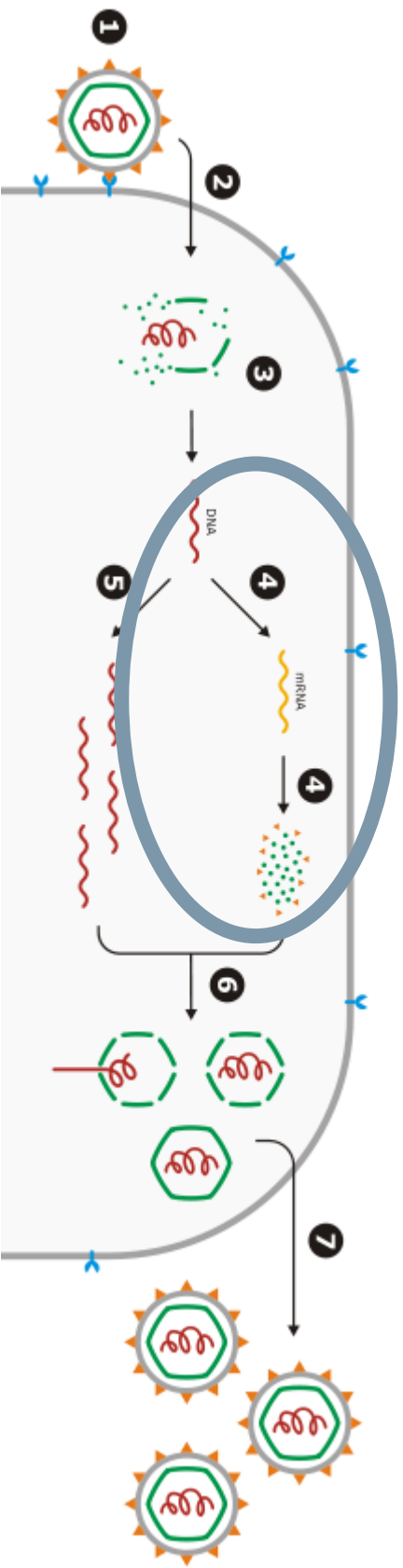
(2) **Indireta:** sofrendo uma endocitose inicial com posterior fusão já no interior da célula

Replicação Viral



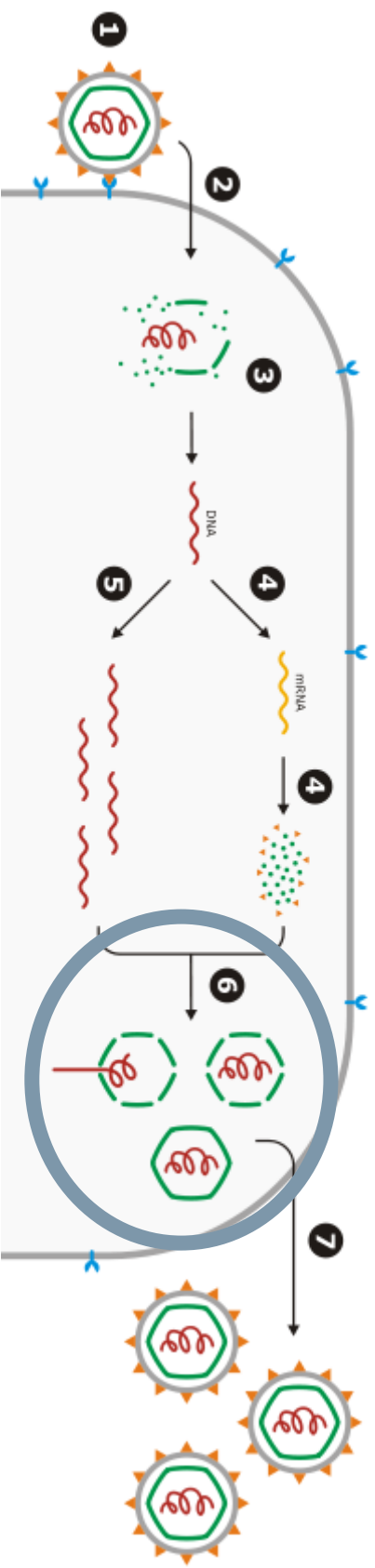
1. Adsorção;
2. Entrada;
3. Desnudamento;

Replicação Viral



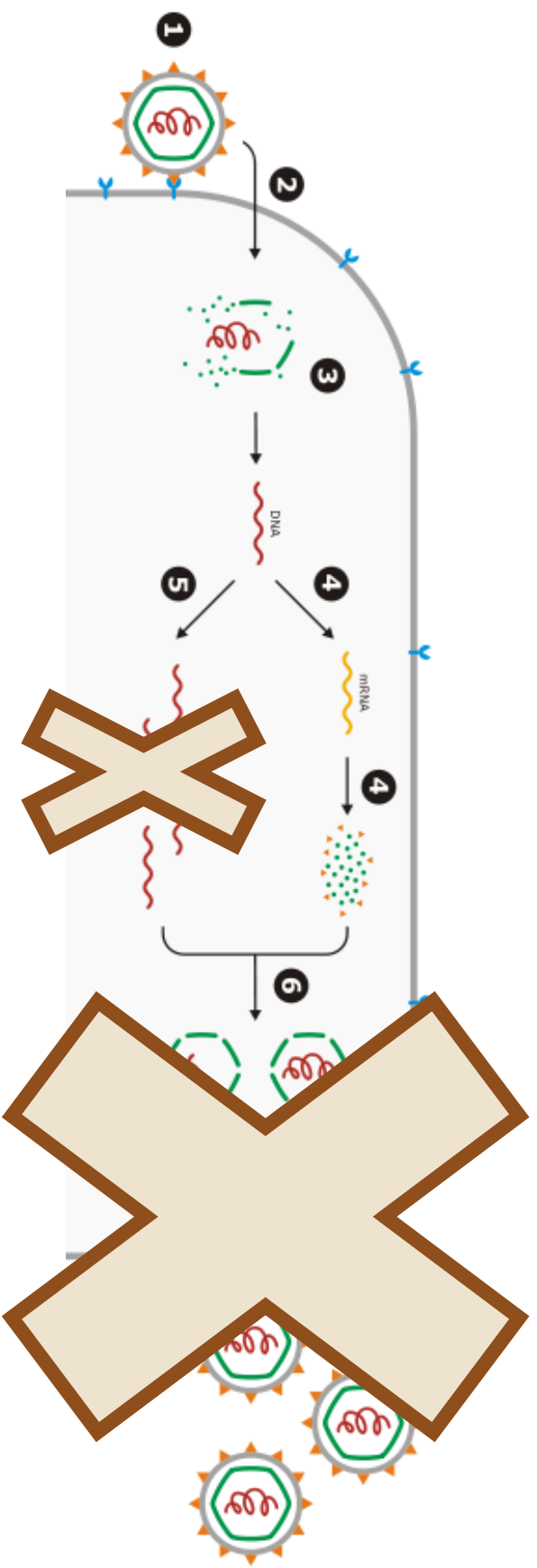
1. Adsorção;
2. Entrada;
3. Desnudamento;
4. Transcrição e tradução;

Replicação Viral



1. Adsorção;
2. Entrada;
3. Desnudamento;
4. Transcrição e tradução;
5. Replicação do genoma;
6. Montagem;
7. Liberação;

Vetores Virais



Vetores Virais

- ❑ Deleção de genes virais indispensáveis para a proliferação viral
- ❑ Substituição destes por genes de interesse terapêutico

Possibilidade de separar os componentes necessários para a replicação daqueles que causam doenças

Vetores Virais

Mais utilizados


- Alta eficiência de transdução

Objetivo terapêutico da TG

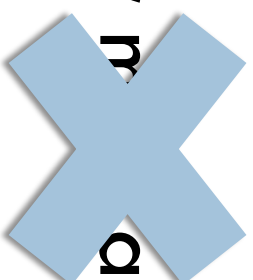
- Expressão desejada pode ser transiente ou permanente

Vetores Virais - Desvantagens

- ❑ Limitação no tamanho dos genes que o vírus pode levar;
- ❑ Dificuldade de padronização da produção de partículas virais em cultura de células;
- ❑ Custo mais elevado quando comparado com produção de DNA plasmidial

- 
- **Diversidade de patologias que são alvos potenciais da TG**
 - **Natureza heterogênea dos vetores virais**

Único vetor inadequado



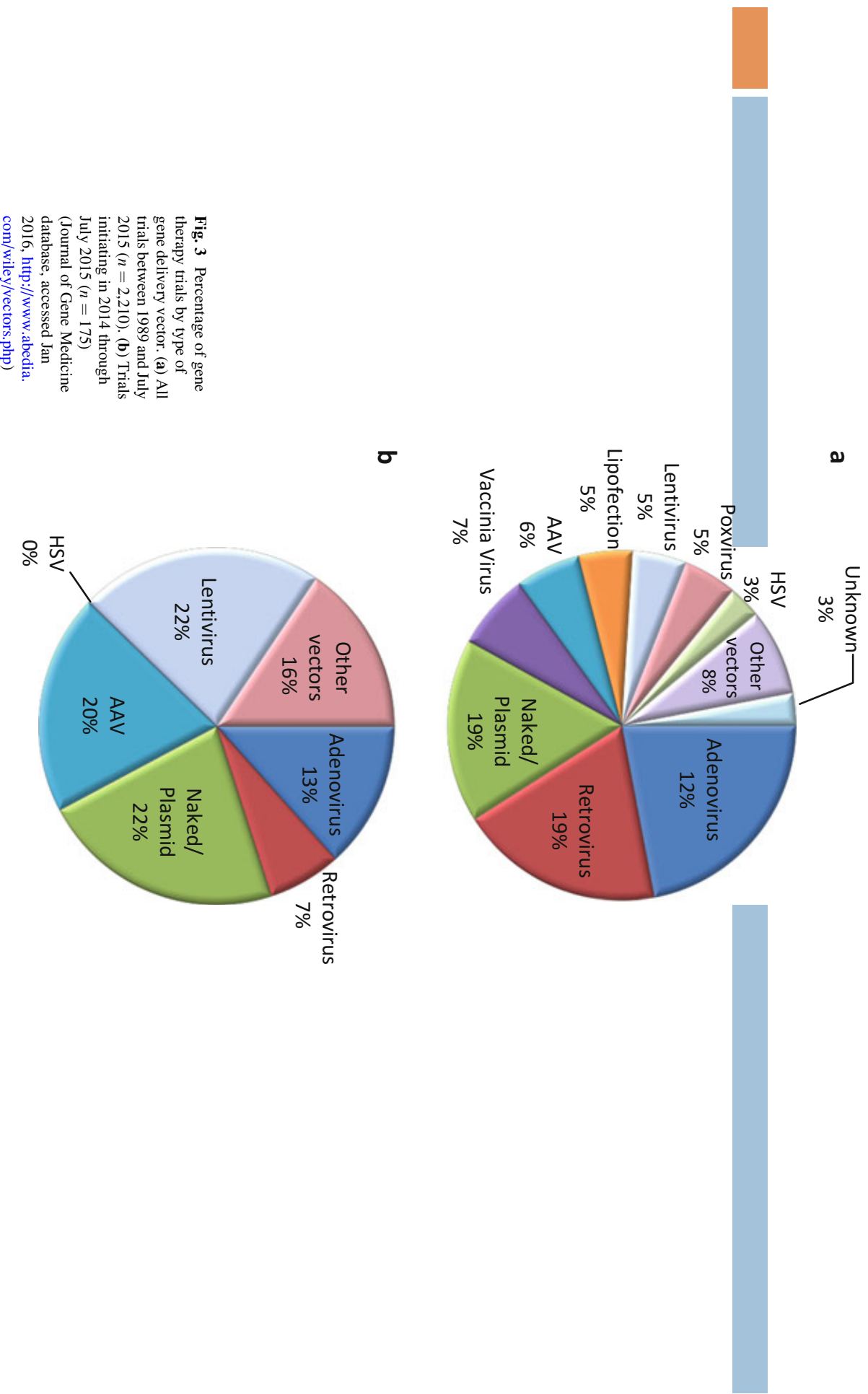


Fig. 3 Percentage of gene therapy trials by type of gene delivery vector. **(a)** All trials between 1989 and July 2015 ($n = 2,210$). **(b)** Trials initiating in 2014 through July 2015 ($n = 175$) (Journal of Gene Medicine database, accessed Jan 2016, <http://www.abedta.com/wiley/vectors.php>)

Fabiana T.M.C. Vicentini

Principais vetores virais

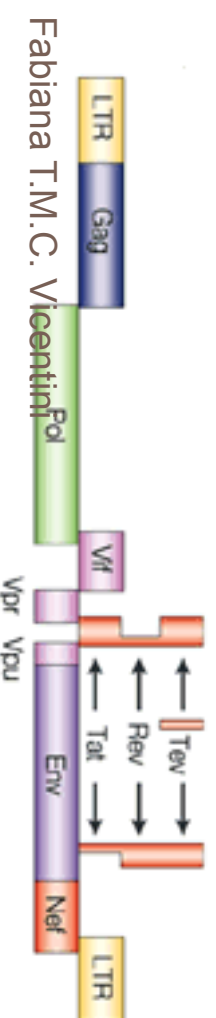
Table 21.1 Advantages and disadvantages of use of different viral vectors in gene therapy

Viral vectors	Advantages	Disadvantages
Adenovirus	Infection of non-dividing cells Attaining high titre in culture	Highly immunogenic Short-term expression
AAV	Infection of non-dividing cells Infection of different cell types	Limited integration Short-term expression
HSV	Infection of different cell types	Attain low titre in culture Cytotoxicity Short-term expression
Lentivirus	Attain high titre in culture Permanent infection of non-dividing cells	May cause undesirable effects
Retrovirus	Integration of viral DNA in the host genome	Infection of dividing cells only

AAV, adeno-associated virus; HSV, herpes simplex virus.

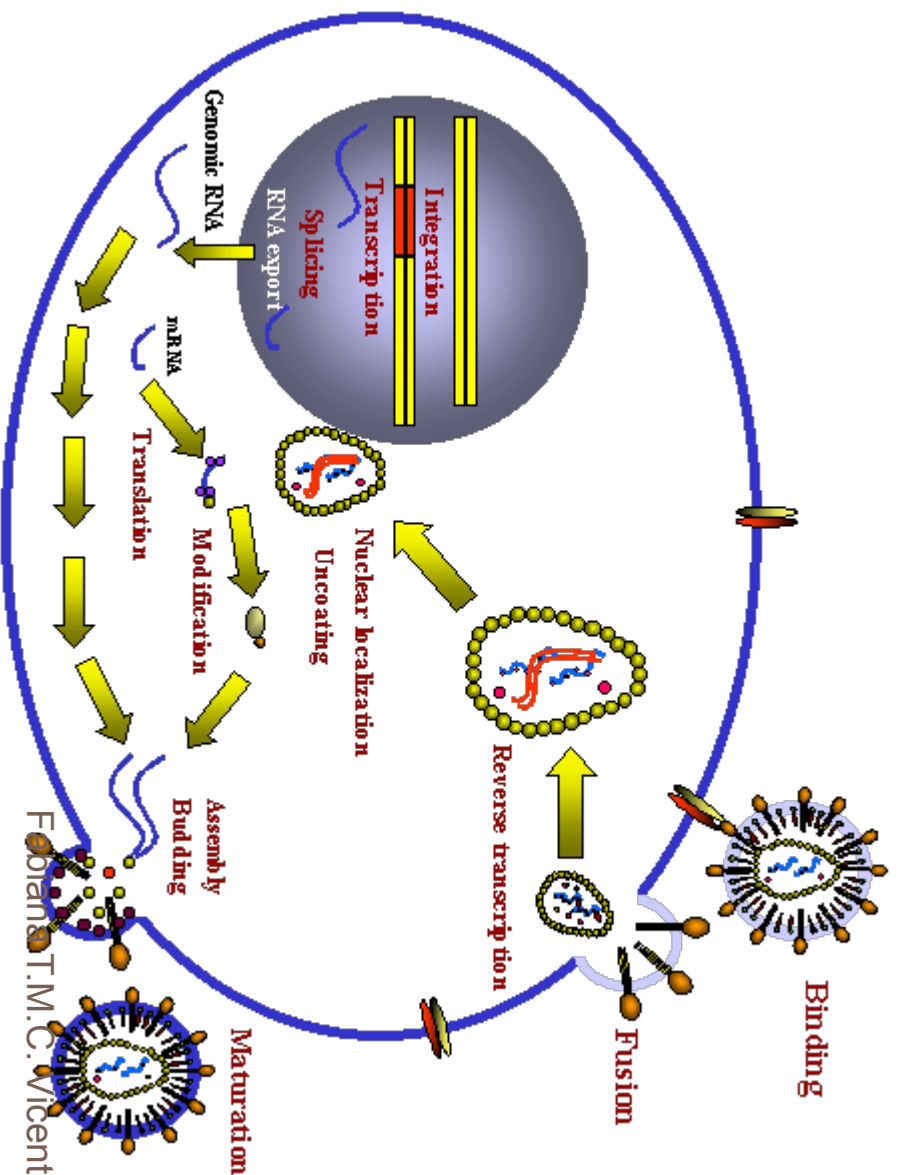
Retrovírus- Estrutura

- Genoma contém duas cópias de RNA, com uma ou mais regiões codificadoras juntamente com os elementos de controle viral, chamados de “*Repetições terminais longas*” (LTR);
- Simples – somente contém genes essenciais mínimos: *gag*, *pol* e *env*;
- Complexos – contém também proteínas regulatórias adicionais necessárias para replicação e persistência do vírus;



Retrovírus- Ciclo de vida

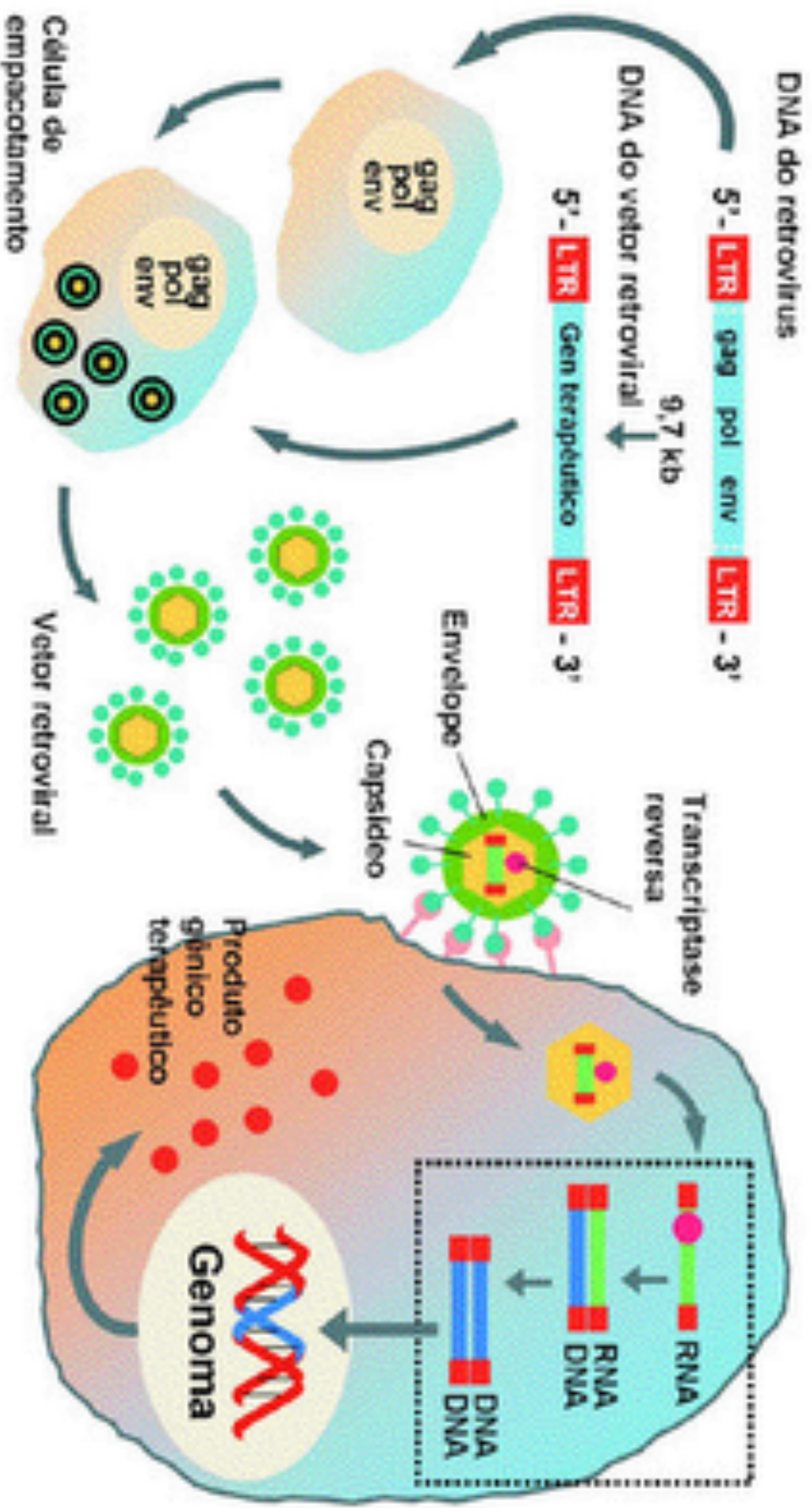
Entrada na célula



RNA genômico é convertido em cDNA pela transcriptase reversa

Integração do cDNA com genoma da célula hospedeira

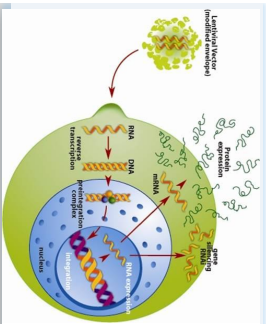
Retrovírus- Produção e uso de vetores retrovirais



Fabiana T.M.C. Vicentini

Retrovírus- Vantagens

- Integram-se ao genoma do hospedeiro;
- Expressão estável do transgene com efeito da modificação por longos períodos;
- Elevada eficiência na transferência;



Lentivírus

- Subclasse de retrovírus;
- Relacionados a doenças graves (HIV);
- Expressa um complexo que controla funções importantes no núcleo das células infectadas;
- Capazes de se replicarem em células que não estejam em divisão, resultando na duração da infecção por toda a vida do hospedeiro;
- Além dos genes retrovirais típicos (*gag*, *pol* e *env*) HIV-1 sintetiza 6 proteínas acessório (*Tat*, *Rev*, *Nef*, *Vif*, *Vpr* e *Vpu*) que modulam a transcrição, replicação e persistência viral

Fabiana T.M.C. Vicentini

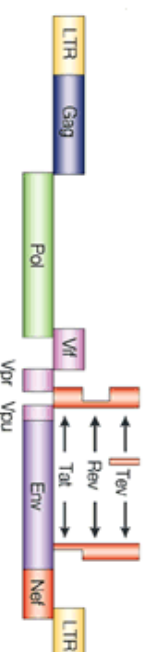
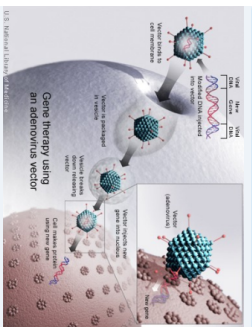
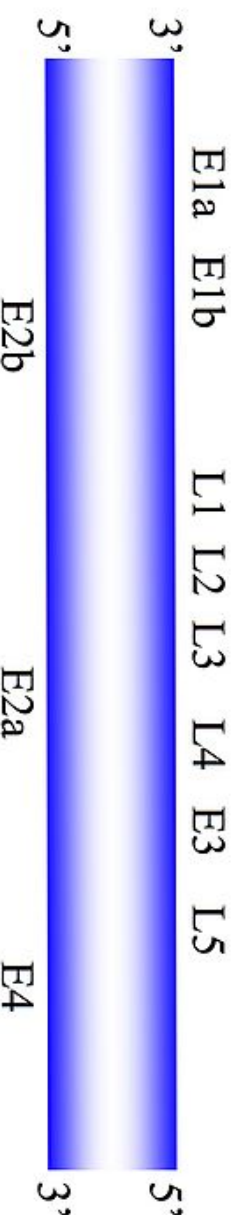


Table 1 Gene therapy drugs launched in the market						
Product	Vector type	Application	Highest phase	Gene	Organization	
Genevance	Adenovirus	Cancer, head and neck (squamous cell carcinoma)	Launched 2004	p53	Sibiono	
Oncorine	Adenovirus	Cancer, rhinopharyngeal	Launched 2006	p53	Shanghai Sunway Biotech	
DeltaRex-G	Retroviral	Cancer, solid tumor	Launched 2007	Dominant-negative mutant of cyclin G1	Epeius Biotechnologies	
Neovasculogen	DNA plasmid	Peripheral arterial disease	Launched 2012	VEGF	Human Stem Cells Institute	
Imlygic	Herpes simplex virus 1	Melanoma, metastatic	Launched 2015	GM-CSF	Amgen	
Strimvelis	Retroviral	Adenosine deaminase deficiency	Launched 2016	Adenosine deaminase	Orchard Therapeutics	
Invossa	Retroviral	Osteoarthritis, knee	Launched 2017	Transforming growth factor beta1 (TGF-b1)	Kolon Life Science	
Zalmoxis	Retroviral	Hematologic, blood cancer	Launched 2017	HSV-TK/Neo fusion suicide gene	MolMed	
Kymriah	Lentiviral	Leukemia, acute lymphocytic	Launched 2017	CART-19	Novartis	
		Lymphoma, diffuse large B-cell	Launched 2018	CART-19		
		Leukemia, B-cell acute lymphocytic	Launched 2019	CART-19		
Yescarta	Retroviral	Lymphoma, B-cell, diffuse large B-cell, primary mediastinal large B-cell	Launched 2017	CART-19	Kite Pharma	
Spinraza	No vector	Spinal muscular atrophy	Launched 2017	SMN2-directed antisense oligonucleotide	Biogen	
Glybera	Adeno-associated	Lipoprotein lipase deficiency	Withdrawn 2017	Lipoprotein lipase	Chiesi Farmaceutici	
Luxturna	Adeno-associated	Retinal dystrophy	Launched 2018	Retinal pigment epithelium-specific (RPE65)	Spark Therapeutics	
Zolgensma	Adeno-associated	Spinal muscular atrophy type 1	Launched 2019	Survival motor neuron 2 (SMN2)	AveXis	
Collatogene	DNA plasmid	Critical limb ischemia	Registered 2019	Hepatocyte growth factor	AnGes	
Lentiglobin	Lentiviral	Thalassemia, beta (major)	Registered 2019	Hemoglobin subunit beta	bluebird bio	



Adenovírus

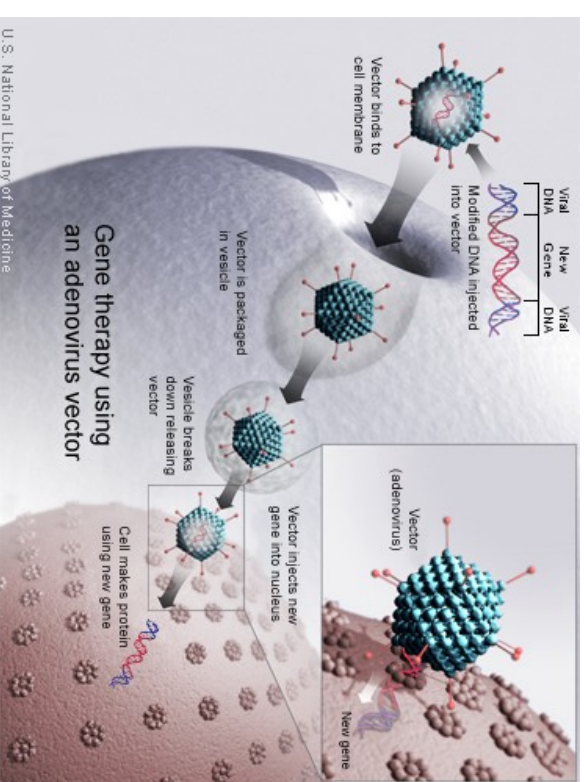
- ❑ Vírus icosaédrico não-envelopado
- ❑ Genoma linear composto por DNA fita dupla (dsDNA)
- ❑ Genoma viral – 2 regiões principais compostas por fases abertas de leitura (“*Open Reading Frames*” - ORFs) que codificam as proteínas virais:
- ❑ E (*early*)-codifica proteínas envolvidas na replicação viral; L (*late*) - codifica proteínas estruturais



Adenovírus

○ Vetores de DNA mais utilizados;

○ Aplicação na transferência de genes suicidas a tumores;



Adenovírus- Desvantagens

- ❑ Grande imunogenicidade – proteínas virais são imunogênicas e podem induzir inflamação não específica e respostas celulares específicas;
- ❑ Curto período de expressão gênica – os episomas são perdidos entre 2 – 4 semanas, assim é necessário a administração repetida;
- ❑ Sua eficácia pode ser severamente prejudicada - maioria das pessoas foram expostas ao adenovírus;
- ❑ Baixa eficiência de transfecção do transgene *in vivo*

Adenovírus- Produção e uso de vetores adenovirais

- ❑ Segunda geração: deleções adicionais nas regiões E2 e E4
 - Permitir um aumento adicional da capacidade do transgene para ~ 10-14 kb
 - Reduzir a resposta imune do hospedeiro mediada por proteína viral.

Table 1 Gene therapy drugs launched in the market						
Product	Vector type	Application	Highest phase	Gene	Organization	
Gendicine	Adenovirus	Cancer, head and neck (squamous cell carcinoma)	Launched 2004	p53	Sibiono	
Oncorine	Adenovirus	Cancer, rhinopharyngeal	Launched 2006	p53	Shanghai Sunway Biotech	
DeltaRex-G	Retroviral	Cancer, solid tumor	Launched 2007	Dominant-negative mutant of cyclin G1	Epeius Biotechnologies	
Neovasculogen	DNA plasmid	Peripheral arterial disease	Launched 2012	VEGF	Human Stem Cells Institute	
Imlygic	Herpes simplex virus 1	Melanoma, metastatic	Launched 2015	GM-CSF	Amgen	
Strimvelis	Retroviral	Adenosine deaminase deficiency	Launched 2016	Adenosine deaminase	Orchard Therapeutics	
Invossa	Retroviral	Osteoarthritis, knee	Launched 2017	Transforming growth factor beta1 (TGF-b1)	Kolon Life Science	
Zalmoxis	Retroviral	Hematologic, blood cancer	Launched 2017	HSV-TK/Neo fusion suicide gene	MolMed	
Kymriah	Lentiviral	Leukemia, acute lymphocytic	Launched 2017	CART-19	Novartis	
		Lymphoma, diffuse large B-cell	Launched 2018	CART-19		
		Leukemia, B-cell acute lymphocytic	Launched 2019	CART-19		
Yescarta	Retroviral	Lymphoma, B-cell, diffuse large B-cell, primary mediastinal large B-cell	Launched 2017	CART-19	Kite Pharma	
Spinraza	No vector	Spinal muscular atrophy	Launched 2017	SMN2-directed antisense oligonucleotide	Biogen	
Glybera	Adeno-associated	Lipoprotein lipase deficiency	Withdrawn 2017	Lipoprotein lipase	Chiesi Farmaceutici	
Luxturna	Adeno-associated	Retinal dystrophy	Launched 2018	Retinal pigment epithelium-specific (RPE65)	Spark Therapeutics	
Zolgensma	Adeno-associated	Spinal muscular atrophy type 1	Launched 2019	Survival motor neuron 2 (SMN2)	AveXis	
Collatogene	DNA plasmid	Critical limb ischemia	Registered 2019	Hepatocyte growth factor	AnGes	
Lentiglobin	Lentiviral	Thalassemia, beta (major)	Registered 2019	Hemoglobin subunit beta	bluebird bio	

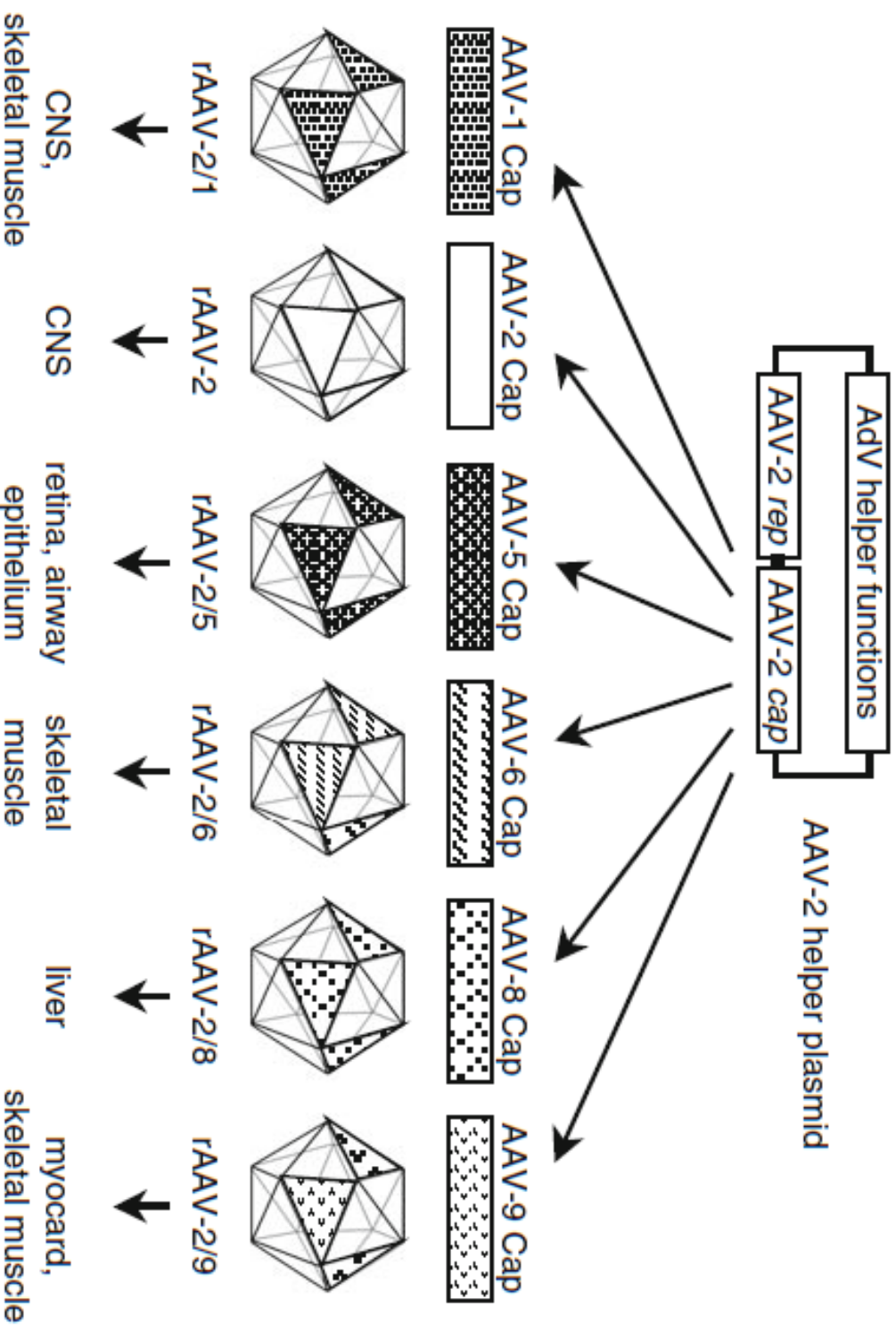
Adeno-associados- Estrutura

- ❑ Genoma é composto de uma molécula de DNA fita simples (ssDNA) de ~5 kb com repetições terminais invertidas (*ITRs*);
- ❑ Contem duas ORFs: codificam uma proteína regulatória (*rep*) e outra estrutural (*cap*);
- ❑ *ITRs* são os únicos elementos dos AAV mantidos no vetor;
- ❑ Integração em células humanas infectadas é normalmente no cromossomo 19

Adeno-associados- Vantagens

- ❑ Integração sítio-específica;
- ❑ Tropismo ampliado;
- ❑ Ausência de patogenicidade – Capsídeo do AAV exibe baixa imunogenicidade;
- ❑ Alta grau de estabilidade física e química mesmo em $T > 60^{\circ} \text{C}$ por longos períodos de tempo;
- ❑ Replicação incompetente natural;
- ❑ Nenhuma relação com doenças humanas;

Adeno-associated



Adeno-associados - Perspectivas

Futuras

Capsídeos de AAV



Ubiquitinação e Degradação

Não atingem o núcleo

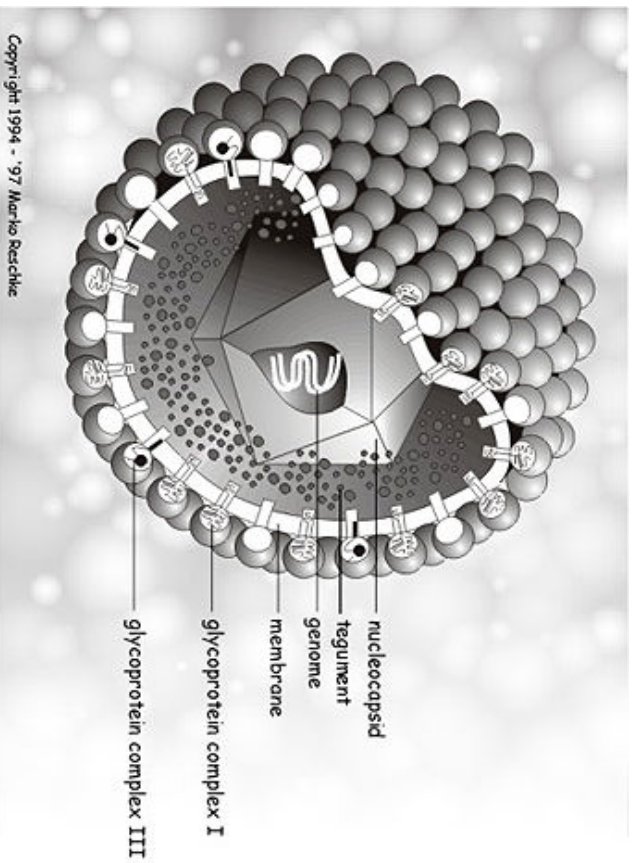


Estratégias de proteção

Aumento na estabilidade do
vetor

Expressão do transgene

Herpesvírus



- Tropicismo pelo sistema nervoso central;
- Genoma linear composto por dsDNA;
- DNA - 152 kb;
- Transgene 40-50 kb

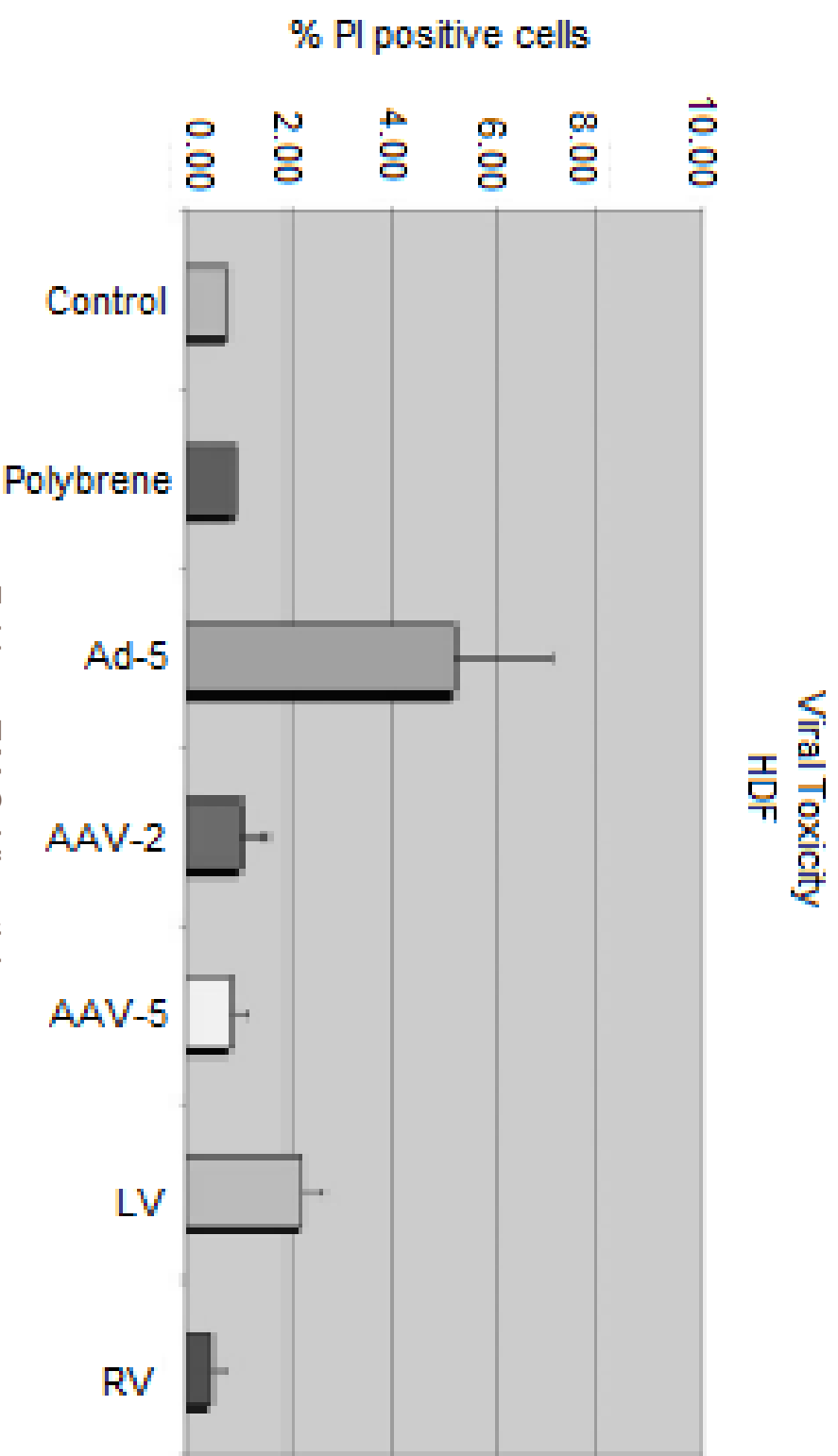
Table 1 | Gene therapy drugs launched in the market

Product	Vector type	Application	Highest phase	Gene	Organization
Gendicine	Adenovirus	Cancer, head and neck (squamous cell carcinoma)	Launched 2004	p53	Sibiono
Oncorine	Adenovirus	Cancer, rhinopharyngeal	Launched 2006	p53	Shanghai Sunway Biotech
DeltaRex-G	Retroviral	Cancer, solid tumor	Launched 2007	Dominant-negative mutant of cyclin G1	Epeius Biotechnologies
Neovasculogen	DNA plasmid	Peripheral arterial disease	Launched 2012	VEGF	Human Stem Cells Institute
Imlygic	Herpes simplex virus 1	Melanoma, metastatic	Launched 2015	GM-CSF	Amgen
Strimvelis	Retroviral	Adenosine deaminase deficiency	Launched 2016	Adenosine deaminase	Orchard Therapeutics
Invossa	Retroviral	Osteoarthritis, knee	Launched 2017	Transforming growth factor beta1 (TGF-b1)	Kolon Life Science
Zalmoxis	Retroviral	Hematologic, blood cancer	Launched 2017	HSV-TK/Neo fusion suicide gene	MolMed
Kymriah	Lentiviral	Leukemia, acute lymphocytic	Launched 2017	CART-19	Novartis
		Lymphoma, diffuse large B-cell	Launched 2018	CART-19	
		Leukemia, B-cell acute lymphocytic	Launched 2019	CART-19	
Yescarta	Retroviral	Lymphoma, B-cell, diffuse large B-cell, primary mediastinal large B-cell	Launched 2017	CART-19	Kite Pharma
Spinraza	No vector	Spinal muscular atrophy	Launched 2017	SMN2-directed antisense oligonucleotide	Biogen
Glybera	Adeno-associated	Lipoprotein lipase deficiency	Withdrawn 2017	Lipoprotein lipase	Chiesi Farmaceutici
Luxturna	Adeno-associated	Retinal dystrophy	Launched 2018	Retinal pigment epithelium-specific (RPE65)	Spark Therapeutics
Zolgensma	Adeno-associated	Spinal muscular atrophy type 1	Launched 2019	Survival motor neuron 2 (SMN2)	AveXis
Collatene	DNA plasmid	Critical limb ischemia	Registered 2019	Hepatocyte growth factor	AnGes
Lentiglobin	Lentiviral	Thalassemia, beta (major)	Registered 2019	Hemoglobin subunit beta	bluebird bio

Outros

- ❖ Vírus da estomatite vesicular;
- ❖ Vírus do sarampo;
- ❖ Poliovírus;
- ❖ Vírus da doença de Newcastle

Toxicidade do vetor viral



Fabiana T.M.C. Vicentini

Teo, E.H. et al., 2009



SUCCESSO

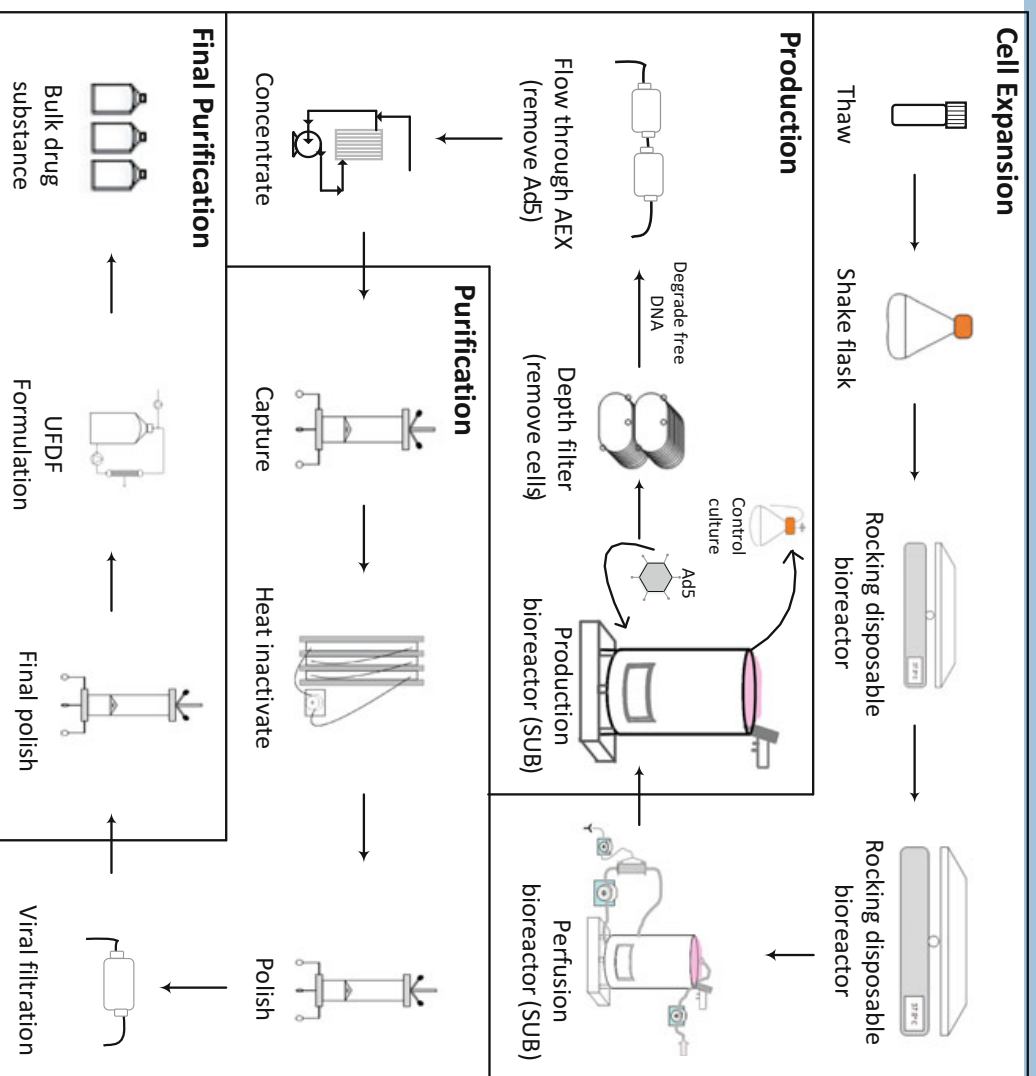
VIABILIDADE DE
IMPLEMENTAÇÃO
COMERCIAL



Entrega segura e
eficaz do material
genético para células-
alvo

Desenvolvimento de
processos de
fabricação robustos
escalonáveis e viáveis
economicamente

Processo Produtivo de Vetores Virais



Processo Produtivo de Vetores Virais

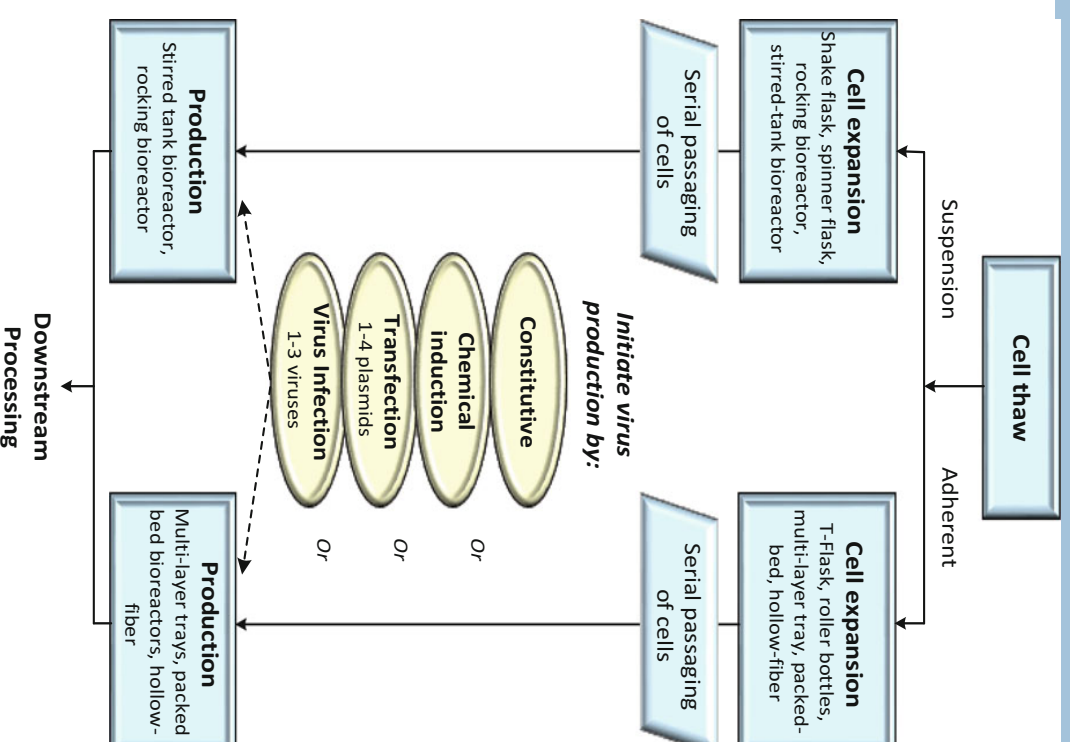


Fig. 4 Generalized example cell culture process flow for viral gene therapy products

Processo Produtivo de Vetores

Virais

- ❑ Desafios exclusivos de implementação da produção em larga escala:
 - Contenção viral – instalação adequada;
 - Nível de biossegurança 2 (BSL2 ou BSL2+)
 - Projeto de instalação (fluxo de ar) e métodos de descontaminação

CMOs



- ❑ Equipamentos e materiais de uso único
 - Maior produtividade, eficiência e flexibilidade;
 - Contaminação cruzada

Processo Produtivo de Vetores

Virais

- ❑ **Desafios exclusivos nas etapas de Downstream:**
 - **Tamanho da partícula: exigência de processamento completamente asséptico;**
 - **Estresse operacional: Ex: retrovírus – sensibilidade temperatura, pH extremo e alta concentração de sal;**
 - **Concentração de produtos virais - muito baixa em massa**