

Intérêt et limites des outils utilisés en thérapie génique

Jacques Mallet
Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris

Académie Vétérinaire

Paris, le 3 février 2011

ICM

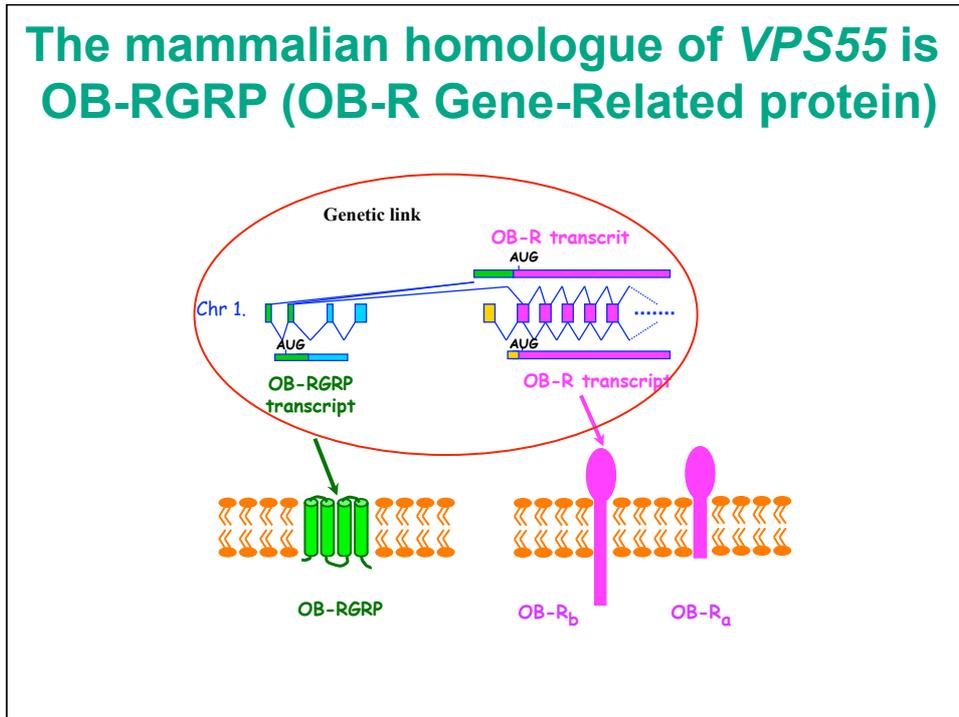


Augmentation considérable du nombre de Cibles Pharmacologiques

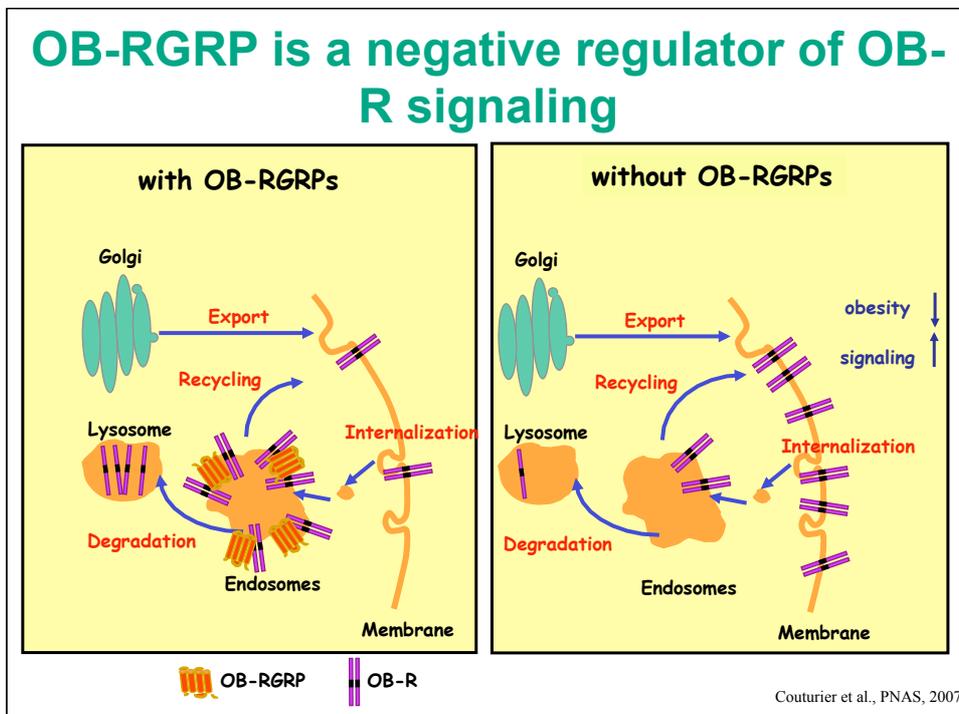
Les progrès émanant de la génétique, de la biologie moléculaire et du séquençage des génomes ont permis de mettre en évidence des cibles biologiques impliquées dans les maladies et singulièrement les maladies complexes dites multifactorielles.

De surcroît, la découverte de plus en plus fine des réseaux moléculaires (gènes, protéines) auxquels appartiennent ces cibles a accru, plus encore, le nombre de cibles potentielles sur lesquelles on peut espérer agir de manière agoniste ou antagoniste.

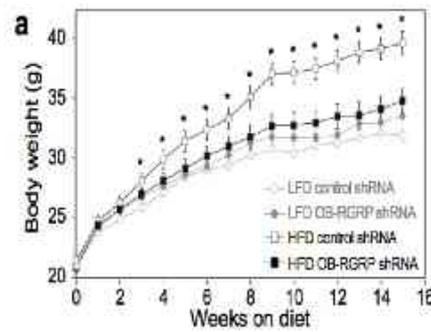
The mammalian homologue of *VPS55* is OB-RGRP (OB-R Gene-Related protein)



OB-RGRP is a negative regulator of OB-R signaling



Silencing of OB-RGRP in the ARC by lentiviral injection



Couturier et al., PNAS, 2007

Les ARNs Interférents

- ! Sélectivité
- ! Efficacité
- ! Tout messenger est une cible thérapeutique potentielle

Impasse thérapeutique des pathologies neurodégénératives

- **Facteurs thérapeutiques**
 - ! Remplacement de la protéine déficiente (Stratégie de restauration)
 - ! Facteurs neurotrophiques (Stratégie de neuroprotection)
 - ! ARN interférents
- **Pas d'apport possible des facteurs par voie systémique**
 - ! Dégradation rapide des facteurs par voie systémique
 - ! Pas de passage des barrières hémato-encéphalique ou hémato-rétinienne
 - ! Effets secondaires indésirables
- **Intérêt du transfert de gènes**
 - ! Production à long terme des facteurs thérapeutiques
 - ! Production locale : effets secondaires limités

La Thérapie Génique

- ! **Quelles maladies ?**
 - ! Déterminera l'organe à cibler
 - ! Déterminera le gène thérapeutique
 - ! Déterminera la validité d'une approche par transfert de gène
 - !
- ! **Quel gène thérapeutique ?**
 - ! Maladie récessive : allèle wt → problème d'immunité ?
 - ! Maladie dominante: approche siARN
 - ! Maladie complexe ou à étiologie inconnue : siARN / approche générique
- ! **Quel vecteur ?**
 - ! Dépend de l'organe à cibler (intégratif ou non, ciblage nécessaire ...)
 - ! AAV et lentivirus sont les plus prometteurs à ce jour
 - ! Adénovirus important à développer pour certaines applications
- ! **Quel mode d'administration ?**
 - ! *Ex vivo* : cellules hématopoïétiques, cellules souches embryonnaires ou adultes ...
 - ! *In vivo* : muscle, CNS ... Envisager transport rétrograde, combinaison avec méthodes de diffusion physique, biologique ou chimique

L'essai SCID-X, un cas d'école

- ! **Maladie monogénique : IL2GR (gammaC)**
 - ! Gène connu
 - ! Maladie incurable touchant des enfants jeunes
- ! **Thérapie génique ex vivo : cellules souches CD34+**
 - ! Conditions de culture optimisées (SVF, IL3, Flt3 ligand, Stem cell factor)
 - ! Preuve de principe déjà établie avec ADA-
 - ! Avantage sélectif des cellules modifiées
- ! **Vecteur : onco-rétrovirus MLV**
 - ! Risque connu de génotoxicité non pris en compte
 - ! Choix du promoteur (LTR)
 - ! Choix de la génération de vecteur (non SIN)
- ! **Mode d'administration : ré-infusion des cellules modifiées**
 - ! $0,5 \times 10^6$ cellules/ml et $> 10^6$ cellules/kg

**Syndrome leucémique déclaré chez 4 patients
NE PAS NEGLIGER LES ASPECTS VECTOROLOGIQUES
ET TECHNIQUES**

Thérapie génique : un domaine pluridisciplinaire

•! **La réussite de la thérapie génique repose nécessairement sur l'optimisation d'une multitude de paramètres . Cela comprend :**

- ! Stratégie thérapeutique (choix du gène thérapeutique en fonction de la physiopathologie)
- ! Le choix du vecteur
- ! L'optimisation du vecteur (en terme d'efficacité et de biosécurité)
- ! L'optimisation de la dose de vecteur
- ! Les conditions de culture cellulaire dans le cas d'approche ex vivo
- ! L'optimisation de la cassette d'expression (choix du promoteur ...)
- ! L'optimisation de la méthode de "delivery"
- ! ... etc

•! **La réussite de la thérapie génique doit tenir compte de sa pluridisciplinarité et nécessite l'implication des acteurs des domaines de :**

- ! La médecine
- ! La virologie
- ! La vectorologie
- ! La biotechnologie
- ! ... etc

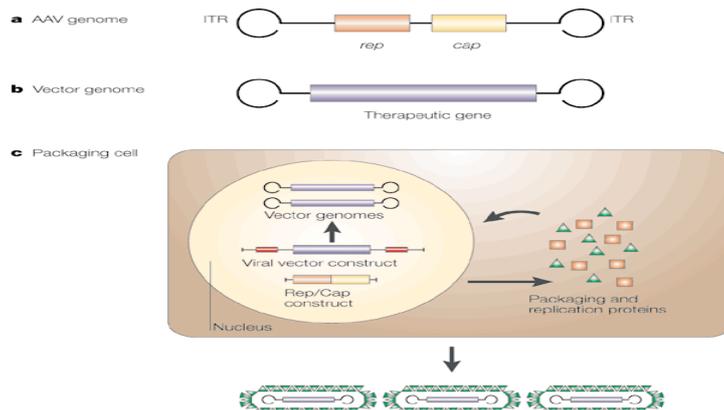
Vectorologie : pierre angulaire de la thérapie génique

Le **choix et la conception des vecteurs** utilisés en thérapie génique sont les premiers facteurs à prendre en compte **une fois la stratégie thérapeutique établie**. Le choix dépendra de :

- La durée d'expression souhaitée
- Le niveau d'expression souhaitée
- La nécessité ou non de réguler l'expression du transgène
- La taille du transgène
- Le type de transgène (ADNc ou siARN)
- Le type cellulaire (cellule quiescente ou non)
- L'organe à cibler
- La diffusion souhaitée
- Le statut immunologique du patient (anticorps neutralisants)
- etc

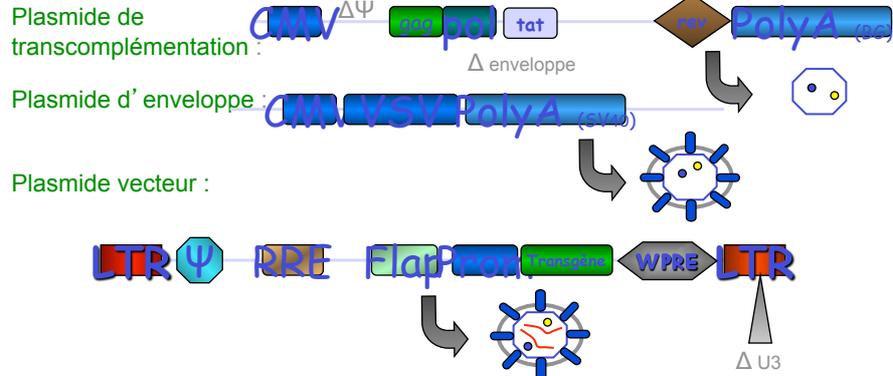
Aujourd'hui, trois types de vecteurs sont efficaces pour le CNS : adénovirus, AAV et lentivirus

Vecteurs AAV



- ! Capacité limitée (d' environ 4,8 kb)
- ! Production à titres élevés (>10¹² TU/ml)
- ! Pas de transport rétrograde
- ! Tropisme dépendant du sérotype / possibilité de modifier le tropisme par modification du sérotype
- ! Immunogénicité innée (protéines de capsid) → AAV non-humain, sérotypes rares
- ! Intégration / génotoxicité ?

Vecteurs lentiviraux



Vecteurs Lentiviraux

- ! Capacité d' environ 8 kb
- ! Production à titres élevés (>10⁹ TU/ml)
- ! Pas de transport rétrograde → pseudotypage avec enveloppe rabique
- ! Tropisme dépendant de l' enveloppe / possibilité de modifier le tropisme par pseudotypage (utilisation d' une enveloppe ectopique)
- ! Pas d' immunogénicité liée au vecteur (sauf certaines enveloppes)
- ! Intégration / génotoxicité

Limites et défis de la vectorologie lentivirale

- ! Production GMP à grande échelle
- ! Efficacité de transduction
- ! Bio-sécurité
- ! Réaction immunitaire
- ! Ciblage spécifique: pseudotypage, ciblage transcriptionnel
- ! Régulation de l' expression du transgène

→ à chacun de ces points répondent des solutions techniques

Production GMP à grande échelle

- ! Production GMP existe déjà par de nombreuses sociétés en France et ailleurs (USA, Europe, Chine, Japon ...)
- ! Systèmes de production par transfection transitoire ou en cellules de transcomplémentation
- ! Up-scaling nécessaire → industrie

Efficacité de transduction

- ! **Amélioration du vecteur** : séquence flap, réduction de la taille, possibilité d'utiliser une RT optimisée par évolution dirigée ...
- ! **Pseudotypage par une enveloppe efficace** : VSVg
- ! **Optimisation de la cassette d'expression** : promoteur, séquences UTR 5' ou 3' (WPRE, introns ...)

Bio-sécurité (I)

- ! **Système de production (RCR)** : séparation des différents éléments du système de production, modification du code génétique afin de minimiser les risques de recombinaison
- ! **Modification des LTR** : délétions de la région U3 en 3' et de la région U5 en 5'
- ! **Mobilisation par des virus endogènes** : risque peu évalué ! Modification de la région PBS/Psi permettrait de réduire ce risque théorique. Eviter les séquences palindromiques près de cette région.

Bio-sécurité (II)

- ! **Readthrough** : risque lié au choix du promoteur (augmente avec un promoteur contenant un enhancer fort), et à la présence de la région U3 (augmente si la région est délétée). Possibilité d'insérer une région insulatrice en U3 ?
- ! **Risque de génotoxicité** : il est très faible comparé aux vecteurs MLV. Il est augmenté avec l'utilisation d'un enhancer fort et diminué avec une délétion de la région U3.
 - Développement de vecteurs non-intégratifs
 - Développement de vecteurs à intégration ciblée

Réaction immunitaire

- ! La réaction immunitaire peut être dirigée contre le vecteur (enveloppe dans le cas d'un vecteur lentiviral)

- !Elle peut également être dirigée contre le transgène

- **Injections répétées ?**

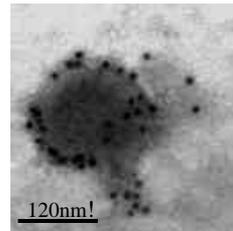
- **Peut on empêcher ces réactions ?**

I. Modifying the envelope plasmid

- Modifying the envelope plasmid (pseudotyping) allows to :

- Restrict expression to specific cell types**
- Broaden expression to all types of cells**

Pseudotyping with the Mokola Virus envelope



- ❖ Intra-striatal injection in the Mouse, Rat and Macaque
- ❖ Intra-hippocampic injection in the Mouse and Rat.

II. Modifying the vector plasmid

Modifying the vector plasmid allows to:

- Introduce particular cis-acting seq. and expression cassettes
- Enhance biosafety (U3 deletion)

III. Modifying the trans-complementation plasmid

Modifying the transcomplementation plasmid allows to :

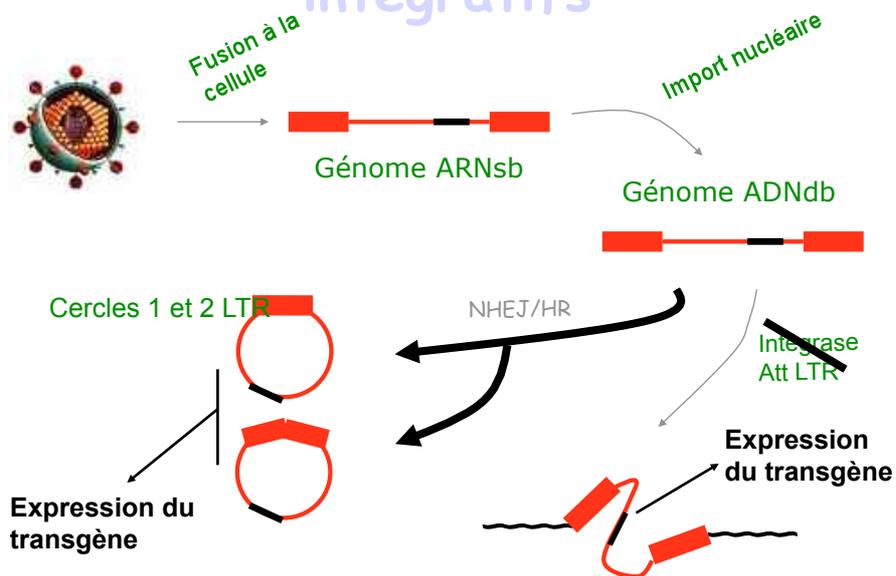
- Enhance biosafety (deletion of accessory genes)
- Modify the « viral cycle »

Pros and cons of lentiviral vectors

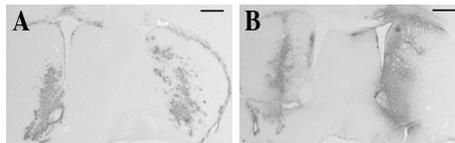
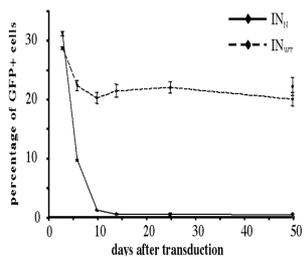
- !Transduction of dividing and non-dividing cells
- !Up to 10⁷ cells
- !Pseudotyped
- !Low immunogenicity and toxicity
- !Stable expression of transgene
- !Easy production

Risk of insertional mutagenesis

Vecteurs lentiviraux non-intégratifs

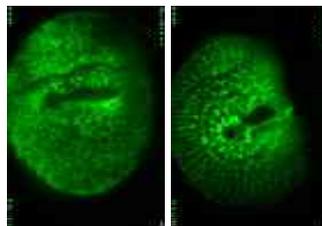


Vecteurs lentiviraux non-intégratifs



Striatum de souris, 1 et 4 semaines après une injection intrastriatale de 30ng p24 de vecteur CMV-GFP

IN_{WT} CMV GFP (50 ngI) IN_R CMV GFP (250 ngI)



Rétine de rat, 1 mois après une injection sous-rétinienne de 250 ng p24 de vecteur CMV-GFP

Décroissance *in vitro* au cours des divisions cellulaires



Rétine de chien, 3 mois après une injection sous-rétinienne de 2.5 μg p24 de vecteur CMV-GFP

Avancées majeures de la thérapie génique

•!Vectorologie

- !Efficacité des vecteurs (Lentivirus et AAV)
- !Biosécurité des vecteurs lentiviraux (SIN et non-intégratifs)

•!Immunologie

- !Inhibition de la présentation d'antigène par mir spécifique
- !Système de régulation humanisé

•!Ex vivo

- !Contrôle des conditions de culture cellulaire
- !Optimisation des conditions de greffe

•!Delivery

- !Développement de la médecine interventionnelle
- ! Méthode physico-chimique de diffusion : convection, électroporation in vivo, PILs

Nouvelles technologies d'intérêt

- !**Domaines de liaison à l'ADN (doigts-de-zinc) synthétiques : ZFP et ZFN**

Lentiviral vectors for transgenesis



La thérapie génique : pourquoi maintenant?

- **Premiers « succès »**
SCID-X, ADA, Rétinite pigmentaire...
- **Avancées dans la recherche de gènes thérapeutiques**
Séquençage du génome, biologie des systèmes, protéomique...
- **Avancées dans la vectorologie**
Vecteurs lentiviraux non-intégratifs, AAV, gutless...
- **Nombreuses technologies d'intérêt**
ZFP, IVC, imagerie, méthode de délivrance ...
- **Forte demande dans certains pays**
Chine premier pays à commercialiser des produits de thérapie génique, plus grand nombre de patients traités

Problèmes qui restent à résoudre

•!Vectorologie

- !Production des vecteurs gutless
- !Intégration des vecteurs AAV
- !Intégration ciblée des vecteurs lentiviraux

•!Immunologie

- !Tolérisation
- !Pré-immunité contre sérotypes communs d'AAV et adénovirus

•!Régulation de l'expression des transgènes

- !Système de régulation non protéique

•!Méthodologie

- !Analyses systématiques et comparatives
- !Choisir et développer les outils à façon pour une application choisie et non l'inverse