



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
ESTADO ACTUAL DE LA TERAPIA GÉNICA

Autor: Marta Prat Gimeno

Fecha: 19 de julio de 2019

Tutor: Luis Miguel Bedoya del Olmo

ÍNDICE

- 1. ÍNDICE**
- 2. RESUMEN**
- 3. INTRODUCCIÓN**
 - 3.1 GENERALIDADES**
 - 3.1.1 DEFINICIÓN**
 - 3.1.2 CLASIFICACIÓN**
 - 3.2 ESTRATEGIAS Y MECANISMOS EMPLEADOS EN TERAPIA GÉNICA**
 - 3.2.1 VIRUS**
 - 3.2.1.1 RETROVIRUS**
 - 3.2.1.2 VIRUS ADENOASOCIADOS**
 - 3.2.2 EDICIÓN GÉNICA**
 - 3.2.2.1 MEGANUCLEASAS**
 - 3.2.2.2 ZFNs**
 - 3.2.2.3 TALENs**
 - 3.2.2.4 CRISPR/Cas9**
 - 3.2.2.5 ARN**
- 4. OBJETIVOS**
- 5. MATERIAL Y MÉTODOS**
- 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
 - 6.1 APLICACIONES CLÍNICAS**
 - 6.1.1 HEMOFILIA**
 - 6.1.2 β-TALASEMIA Y ANEMIA DE FANCONI**
 - 6.1.3 OTRAS PATOLOGÍAS**
 - 6.2 CÉLULAS CAR-T**
 - 6.3 TERAPIAS COMERCIALIZADAS**
 - 6.3.1 DEFICIENCIA DE LIPOPROTEÍNA LIPASA – GLYBERA®**
 - 6.3.2 CEGUERA HEREDITARIA - LUXTURNA®**
 - 6.3.3 ATROFIA MUSCULAR ESPINAL - SPINRAZA®**
 - 6.4 DESAFÍOS Y RETOS DE LA TERAPIA GÉNICA ACTUAL**
- 7. CONCLUSIÓN**
- 8. BIBLIOGRAFÍA**

2.RESUMEN

La terapia génica recoge las técnicas de modificación del genoma para su aplicación en la terapéutica. Se basa en la supresión, inserción o modificación de dianas genéticas para corregir parámetros causantes de enfermedad.

Los principales mecanismos por los que se obtienen estos nuevos fármacos son por la utilización de virus como vectores para introducir la información genética en las células y por el diseño de nucleasas que corten el ADN en un sitio específico del genoma y utilicen sus mecanismos de reparación para conseguir el efecto deseado.

Es un campo muy prometedor que se encuentra aún en su primera fase de desarrollo, existen numerosos ensayos clínicos en curso y desde hace unos años se ha empezado a autorizar la comercialización de algunos de estos fármacos para enfermedades como la ceguera hereditaria o la atrofia muscular espinal. El desarrollo de estas terapias, como las células CAR-T, ya en uso en los hospitales, auguran un cambio radical en las primeras líneas de actuación frente a patologías como el cáncer y enfermedades de origen genético para las que aún no había un tratamiento consolidado y eficaz.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 GENERALIDADES

3.1.1 DEFINICIÓN

La Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH) define la terapia génica como “el conjunto de técnicas que permiten vehiculizar secuencias de ADN o de ARN al interior de células diana, con objeto de modular la expresión de determinadas proteínas que se encuentran alteradas, revirtiendo así el trastorno biológico que ello produce” ⁽¹⁾.

En 1972, Friedmann publica en la revista *Science* un artículo en el que formula el potencial de la terapia génica para tratar aquellas enfermedades hereditarias de origen monogénico ⁽²⁾, desde entonces el estudio del genoma humano y los avances biotecnológicos han permitido ampliar los horizontes de la terapia génica a distintos campos de la medicina, pasando del estudio teórico a su aplicación práctica. En este trabajo se recoge el estado actual de la terapia génica, las técnicas de manipulación genética en las que se basa, las enfermedades en las que puede resultar beneficiosa su aplicación y las perspectivas futuras de esta nueva rama de la terapéutica.

La edición genética comprende la adición, la supresión, la modificación o la modulación de la respuesta de uno o más genes ⁽³⁾. Para situar sus distintas aplicaciones primero es necesario clasificar la terapia génica. Se puede clasificar según el tipo de célula diana y según la estrategia utilizada.

3.1.2 CLASIFICACIÓN

Según el tipo de célula diana se puede clasificar en:

- Terapia génica de células germinales, cuyas modificaciones son heredables.
- Terapia génica de células somáticas, cuyas modificaciones no son heredables.

Actualmente la investigación en la modificación de células germinales está rodeada de controversia por las consideraciones éticas que genera, por lo que este trabajo de “estado actual de la terapia génica” se centrará en la terapia génica en células somáticas, un campo en el que ya se han aprobado algunos fármacos por las agencias reguladoras europea y americana.

Por último, según la estrategia utilizada, la terapia génica puede ser:

- Terapia génica *in vivo* ⁽⁴⁾, en la que se introduce el material genético en el paciente. Como se explicará más adelante, esta estrategia es la empleada en la mayoría de los fármacos comercializados hasta la fecha (Glybera[®], Luxturna[®], Spinraza[®]).
- Terapia génica *ex vivo*, en la que se extraen las células del paciente, se modifica su material genético y se vuelven a introducir en el paciente. Esta técnica es la empleada para obtener las terapias basadas en el uso de células CAR-T ⁽⁵⁾. (Fig. 1)

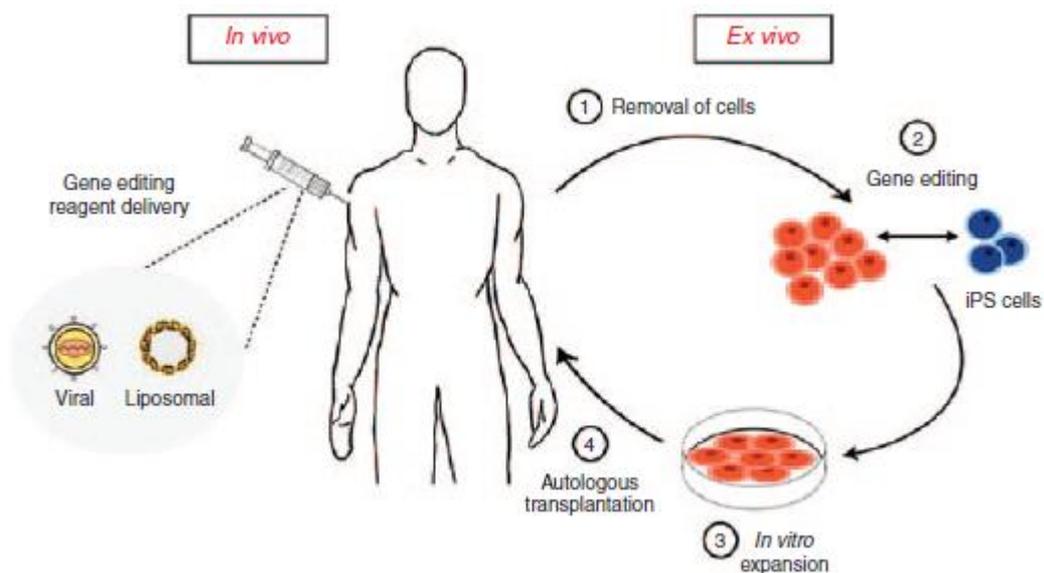


Figura 1. Estrategias de terapia génica *in vivo* y *ex vivo*. Obtenido de Current Progress in Therapeutic Gene Editing for Monogenic Diseases. 2016 ⁽⁶⁾

3.2 ESTRATEGIAS Y MECANISMOS EMPLEADOS EN TERAPIA GÉNICA

A continuación, se recogen los diferentes mecanismos utilizados hasta la fecha.

3.2.1 VIRUS

Debido a su mecanismo de acción los virus se presentaron como los vectores perfectos para introducir material genético en el paciente, en concreto las familias de los retrovirus, virus adenoasociados y lentivirus ⁽⁷⁾.

3.2.1.1 RETROVIRUS

Los primeros vectores en ser estudiados fueron los gamma-retrovirus fueron ya que eran capaces de realizar la transcripción inversa y la integración en el ADN con muy bajo potencial de replicación, así se conseguía introducir material genético en células somáticas ⁽³⁾.

Posteriormente se comenzaron a estudiar otras familias de retrovirus, los lentivirus ⁽⁸⁾ y spumavirus ⁽⁹⁾. Las principales ventajas frente a los anteriores es que estos vectores permiten introducir secuencias genéticas de mayor tamaño y que la región en la que se integran estos vectores no favorece la inserción de protooncogenes, como es el caso de los gammavirus ⁽³⁾. Los retrovirus utilizados en la actualidad están modificados para reducir su genotoxicidad.

3.2.1.2 VIRUS ADENOASOCIADOS

Estos virus se descubrieron en la década de los sesenta en preparaciones de adenovirus. Pertenecen al género *Dependoparvovirus* de la familia *Parvoviridae*. Se caracterizan por no tener capacidad replicativa por sí solos; es necesaria la presencia de adenovirus o herpesvirus para su replicación, de ahí su nombre de adenoasociados (AAV) ⁽¹⁰⁾. Esta característica los convierte en los vectores víricos más adecuados, ya que permiten introducir material genético en la célula, pero no son capaces de replicarse como un virus normal, por lo que provocaran menores efectos secundarios no deseados.

Presentaron dos importantes limitaciones ⁽¹¹⁾: no pueden llevar material genético superior a 5.0 kB de ADN, frente a los retrovirus, que llegan a los 8 kB, y se descubrió que están presentes en muchas especies de mamíferos. Por esa razón en los primeros ensayos estos virus podían provocar una fuerte reacción inmunitaria ⁽¹²⁾. Esto último se solventó con el diseño de nuevos virus adenoasociados recombinantes en los que se había eliminado toda la información vírica salvo la necesaria para integrarse en la célula humana. Para solventar el problema de tamaño se están estudiando una nueva estrategia que consiste en coadministrar dos AAV que lleven cada uno la mitad de un gen, pero aún sigue en fase preclínica ⁽¹³⁾.

En posteriores ensayos se descubrió que algunos serotipos de adenovirus tenían un tropismo natural por distintos tejidos específicos, como el músculo o el hígado. En concreto, se ha determinado que el grado de efectividad de estos virus depende de las interacciones entre la cápsida y los receptores de superficie de las células diana ⁽¹⁴⁾.

Estas características han permitido diseñar virus recombinantes que actúen exclusivamente sobre un tejido diana, reduciendo así los problemas derivados de la integración de material genético en otras zonas del cuerpo ⁽¹⁵⁾.

Junto con el estudio de las características de estos virus también es muy importante tener un conocimiento detallado de las vías de transducción en la célula para conseguir integrar la información genética de manera eficiente. Comprenden múltiples eventos, por lo que la integración puede interrumpirse en cualquier paso y provocar que la respuesta sea ineficaz.

A continuación, se describe el mecanismo de acción del virus dentro de una célula eucariota ⁽¹⁰⁾. El virus (AAV) es reconocido por los receptores celulares e internalizado por endocitosis. En la célula puede escapar del endosoma y ser transportado al interior del núcleo o ser degradado por proteasomas. Ya en el interior del núcleo el virus pierde su cápsida liberando la información genética que contiene.

Se pueden utilizar dos tipos de AAV, de cadena única (single-stranded adeno-associated virus - ssAAV) o autocomplementarios (self-complementary adeno-associated virus – scAAV). Para su transcripción, ssAAV utilizan las ADN polimerasas de la célula eucariota para sintetizar la cadena complementaria. En cambio, scAAV ya se encuentran como una doble hebra de ADN por lo que pueden ser transcritos directamente. El genoma del virus entonces puede

circularizarse y persistir en el núcleo como episoma o se puede integrar en el genoma del hospedador ⁽¹⁰⁾ (fig. 2).

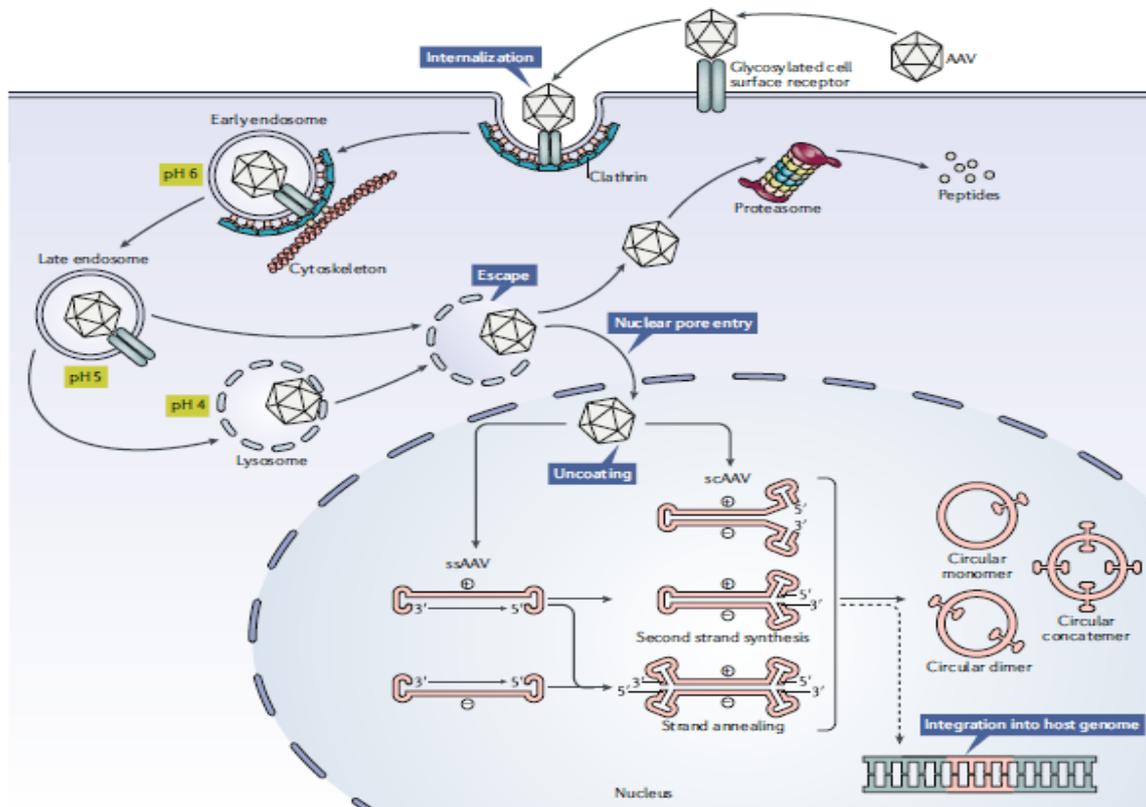


Figura 2. Mecanismo de acción de AAV en células eucariotas. Obtenido de Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. 2019 ⁽¹⁰⁾

Por último, en esta tabla se recogen algunos de los virus utilizados como vectores y sus distintas características, como capacidad o principales efectos adversos. (Fig.3)

	Retrovirus	Lentivirus	Virus adenoasociados
Virus	ARN	ARN	ADN
Capacidad	~ 8 kB	~ 10 kB	~ 5 kB
Inmunidad preexistente en receptor	No	No	Sí
Efectos adversos	Inserción mutagénica	Inserción mutagénica	Respuesta inmunoinflamatoria
Transmisión en células germinales	Frecuente	Sí	Poco Frecuente

Figura 3. Comparativa entre los distintos grupos de vectores víricos. Obtenido de Gene therapy: advances, challenges and perspectives. 2017 ⁽¹⁶⁾

3.2.2 EDICIÓN GÉNICA

Los vectores víricos solo son capaces de adicionar genes, en cambio, las técnicas de edición del genoma permiten la adición, la supresión y la corrección de genes, tanto ex vivo como in vivo. Estas técnicas se basan en los mecanismos de reparación del ADN en células eucariotas. (Fig.4)

Mediante la acción de una nucleasa se provoca un corte bicatenario (double stranded break - DSB) en el ADN de la célula y puede seguir dos vías:

- Unión de extremos no homólogos (nonhomologous end-joining – NHEJ). Se unen los extremos de las cadenas que se han roto obteniendo inserciones o deleciones aleatorias (indels).
- Recombinación homóloga (homology-directed repair – HDR). Utiliza como molde una secuencia de ADN que inserta en el sitio de corte.

La terapia génica puede aprovechar estos mecanismos para modificar el ADN ⁽¹⁷⁾. Las inserciones o deleciones en NHEJ pueden resultar en la inactivación del gen y la introducción de un ADN donante puede utilizar la recombinación homóloga (HDR) para insertar un nuevo gen o corregir uno defectuoso.

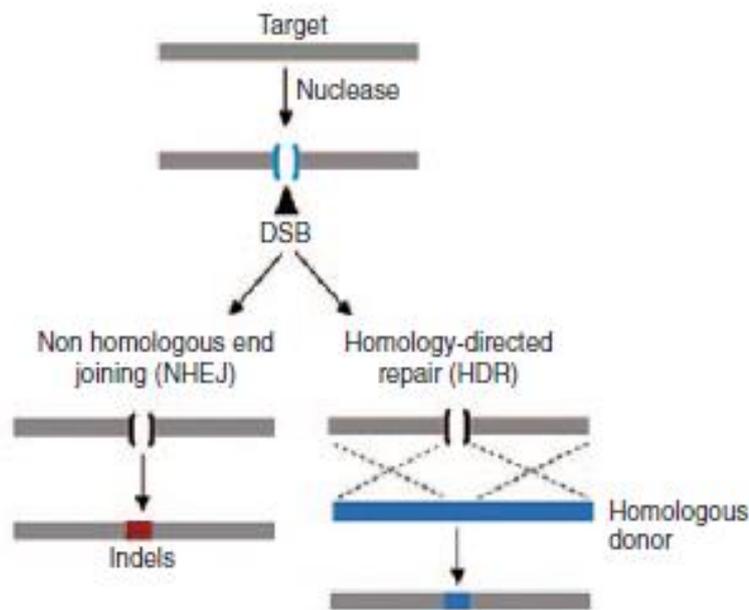


Figura 4. Mecanismos de reparación del ADN en células eucariotas. Obtenido de Current Progress in Therapeutic Gene Editing for Monogenic Diseases. 2016 ⁽⁶⁾

Hasta la fecha se han utilizado cuatro familias de nucleasas con este fin (Fig.5):

3.2.2.1 MEGANUCLEASAS

Las meganucleasas son endonucleasas que reconocen de manera específica largas secuencias de ADN. Su principal limitación consiste en que no cubren todo el genoma por lo que es muy difícil encontrar meganucleasas que reconozcan la región del genoma que coincida con la diana

terapéutica en estudio ⁽¹⁸⁾. Actualmente están en desuso y son las siguientes tres familias de nucleasas específicas las que más se emplean en el campo de la terapia génica.

3.2.2.2 ZFNs

Las ZFNs (Nucleasas con dedos de zinc - zinc finger nucleases) fueron las primeras en ser utilizadas en terapia génica junto con las meganucleasas. Están formadas por la unión del dominio nucleasa de la enzima de restricción Fok1 y varios dominios de dedos de zinc.

Estas nucleasas reconocen el sitio de corte por la especificidad de los dominios de dedos de zinc, se unen al ADN y el dominio Fok1, con actividad enzimática, realiza el corte. La enzima Fok1 solo tiene actividad catalítica en forma de dímero, por lo que se necesitan dos ZFNs por cada diana de corte en el ADN (Fig.5).

Para cada diana terapéutica se debe diseñar por ingeniería genética dos nucleasas específicas, lo que limita su uso y aplicación ⁽¹⁹⁾.

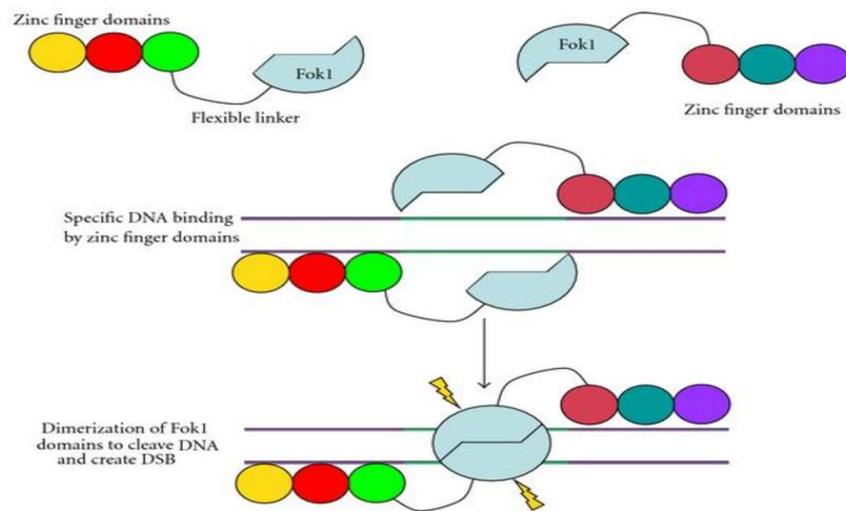


Figura 5. Mecanismo de corte por ZFNs. Obtenido de Targeted In Situ Gene Correction of DysfunctionalAPOEAlleles to Produce Atheroprotective Plasma ApoE3 Protein.2012 ⁽²⁰⁾

3.2.2.3 TALENs

La siguiente familia de nucleasas en estudiarse fueron las TALENs (Nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción - transcription activator-like effector nucleases). Estas nuevas nucleasas también constan de la fusión de un dominio de unión al ADN y un dominio con actividad catalítica. En concreto, de la fusión de un dominio RVD (repeat variable di-residue) que contiene una secuencia de aminoácidos específica de una región concreta, y de un dominio nucleasa derivado de Fok1 ⁽²¹⁾ (Fig.6).

Al igual que las ZFNs, este dominio solo es activo tras su dimerización, por lo que también son necesarias dos TALENs para realizar el corte bicatenario.

La ventaja sobre las nucleasas anteriores es que su diseño es algo más sencillo, por lo que se pueden generar TALENs eficientes y eficaces más rápido.

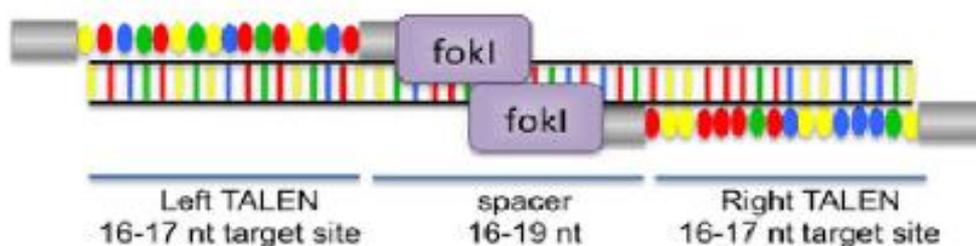


Figura 6. Mecanismo de corte por TALENs. Obtenido de Target Zinc Finger Nucleases in Genome Engineering.2018 ⁽²²⁾

3.2.2.4 CRISPR/Cas9

EL sistema de edición CRISPR/Cas9 (Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas – clustered regularly interspaced palindromic repeats) ha supuesto una revolución en el campo de la edición genética y, por tanto, de su aplicación en la terapia génica. En 2012 se publicó la posible aplicación de estos mecanismos de defensa bacterianos para modificar el genoma de células eucariotas ⁽²³⁾. Este sistema está formado por la endonucleasa Cas9 y por un ARN guía (sgRNA). El sgRNA se une a su región complementaria específica del genoma, que debe ser adyacente a un dominio PAM (protospacer adjacent motif) para ser reconocida por el sgRNA, y la endonucleasa crea el corte.

Este sistema simplifica enormemente la edición del genoma y le confiere una mayor especificidad, ya que si se conoce la secuencia que codifica para el gen que se quiere modificar solo es necesario diseñar el fragmento de ARN complementario para que sirva como guía ⁽¹⁶⁾.

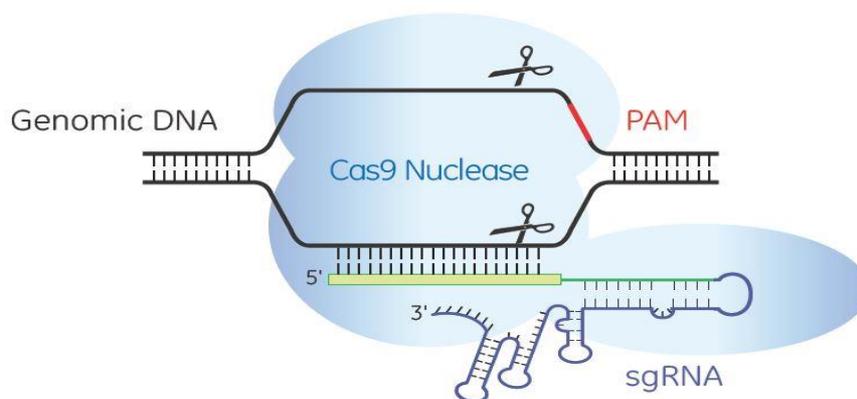


Figura 7. Mecanismo de corte del complejo CRISPR/Cas9. Obtenido de Dharmacon®

3.2.2.5 ARN

La terapia génica se ha ampliado más allá de la edición del ADN, su traducción a ARN es indispensable para expresar un gen, por lo que el ARN se ha convertido también en diana de estudio.

Una estrategia consiste en utilizar ARN interferente (iRNA) para disminuir la sobreexpresión de un gen mutado. Se diseña un iRNA que interrumpa la síntesis proteica de dicho gen, con lo que se consigue disminuir su toxicidad ⁽⁷⁾.

Otra estrategia consiste en emplear nucleótidos antisentido (AONs), que se pueden diseñar para restaurar un correcto marco de lectura en patologías en los que estuviese alterado ⁽⁵⁾.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es conocer el estado actual en el que se encuentra la terapia génica, para ello se han establecido como objetivos secundarios:

- Describir las diferentes técnicas utilizadas hasta la fecha.
- Describir sus aplicaciones clínicas, en especial, las aprobadas por las agencias regulatorias.
- Conocer la proyección y el futuro de la terapia génica en los próximos años.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado una revisión bibliográfica de las publicaciones científicas relacionadas con la terapia génica. Para ello se han utilizado las principales plataformas de acceso a artículos y revistas científicas como “PubMed” y “ScienceDirect” utilizando como palabras clave los términos “therapy”, “gene”, “T-CAR”, “genome editing”, “viral vectors”. Al tratarse de un tema en constante renovación y rápidos avances se ha restringido la búsqueda bibliográfica a estudios publicados en los últimos 5 años, desde 2014.

También se han consultado las páginas webs de las distintas instituciones de referencia como la EMA, la AEMPS y la FDA.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras introducir brevemente el concepto de terapia génica y los mecanismos de obtención que se están estudiando en este apartado de resultados se describen las aplicaciones que pueden tener estas nuevas terapias, tanto las que están en estudio como las ya aprobadas.

6.1 APLICACIONES CLÍNICAS

La terapia génica está aún en sus inicios, por lo que la mayoría de las aplicaciones clínicas de estas técnicas se encuentran todavía en ensayos clínicos. Aquí se recogen algunos de los resultados más prometedores.

6.1.1 HEMOFILIA

Con la aparición de la terapia génica las primeras dianas que se estudiaron fueron las de origen monogenético, como la hemofilia.

La hemofilia es una enfermedad de origen genético en la que la coagulación está comprometida. Se debe a mutaciones en los genes que codifican para los factores de coagulación, en concreto el factor VIII en la hemofilia A y el factor IX en la hemofilia B ⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾. El tratamiento consiste en transfusiones periódicas de factores de coagulación, que tienen una vida media corta en

circulación. Como alternativa a este tratamiento se están realizando estudios clínicos siguiendo distintas estrategias dentro de la terapia génica:

- Virus. Como se ha comentado, algunos serotipos de virus adenoasociados presentan tropismo por el hígado, órgano de síntesis de la mayoría de los factores de coagulación, por lo que se están realizando ensayos clínicos con virus adenoasociados recombinantes que contengan la copia del gen de estos factores para corregirlos de manera permanente ⁽²⁶⁾.
- Edición génica. Varios estudios se basan en el uso de ZFNs, TALENs o CRISPR/Cas9 para la hemofilia A, ya que debido al mayor tamaño del gen del FVIII, no es tan eficaz el uso de vectores virales ⁽²⁷⁾.

6.1.2 β -TALASEMIA Y ANEMIA DE FANCONI

Ambas patologías cursan con anemia por defectos en la hemoglobina, en concreto por mutaciones en el gen que codifica para la cadena de la β -globina. En la β -talasemia, el exceso de α -globina (por defecto de la β), provoca la apoptosis de los eritrocitos, mientras que en la anemia de Fanconi la mutación provoca que los eritrocitos adquieran forma de hoz y obstruyan así los capilares sanguíneos ⁽⁶⁾.

Varios ensayos clínicos están basados en la utilización de nucleasas para insertar el gen de la cadena de β -globina por recombinación homóloga (HDR) sobre las células de progenitores hematopoyéticos ⁽²⁸⁾.

6.1.3 OTRAS PATOLOGÍAS

Otras patologías en las que también se está estudiando la aplicación de la terapia génica en su tratamiento son:

- el uso de ZFNs para insertar genes funcionales de α -L-iduronidasa y iduronidasa-2-sulfatasa en las mucopolisacaridosis de tipo I y II, respectivamente ⁽³⁾.
- El uso de ZFNs para interrumpir la expresión de CCR5 en linfocitos T como posible mecanismo de resistencia a la infección por VIH ⁽²⁹⁾.
- El uso de iRNA para reducir la toxicidad por la expansión de tripletes CAG en la Corea de Huntington ⁽³⁰⁾.

6.2 CÉLULAS CAR-T

Las células tumorales se caracterizan por su capacidad de proliferación sin control, por lo que necesitan una elevada demanda energética. Los metabolitos generados en este ambiente tienen la capacidad de impedir la correcta maduración de células involucradas en la respuesta inmune, con lo que se consigue un entorno de inmunosupresión en que proliferan las células tumorales.

Mediante técnicas de ingeniería genética se han modificado linfocitos T in vitro para que expresen el receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconozca ligandos específicos en las células tumorales ⁽³¹⁾⁽³²⁾.

Actualmente existen dos medicamentos comerciales disponibles, Kymriah[®] y Yescarta[®]. Son células CAR-T que se han modificado con un lentivirus (Kymriah[®]) o un retrovirus (Yescarta[®]) como vector. El vector contiene un gen que codifica para el punto de unión del anticuerpo específico para CD19 (unión específica a célula tumoral), un dominio coestimulador de linfocitos T (para aumentar su persistencia y expansión) y un dominio intracelular para iniciar la señalización de la célula T. Estas células se unirán específicamente a las células que presenten el ligando CD19, los linfocitos B, y desencadenarán la respuesta inmunitaria (Fig.8).

Ambos fármacos están indicados en tumores en células B, concretamente para la leucemia aguda linfoblástica de células B (LAL-B), el linfoma difuso de células B grandes (LBDCG) y el linfoma B primario mediastínico de células grandes (LBPCG) ⁽³³⁾⁽³⁴⁾.

Las células T pueden ser del propio paciente (autólogas) o de un donante (alógenas). En cualquier caso, para su administración es necesario que el paciente reciba una quimioterapia de inmunodeplección previa. Además, tras la perfusión, el paciente debe ser monitorizado para controlar posibles reacciones adversas como el síndrome de liberación de citoquinas, frecuente en estos tratamientos ⁽³⁵⁾.

La terapia con células CAR-T está dirigida a neoplasias hematológicas por ahora, ya que presenta dificultades en su aplicación en tumores sólidos.

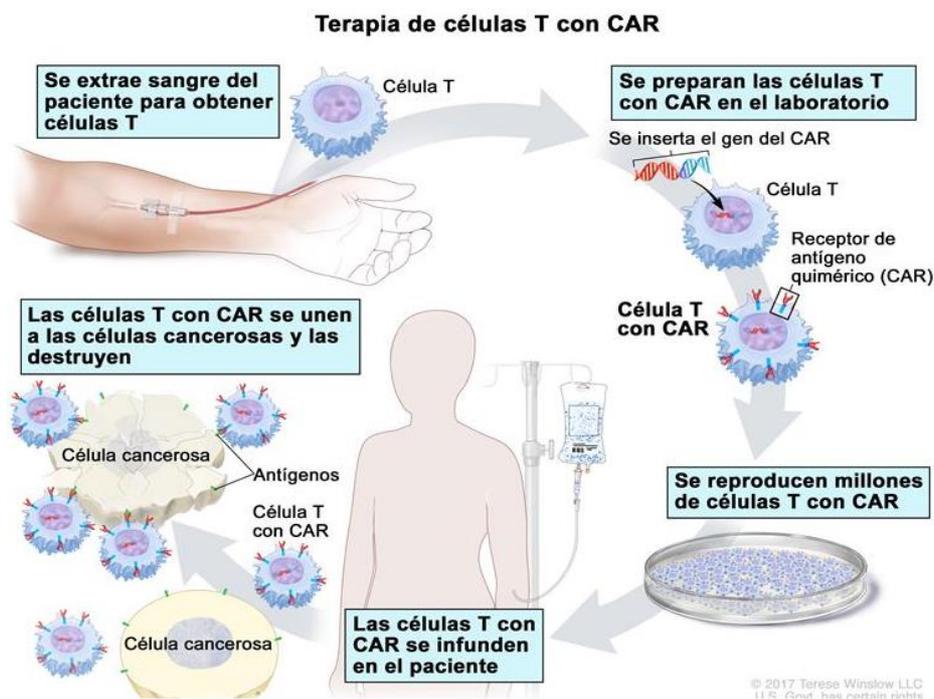


Figura 8. Terapia celular con CAR-T. Obtenido de National Cancer Institute ⁽³⁶⁾

6.3 TERAPIAS COMERCIALIZADAS

En este apartado se recogen las terapias comercializadas a fecha de junio de 2019 por las agencias reguladoras europea (EMA) y americana (FDA).

6.3.1 DEFICIENCIA DE LIPOPROTEÍNA LIPASA - GLYBERA®

La deficiencia de lipoproteína lipasa (DLPL) es una enfermedad genética hereditaria en la que el paciente carece o presenta niveles muy bajos de esta enzima. La lipoprotein-lipasa es la primera enzima del metabolismo de los lípidos, por lo que su carencia provoca una acumulación de los quilomicrones en sangre.

El 25 de octubre de 2012 la EMA autorizó el primer medicamento de terapia génica, Glybera®, para el tratamiento de la DLPL en pacientes adultos que presentasen ataques graves o agudos de pancreatitis a pesar de llevar una dieta baja en grasas.

Glybera® contiene 3×10^{12} copias genómicas de alipogén tiparvovec/ml solución inyectable. Contiene el gen de la lipoproteína lipasa humana y utiliza como vector virus adenoasociados de los serotipos 1 y 2 obtenidos por técnicas recombinantes. Se realiza una única administración de varias inyecciones intramusculares y la psología se deba ajustar en función del peso del paciente.

En los ensayos aportados para su aprobación se observaba una disminución transitoria de los triglicéridos hasta 12 semanas después de la administración y mejoría de los síntomas relacionados con la pancreatitis en los 5 años de seguimiento posterior⁽³⁷⁾.

Actualmente no está comercializado.

6.3.2 CEGUERA HEREDITARIA - LUXTURNA®

El ojo presenta unas características que lo hacen idóneo para la terapia génica, tiene un pequeño tamaño, una organización compartimentalizada, una baja tasa de recambio celular y un bajo riesgo de inmunogenicidad⁽³⁸⁾.

La proteína de 65 kilodalton específica del epitelio pigmentario retinal (RPE65) se localiza en las células epiteliales de la retina y participa en las reacciones que transforman una señal lumínica en una señal eléctrica en la retina. El defecto genético de esta proteína causa ceguera hereditaria y está relacionado con otras patologías oculares como retinosis pigmentaria o amaurosis congénita de Leber.

El 22 de noviembre de 2018, hace 6 meses, se autorizó el medicamento Luxturna®, con indicación en “el tratamiento de adultos y niños con pérdida de visión debido a una distrofia retiniana asociada a la mutación RPE65 bialélica confirmada y que tienen suficientes células retinianas viables”.

Luxturna® contiene 5×10^{12} genomas vectoriales de voretigén neparvovec/ml de solución. Por técnicas de ADN recombinante se ha obtenido este fármaco, que contiene el gen de RPE65 y utiliza como vector un virus adenoasociado de serotipo 2 modificado. Su administración es por una única inyección intraretiniana en cada ojo y dada la complejidad de este órgano, la cantidad máxima que se puede administrar es de 0,3 ml⁽³⁹⁾ (Fig.9).

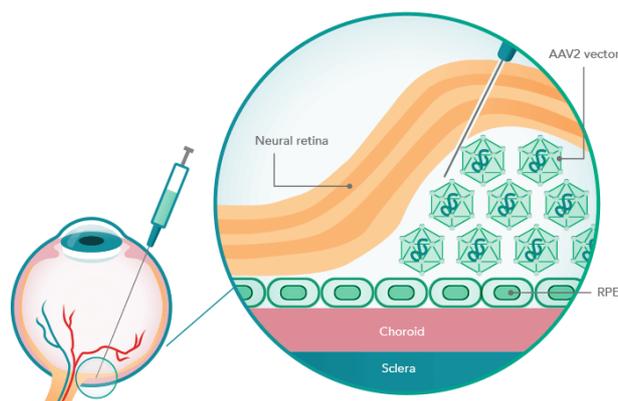


Figura 9. Administración de Luxturna®. Obtenido de Luxturna® (40)

Los estudios de eficacia demuestran una mejora de la agudeza visual y de la sensibilidad a la luz en los 3 años siguientes al tratamiento, resultados muy alentadores para el futuro de la terapia génica (39)(41).

6.3.3 ATROFIA MUSCULAR ESPINAL - SPINRAZA®

La atrofia muscular espinal es una patología neuromuscular que aparece a los pocos meses de vida que cursa con una rápida progresión y corta esperanza de vida. Está relacionada la presencia de mutaciones en el gen de supervivencia de la neurona motora (SMN). Las neuronas motoras van perdiendo su funcionalidad y aparecen atrofia y problemas respiratorios graves en el infante que acaban en ventilación permanente o muerte.

El 30 de mayo de 2017 se aprobó en Europa la comercialización de Spinraza®, autorizado por la FDA EN 2016, con indicación para el tratamiento de esta patología.

El principio activo de Spinraza® es nusinersén, un nucleótido antisentido que se une al pre-ARN mensajero del gen SMN. La unión provoca que se exprese en el ARNm un exón adicional que permite la traducción de la proteína SMN completa y funcional (43).

Spinraza® se administra por vía intratecal por punción lumbar y consiste en varias dosis en los primeros días de tratamiento y, posteriormente, una dosis de mantenimiento cada 4 meses. Los ensayos han reflejado un aumento de la supervivencia y de las capacidades motoras de los pacientes tratados con spinraza frente a los del grupo control (42)(43).

En junio de 2019 la FDA ha aprobado un nuevo fármaco con indicación para la atrofia muscular espinal, Zolgensma®, que contiene virus adenoasociados recombinantes con el gen SMN. Su administración es intravenosa (44). La EMA está estudiando aún su aprobación.

6.4 DESAFÍOS Y RETOS DE LA TERAPIA GÉNICA ACTUAL

La terapia génica ha abierto un nuevo camino en la medicina moderna, sin embargo, las distintas técnicas aún presentan algunos problemas en la práctica que deben ser solucionados para conseguir fármacos seguros y eficaces.

Los vectores virales pueden provocar genotoxicidad y reacciones de inmunogenicidad indeseadas que disminuyan su eficacia. Las herramientas de edición génica deben de ser muy específicas para evitar la modificación del genoma en sitios distintos de las dianas terapéuticas. También supone una complicación las limitaciones de tamaño de los complejos genéticos o la elevada carga necesaria para conseguir una respuesta terapéutica. Son medicamentos de origen biológico y, al ser terapias recientes, todavía no existen datos sobre su seguridad a largo plazo, solo existen pronósticos ⁽³⁾⁽⁴⁵⁾.

Además de las limitaciones en la clínica, por último hay que añadir el alto coste de producción de cada tratamiento y las dificultades de escalado y las implicaciones éticas que supone la modificación del genoma de células germinales.

7. CONCLUSIÓN

Se ha realizado una revisión del panorama actual de la terapia génica, desde el empleo de virus como vectores al diseño de nucleasas específicas para cada diana terapéutica. El cada vez mayor conocimiento de las técnicas de manipulación del genoma y de los mecanismos de acción de cada enfermedad permite que los avances en este campo sean cada vez más rápidos.

Su principal aplicación hasta ahora ha sido para el tratamiento de enfermedades de origen genético en las que se encuentra afectado un único gen, véase por ejemplo la deficiencia de lipoprotein lipasa. Aunque todavía hay pocos fármacos comercializados existen numerosos ensayos clínicos que llevarán a la autorización de más terapias en los próximos años que se extenderán a otros campos de la medicina, como el cáncer.. A fecha de 12 de julio de 2019 hay 145 ensayos clínicos registrados en ClinicalTrials.gov, la base de datos del Instituto de Salud Nacional de Estados Unidos (NIH), bajo el término de “terapia génica”, la mayoría relacionados con virus adenoasociados recombinantes, y hasta 590 ensayos con células CAR-T.

Todavía existen muchas limitaciones a estas terapias, como se ha indicado en el apartado anterior, pero es una disciplina en continuo desarrollo. Se puede afirmar que la terapia génica ha abierto la puerta a nuevas dianas terapéuticas, a un nuevo concepto de medicina, a la modificación del genoma humano.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ronchera-Oms C.L, González J.M.Terapia Génica. Farmacia Hospitalaria – tomo II. 2002; 6. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria
2. Friedmann T, Roblin R. Gene Therapy for Human Genetic Disease? Science. 1972;175(4025):949-955
3. Dunbar C, High K, Joung J, Kohn D, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. Science. 2018;359(6372)
4. Wang D, Gao G. State-of-the-Art human gene therapy: part I. Gene delivery technologies. Discov Med. 2014;18(97):67-77
5. Wang D, Gao G. State-of-the-Art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and applications. Discov Med. 2014;18(98):151-161
6. Prakash V, Moore M, Yáñez-Muñoz R. Current Progress in Therapeutic Gene Editing for Monogenic Diseases. Molecular Therapy. 2016;24(3):465-474
7. Keeler A, ElMallah M, Flotte T. Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions. Clinical and Translational Science. 2017;10(4):242-248
8. Naldini L, Trono D, Verma I. Lentiviral vectors, two decades later. Science. 2016;353(6304):1101-1102
9. Russell DW, Miller AD. Foamy virus vectors. J.Virol. 1996.(70):217-222
10. Wang D, Tai P, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. Nature Reviews Drug Discovery. 2019;18(5):358-378
11. Colella P, Ronzitti G, Migozzi F. Emerging issues in AAV-mediated in vivo gene therapy. Molecular Therapy. 2018;(8):87-104
12. Mingozzi F, Maus M, Hui D, Sabatino D, Murphy S, Rasko J et al. CD8+ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. Nature Medicine. 2007;13(4):419-422
13. McClements M, MacLaren R. Adeno-associated virus dual vector strategies for gene therapy encoding large transgenes. Yale J. Biol. 2017;(90):611-623
14. Agbandje-McKenna M, Kleinschmidt J. AAV capsid structure and cell interactions. Methods Mol. Biol. 2011;(807):47-92
15. Clement N, Grieger JC. Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. Molecular Therapy. 2016;(3):16002
16. Gonçalves G, Paiva R. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. Einstein (São Paulo). 2017;15(3):369-375.
17. Carroll D. Genome Engineering with Targetable Nucleases. Annual Review of Biochemistry. 2014;83(1):409-439.
18. Silva G, Poirot L, Galetto R, Smith J, Montoya G, Duchateau P et al. Meganucleases and Other Tools for Targeted Genome Engineering: Perspectives and Challenges for Gene Therapy. Current Gene Therapy. 2011;11(1):11-27
19. Zhu C, Gupta A, Hall V, Rayla A, Christensen R, Dake B et al. Using defined finger–finger interfaces as units of assembly for constructing zinc-finger nucleases. Nucleic Acids Research. 2013;41(4):2455-2465
20. Papaioannou I, Simons J, Owen J. Targeted In Situ Gene Correction of DysfunctionalAPOEAlleles to Produce Atheroprotective Plasma ApoE3 Protein. Cardiology Research and Practice. 2012:1-16.

21. Cermak T, Doyle E, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*. 2011;39(12):e82-e82
22. Asadi S. Target Zinc Finger Nucleases in Genome Engineering. *CP Allergy and Immunology*. 2018;1[1]: 001
23. Doudna J, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096-1258096
24. Nathwani A, et al. Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(21):1994-2004
25. Rangarajan S, et al. AAV5–Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(26):2519-2530
26. Anguela X, Sharma R, Doyon Y, Miller J, Li H, Haurigot V. Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice. *Blood*. 2013;122(19):3283-3287
27. Park, Sung, JJ, Lee, et al. Functional correction of large factor VIII gene chromosomal inversions in hemophilia a patient-derived iPSCs using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*. 2015; (17): 213–220
28. Hoban M, Cost G, Mendel M. Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*. 2015;125(17):2597-2604
29. Tebas P, et al. Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(10):901-910
30. Keeler A, Sapp E, Chase K. Cellular Analysis of Silencing the Huntington’s Disease Gene Using AAV9 Mediated Delivery of Artificial Micro RNA into the Striatum of Q140/Q140 Mice. *Journal of Huntington's Disease*. 2016;5(3):239-248
31. Guedan S, Calderon H, Posey A, Maus M. Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 2019;12:145-156
32. Xie F, Liang R, Li D, Li B. Regulatory T Cells and Their Clinical Applications in Antitumor Immunotherapy. *Engineering*. 2019;5(1):132-139
33. KYMRIAHA (tisagenlecleucel). Ficha técnica. CIMA-AEMPS. 2018
34. YESCARTA (axicabtagen ciloleucel) Ficha técnica. CIMA-AEMPS. 2018
35. Grigor E, Fergusson D, Kekre N, Montroy J, Atkins H, Seftel M et al. Risks and Benefits of Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR-T) Therapy in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transfusion Medicine Reviews*. 2019;33(2):98-110
36. CAR T Cells: Engineering Immune Cells to Treat Cancer. National Cancer Institute. 2019
37. GLYBERA® (alipogén tiparvovec). Ficha técnica. CIMA-AEMPS. 2012
38. Wright A. Long-Term Effects of Retinal Gene Therapy in Childhood Blindness. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(20):1954-1955
39. LUXTURNA® (Voretigén neparvovec). Ficha técnica. CIMA-AEMPS. 2018
40. Mechanism of Action | LUXTURNA™ (voretigene neparvovec-rzyl) HCP 2019
41. Russell S, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65 -mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017;390(10097):849-860
42. Mendell J. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(18):1713-1722
43. SPINRAZA® (nusinersen). Ficha técnica. CIMA-AEMPS. 2017

44. ZOLGENSMA[®] (onasemnogene abeparvovec-xioi). Doc. Aprobación. FDA. 2019

45. Rees H, Liu D. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. Nature Reviews Genetics. 2018;19(12):770-788