

Artículos de revisión

Las enfermedades raras y la esperanzadora solución con terapia génica

Dra. Gloria González Aseguinolaza

Directora del Programa de Terapia Génica y Regulación de la Expresión Génica.
Centro de Investigación Médica Aplicada. Universidad de Navarra. Pamplona

¿Qué es la terapia génica?

La terapia génica, como ya podemos intuir por el nombre, la componen todos aquellos tratamientos que utilizan como fármaco el material genético^{1,2}. Este material genético puede ser tanto moléculas de ADN como de ARN (ácidos nucleicos) con diferentes funciones, como la expresión de proteínas, la regulación de la expresión de genes o la corrección del material genético. La transferencia del material genético a la célula debe lograr un efecto biológico, siempre con una finalidad terapéutica (figura 1).

¿Qué aplicaciones tiene la terapia génica?

La terapia génica se puede aplicar tanto a enfermedades de origen hereditario como a enfermedades adquiridas como el cáncer, enfermedades infecciosas o enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer^{1,2}. La aplicación de la terapia génica en las enfermedades genéticas es la más intuitiva, especialmente para el tratamiento de aquellas causadas por la afectación de un único gen o monogénicas. Dentro de las enfermedades monogénicas susceptibles de ser tratadas con terapia génica nos encontramos un gran número de las denominadas enfermedades raras o minoritarias, las cuales afectan a un número muy pequeño de pacientes a escala mundial y en la mayoría de los casos carecen de un tratamiento adecuado, además de ser incurables³. La terapia génica podría ser la solución para muchas de estas enfermedades. El primer ensayo clínico de terapia génica, realizado en los años noventa del siglo xx, tuvo como objetivo el tratamiento de una enfermedad monogénica rara debida a la deficiencia de la enzima adenosina deaminasa (ADA), la cual provoca una inmunodeficiencia combinada grave (SCID). En este ensayo pionero, linfocitos T extraídos del paciente se transformaron con el gen ADA en su versión correcta y se volvieron a introducir en el paciente, obteniéndose un beneficio transitorio que sin embargo supuso un paso de gigante para la terapia génica, ya que se había logrado llegar al paciente⁴.

¿Cómo se realiza?

El paso clave para el correcto funcionamiento de la terapia génica es introducir el material genético en el interior de la célula diana y en la mayoría de los casos llegar hasta su núcleo, donde se encuentra la maquinaria necesaria para que el fármaco, el ácido nucleico, resulte activo. Para entrar en la célula y en su núcleo

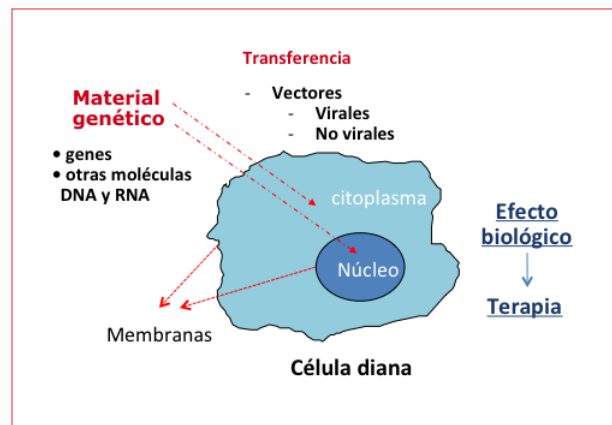


Figura 1. Esquema de la transferencia del material genético a la célula

Dirección para correspondencia:

Gloria González Aseguinolaza. Centro de Investigación Médica Aplicada. Universidad de Navarra. Av. Pío XII, 55. 31008 Pamplona

es necesario atravesar las respectivas membranas que los envuelven. Ambas están compuestas por lípidos y proteínas y tienen un carácter altamente hidrofóbico. Los ácidos nucleicos son moléculas cargadas negativamente, lo cual hace difícil su paso a través de la membrana. Si bien es cierto que el ADN o el ARN «desnudos» pueden lograr atravesar estas barreras y ejercer su efecto, su eficacia es muy baja y por ello es necesaria la utilización de vehículos que actúen como transportadores del material genético al interior de la célula.

Existen dos grandes familias de vehículos, también denominados vectores: los vectores virales y los no virales. Los vectores virales aprovechan la capacidad natural de los virus para introducir su material genético en el interior de la célula y producir sus propias proteínas. Para generar un vector viral de terapia génica, normalmente se eliminan del genoma viral aquellos genes necesarios para su replicación y los responsables de su patogenicidad y se sustituyen por el material genético que queremos transportar (figura 2). Decimos normalmente, porque para algunas aplicaciones es interesante mantener la capacidad replicativa del virus, como en el caso de los virus oncolíticos, con capacidad de matar células tumorales. Los vectores no virales tratan de imitar las características de los virales en ausencia de los potenciales efectos patogénicos de estos últimos. En su mayoría están compuestos por partículas poliméricas o lipídicas que empaquetan el material genético en su interior y lo protegen en su paso al interior de la célula. A los vectores no virales se les presupone un mejor perfil de seguridad que a los virales; sin embargo, su eficacia en cuanto a capacidad de transporte del material genético es menor. La utilización de un tipo de vectores u otro dependerá de la aplicación^{1,2}.

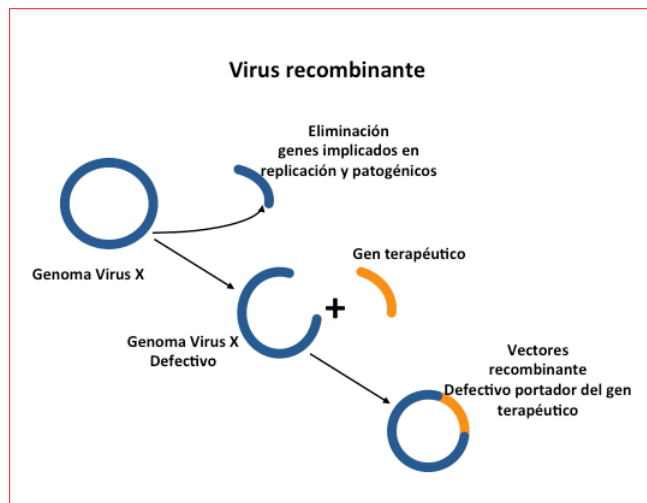


Figura 2. Esquema de generación de un vector viral

¿Cuáles son los vectores más utilizados en la terapia génica de enfermedades raras?

El tratamiento de una deficiencia genética requiere, por un lado, una alta eficiencia de transferencia del material genético a la célula y, por otro, que la expresión del gen terapéutico se mantenga, idealmente, durante toda la vida del paciente. En la actualidad los vehículos de transferencia génica que mejor cumplen ambas características se encuentran dentro del grupo de los vectores virales. Más concretamente, los vectores virales capaces de modificar de forma estable las células están basados en retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados.

El genoma de los **retrovirus** está compuesto por una molécula de ARN de cadena sencilla de unas 10 kb; estos vectores portan una transcriptasa reversa, encargada de producir, utilizando como molde el ARN viral, una molécula de ADN que se integra en el genoma de la célula. De esta forma los retrovirus modifican de forma estable el genoma celular; es decir, que permanecen toda la vida de la célula y además pasan de la célula madre a la célula hija. Los retrovirus contienen en su genoma tres genes y las secuencias necesarias para su empaquetamiento en la cápside viral, para activar la transcripción y para integrarse. Para la construcción de un genoma recombinante se eliminan los tres genes virales y en su lugar se introduce el material genético portador del gen terapéutico y las secuencias reguladoras necesarias para su expresión. Los retrovirus poseen una capacidad de clonaje de alrededor de 10 kb. Los retrovirus más utilizados actualmente, por mostrar un mejor perfil de seguridad y tener capacidad de transferir el material genético tanto a células en división como quiescentes (no en división), son los lentivirus, derivados del VIH. Los vectores virales basados en retrovirus no son muy eficaces tras ser administrados de forma sistémica pero sí para la modificación de células en división en una placa de cultivo. Por esta razón, los vectores retrovirales se emplean principalmente para la modificación *ex vivo*. Es decir, se extraen las células del paciente, se modifican con el vector retroviral en una placa de cultivo, se seleccionan las células correctamente modificadas, se amplifican y se reintroducen en el paciente. Esta terapia génica se denomina terapia génica *ex vivo*, en contraposición a la terapia génica *in vivo*, en la cual se administra el vector viral directamente al individuo (figura 3). El principal inconveniente de los primeros retrovirus utilizados en terapia génica se deriva de la potencial activación de genes oncogénicos debida a su integración en el cromosoma. Sin embargo, los últimos avances técnicos en este campo han permitido obtener vectores más seguros, que a pesar de integrarse presentan un menor riesgo de mutagénesis insercional⁵.

Los **adenovirus** son virus más complejos, portadores de un genoma de ADN de doble cadena de 35 kpb. Los primeros virus recombinantes basados en adenovirus que se han venido utilizando carecen de genes implicados principalmente en su replicación pero mantienen una gran parte del genoma, lo cual hace que produzcan una reacción inflamatoria e inmune significativa y sean eliminados del organismo en un tiempo relativamente corto. Estos vectores se han mostrado eficaces para el desarrollo de vacunas o tratamientos antitumorales, pero no para el tratamiento de enfermedades monogénicas. Sin embargo, recientemente se han desarrollado vectores adenovirales en los cuales se han eliminado todos los genes virales manteniendo únicamente las secuencias necesarias para su empaquetamiento. Estos nuevos adenovirus, denominados adenovirus de alta capacidad, pueden modificar de forma muy eficiente algunos tipos celulares como los hepatocitos

y permiten la expresión estable de la proteína recombinante durante largo tiempo, además de presentar una muy alta capacidad de clonaje, pudiendo portar más de un casete de expresión. Sin embargo, existen dificultades en cuanto a su producción a gran escala y en grado clínico⁶.

Hoy en día los vectores virales con mayor proyección en el tratamiento de las enfermedades raras monogénicas son los **virus adenoasociados (AAV)**. Estos virus, pertenecientes a la familia de los parvovirus, contienen un genoma de ADN de cadena sencilla con únicamente dos genes, *Rep* y *Cap*, que pueden eliminarse para ser sustituidos por la construcción recombinante terapéutica. Únicamente son necesarias las secuencias implicadas en el empaquetamiento del genoma, dos secuencias de 150 bases presentes en los extremos del genoma. Los AAV son virus no patogénicos y defectivos; en replicación, de forma natural requieren la coinfección por otros virus como los adenovirus para completar su ciclo. Son además virus que prácticamente no producen reacciones inflamatorias ni respuestas inmunes, lo cual permite una expresión sostenida y prolongada del transgén. Otra ventaja de estos virus es la existencia de al menos 12 serotipos distintos, los cuales presentan pequeñas variaciones en las proteínas que componen la cápside y que condicionan su entrada en diferentes tipos celulares. De esta forma podemos utilizar un serotipo distinto dependiendo del tejido o tipo celular que queramos modificar. Los AAV son los vectores más utilizados actualmente para el tratamiento de enfermedades monogénicas y han mostrado un excelente perfil de seguridad. La principal limitación de estos vectores es su baja capacidad de clonaje, 4,5-5 kb, que en muchos casos se ha resuelto sintetizando versiones reducidas del gen^{1,2}.

¿Cuáles son las diferentes estrategias que se aplican al tratamiento genético de las enfermedades raras? Actualidad y futuro

La estrategia terapéutica para las enfermedades raras con un mayor potencial, particularmente en aquellas debidas a la deficiencia de un único gen, es la basada en la complementación génica, es decir, la introducción en la célula del gen deficitario (o su sustitución en caso de ser defectuoso) responsable de la enfermedad (figura 4). Son muy numerosos los estudios realizados en distintos modelos animales donde se demuestra la eficacia de esta terapia. La complementación génica se puede realizar *ex vivo*, modificando las células del paciente con lentivirus y volviéndolas a reintroducir en el enfermo, o *in vivo*, mediante la administración de virus recombinantes como los virus adenoasociados. Como ya adelantábamos anteriormente, el primer ensayo de terapia génica se realizó en pacientes con inmunodeficiencia severa debida a la ausencia de la proteína ADA, utilizando linfocitos del paciente modificados con un retrovirus y logrando un efecto transitorio. Este efecto transitorio fue debido a la corta vida media de las células elegidas⁴. La solución a este problema se encontró en la utilización de células madre de la médula ósea como células diana de la modificación genética. Estas células se multiplican indefinidamente y dan lugar a los diferentes tipos celulares de la sangre, por lo que una vez que el genoma del retrovirus se integra en ellas toda su progenie portará el gen terapéutico. Esta estrategia cuenta ya con importantes éxitos, como la curación de los niños con inmunodeficiencias severas de distinto origen, o los niños con adrenoleucodistrofia^{7,8}.

En cuanto a la administración sistémica de vectores virales, los avances más importantes se han logrado utilizando virus adenoasociados. Son impactantes los resultados alcanzados en el tratamiento de cegueras

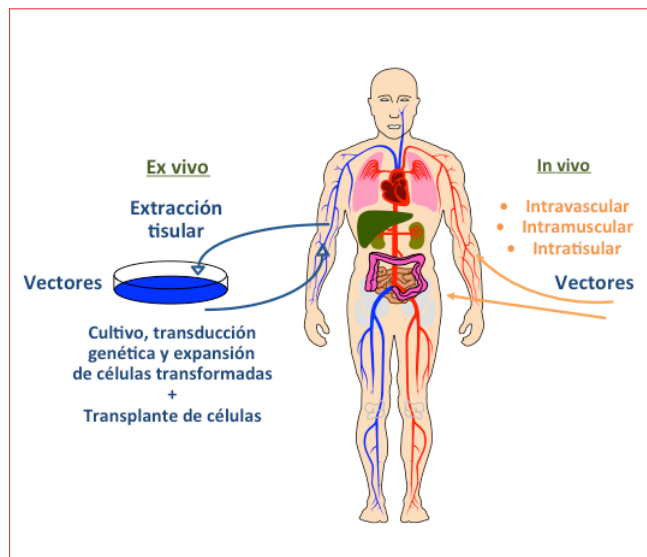


Figura 3. Terapia génica *in vivo* frente a terapia génica *ex vivo*

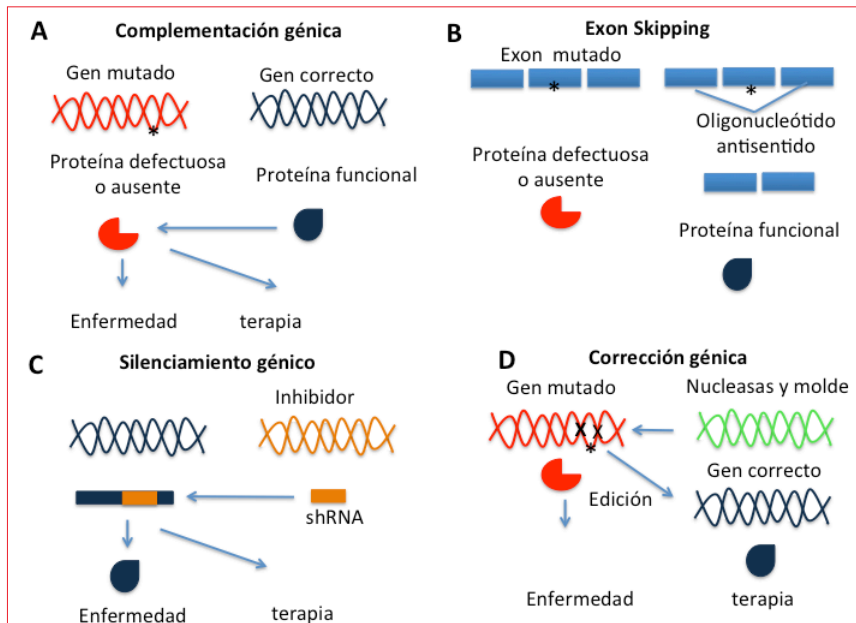


Figura 4. Diferentes estrategias para el tratamiento genético de las enfermedades raras

congénitas, donde varios pacientes han experimentado una clara mejoría en la visión⁹; o el tratamiento de la hemofilia B, donde pacientes con una patología muy severa han pasado a presentar un grado de la enfermedad muy moderado¹⁰. Son muchos los ensayos clínicos en marcha para el tratamiento de diferentes enfermedades raras con AAV, como la enfermedad de Sanfilippo, la porfiria aguda intermitente, la enfermedad de Canavan y un largo etcétera.

En algunas enfermedades hereditarias el problema reside en la alteración de uno de los fragmentos o exones codificantes de la proteína, presentando mutaciones que introducen codones de parada tempranos e impiden la síntesis de la proteína funcional. En estas enfermedades, una alternativa terapéutica es el uso de oligonucleótidos antisentido, que permiten evitar la inclusión del exón mutante en el ARN mensajero, con lo que se genera una proteína más corta pero funcional. Esta estrategia, denominada *exon skipping* (figura 4), se está empleando en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne¹¹.

Muchas enfermedades raras se asocian a la acumulación o producción excesiva de metabolitos tóxicos. Asimismo, la ausencia de una proteína con actividad enzimática se asocia a la acumulación de sus sustratos, que en algunos casos pueden ser muy tóxicos. Éste es el caso, por ejemplo, de la porfiria aguda intermitente, donde la deficiencia de la tercera enzima implicada en la ruta de síntesis del hemo, la porfobilinógeno deaminasa (PBGD), hace que se acumulen los metabolitos neurotóxicos ácido aminolevulínico y porfobilinógeno; o la hiperoxaluria, en la cual la ausencia de la enzima L-alanina glioxilato aminotransferasa (AGT), implicada en el metabolismo del glioxilato, provoca la acumulación de oxalato, que causa un importante daño renal. En ambas enfermedades, y en otras con características similares, una nueva estrategia que se está testando es la administración de moléculas de ARN de interferencia (que pueden eliminar de forma específica un determinado ARN mensajero) dirigidas a reducir la expresión de enzimas implicadas en la producción del sustrato de las enzimas deficitarias. Por ejemplo, en el caso de la porfiria aguda intermitente, la estrategia es reducir la expresión de la primera enzima de la ruta de síntesis del hemo, de manera que la concentración de los metabolitos tóxicos disminuya¹².

Por último, la estrategia que actualmente se contempla como un verdadero desafío es la corrección o edición génica, que se basa en introducir, en el genoma de la célula, el gen correcto o bien corregir la mutación que provoca la enfermedad. Este método utiliza nucleasas «a medida» capaces de editar el ADN en secuencias muy específicas. Existen tres tipos distintos: las nucleasas «dedos de zinc» (*Zn-finger nucleases*), las TALEN y las basadas en el complejo bacteriano CRISPR-Cas9¹³. Estos complejos tienen la capacidad de unirse a un lugar específico del ADN celular. Tras la unión, la nucleasa realiza cortes precisos en las dos cadenas del ADN, que activan la maquinaria de reparación de la célula; y en presencia de un ADN con secuencias que permiten la recombinación homóloga, en lugar de simplemente reparar el corte, la nucleasa integra, en el lugar de la sección, la secuencia de ADN correcta. Esta estrategia nos permite alterar el ADN genómico de la célula integrando la secuencia terapéutica (figura 4).

¿Cuáles son las barreras a las que se enfrenta su desarrollo?

Los mayores problemas con los que se enfrenta la terapia génica son los efectos secundarios adversos observados en algunos de los ensayos clínicos. Éste es el caso de la muerte de un paciente con deficiencia de la enzima ornitintrascarbamilasa tras la administración de un adenovirus¹⁴, el desarrollo de algunos casos

de leucemia en niños con inmunodeficiencias severas tras ser tratados con células madre modificadas con un retrovirus¹⁵, o el desarrollo de una hepatitis moderada en pacientes con hemofilia tratados con AAV¹⁶. Sin embargo, estos datos han ayudado a la búsqueda de estrategias para evitar posibles complicaciones, como el desarrollo de vectores más seguros y la limitación de la respuesta inflamatoria o inmune⁵.

Por otro lado, el cuello de botella para la realización de ensayos clínicos de terapia génica se encuentra principalmente en la producción de los vectores virales a gran escala y en grado clínico. Como ya comentábamos, son numerosos los ensayos en animales que han mostrado sin lugar a dudas la eficacia terapéutica de la terapia génica. Sin embargo, pasar de un ratón a un humano supone multiplicar por 1.000 la cantidad de vector necesaria para el tratamiento. Este punto continúa siendo un verdadero desafío en el tratamiento de patologías en las cuales el órgano afectado es relativamente grande o es necesario corregir muchas células del individuo. El trabajo de diferentes grupos de expertos en esta dirección irá ofreciendo soluciones a estos problemas.

Futuro de la terapia génica en el tratamiento de las enfermedades raras

La mayoría de las enfermedades raras carecen hoy por hoy de una alternativa terapéutica satisfactoria. Muchas de estas enfermedades afectan a niños que bien no sobreviven a la enfermedad o lo hacen con graves secuelas. Los importantes avances logrados en los últimos tiempos en cuanto a desarrollo tecnológico de los vectores y el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la enfermedad invitan al optimismo y nos permiten aventurar que en los próximos años la terapia génica podría convertirse en el tratamiento de cabecera para estas enfermedades. De hecho, el primer tratamiento de terapia génica ya ha llegado al mercado en el mundo occidental. El fármaco es un virus adenoasociado para el tratamiento de una enfermedad rara, la deficiencia en lipoproteína lipasa, que será inicialmente administrado en pacientes con pancreatitis recurrentes¹⁷. Esperemos que este sólo sea el primero de una larga lista de nuevos tratamientos para enfermedades raras basados en la transferencia génica.

Bibliografía

1. Wang D, Gao G. State-of-the-art human gene therapy: part I. Gene delivery technologies. *Discov Med*. 2014; 18(97): 67-77.
2. Wang D, Gao G. State-of-the-art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and clinical applications. *Discov Med*. 2014; 18(98): 151-161.
3. Boudes PF. Gene therapy as a new treatment option for inherited monogenic diseases. *Eur J Intern Med*. 2014; 25(1): 31-36.
4. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID initial trial results after 4 years. *Science*. 1995; 270(5.235): 475-480.
5. Chira S, Jackson CS, Oprea I, Ozturk F, Pepper MS, Diaconu I, et al. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget*. 2015. (Epub ahead of print)
6. González-Aparicio M, Mauleón I, Alzuguren P, Bunuales M, González-Aseguinolaza G, San Martín C, et al. Self-inactivating helper virus for the production of high-capacity adenoviral vectors. *Gene Ther*. 2011; 18(11): 1.025-1.033.
7. Sauer AV, Di Lorenzo B, Carriglio N, Aiuti A. Progress in gene therapy for primary immunodeficiencies using lentiviral vectors. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014; 14(6): 527-534.
8. Biffi A, Montini E, Lorioli L, Cesani M, Fumagalli F, Plati T, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science*. 2013; 341(6.148): 1233-158.
9. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN Jr, Mingozzi F, Bennicelli J, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*. 2008; 358(21): 2.240-2.248.
10. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2011; 365(25): 2.357-2.365.
11. Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, Feng L, Torelli S, Anthony K, et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet*. 2011; 378(9.791): 595-605.
12. Yasuda M, Gan L, Chen B, Kadirvel S, Yu C, Phillips JD, et al. RNAi-mediated silencing of hepatic Alas1 effectively prevents and treats the induced acute attacks in acute intermittent porphyria mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(21): 7.777-7.782.
13. Mussolino C, Mlambo T, Cathomen T. Proven and novel strategies for efficient editing of the human genome. *Curr Opin Pharmacol*. 2015; 24: 105-112.
14. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*. 2003; 80(1-2): 148-158.
15. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003; 302(5.644): 415-419.
16. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med*. 2006; 12(3): 342-347.
17. Ylä-Herttuala S. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European Union. *Mol Ther*. 2012; 20(10): 1.831-1.832.