



## **FACULTAD DE FARMACIA**

### **Grado en Farmacia**

# **Terapias génicas en pacientes con inmunodeficiencia combinada severa por déficit de adenosina desaminasa (ADA-SCID)**

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Febrero de 2023

**Autora: Sara Pérez Pérez**

Modalidad: Revisión bibliográfica

Tutora: Encarnación Rodríguez Cazorla

# ÍNDICE

I.- RESUMEN .....	3
II.- ANTECEDENTES .....	4
II.1.- Inmunodeficiencias primarias y tipos.....	4
II.2.- Causas del ADA-SCID .....	6
II.3.- Modos de diagnóstico del ADA-SCID.....	7
II.4.- Tipos de terapia existentes .....	7
II.5.-Terapias Génicas: generalidades.....	9
III. OBJETIVOS .....	12
IV- MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
IV.1 Diseño.....	13
IV.2 Fuente de obtención de datos.....	13
IV.3 Estrategia de búsqueda .....	13
IV.4 Criterios de selección.....	14
IV.5 Resultados de la búsqueda.....	14
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
V.1.- El primer ensayo clínico con terapia génica.....	16
V.2.- Evaluación del primer ensayo clínico 10 años después.....	19
V.3.- Ensayo con células madre hematopoyéticas combinado con busulfán .....	21
V.4.- Ampliación y seguimiento del ensayo con CMH combinado con busulfán.....	24
V.5.- Aprobación del protocolo con CMH combinado con busulfán .....	28
V.6.- Ensayo con un lentivirus autoinactivante en CMH.....	31
VI.- CONCLUSIONES .....	35
VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	36

## I.- RESUMEN

El déficit de adenosina desaminasa (ADA) genera una acumulación de metabolitos tóxicos de adenosina, afectando sobre todo a los linfocitos, lo que conduce al desarrollo de inmunodeficiencia combinada severa por déficit de ADA (ADA-SCID). Los pacientes afectados son los denominados “niños burbuja”, extremadamente susceptibles a las infecciones, que, sin tratamiento, pueden morir a edades muy tempranas. Uno de los tratamientos existente es la terapia de reemplazo enzimático (TRE), que debe administrarse de por vida y puede no ser útil a largo plazo. El trasplante de células madre hematopoyéticas sí es curativo, pero con frecuencia no se encuentra un donante adecuado. Por todo esto, se buscó una vía de tratamiento alternativa como es la terapia génica.

En el año 1995 se publicó el primer ensayo de terapia génica, no sólo para el ADA-SCID, sino también el primero de la historia. Se utilizó un vector gammaretroviral con la secuencia de ADN complementario del gen *ADA*. Se realizó una transfusión autóloga de linfocitos T con el vector, demostrando que el tratamiento era seguro, aunque al mantener la TRE durante el ensayo, la causa de la mejora inmunológica no fue del todo concluyente. Actualmente se utilizan células madre hematopoyéticas (CMH) del paciente, por tener la capacidad de colonizar la médula ósea de manera estable, así como de generar distintos linajes celulares. En 2002 se publicó un ensayo con CMH también con un vector gammaretroviral, y aplicando acondicionamiento no mieloablativo previo de la médula ósea. Los resultados a largo plazo fueron positivos, sin requerir la mayoría de pacientes el uso de TRE, lo que dio lugar a que la EMA aprobara este tratamiento en 2016 con el nombre de Strimvelis. En 2020 se notificó un caso de leucemia en un paciente que había recibido este tratamiento, lo que indujo a estudiar vectores alternativos. En 2021 se publicó un ensayo, también con acondicionamiento previo, en el que se utiliza un vector lentiviral con capacidad de autoinactivación, lo que lo hace más seguro. Se registró una reconstitución inmunológica en 48 de los 50 pacientes tratados (2 de ellos necesitaron TRE), y no se observó ningún efecto adverso.

## **II.- ANTECEDENTES**

### **II.1.- Inmunodeficiencias primarias y tipos**

En el mundo médico y farmacéutico, especialmente a partir del siglo XX, se ha ido estableciendo la idea de que existen enfermedades que pueden afectar a grupos sociales específicos, desde la etapa infantil, transcurriendo por la edad adulta y hasta llegar a la etapa anciana. Este nuevo pensamiento, fundamentado esencialmente por el descubrimiento y aparición de nuevas enfermedades, ha provocado una transformación radical tanto en los tratamientos como enfoques de estas afecciones por parte de la industria médica y farmacéutica.

Las inmunodeficiencias, descubiertas fundamentalmente en el siglo pasado, son un conjunto de estados patológicos por los que el sistema inmunológico no funciona adecuadamente, de forma que los pacientes son vulnerables a las infecciones. Se clasifican en dos grandes categorías: inmunodeficiencias primarias e inmunodeficiencias secundarias.

Las inmunodeficiencias primarias suelen estar presentes desde el nacimiento, caracterizándose por ser afecciones genéticas, las cuales suelen ser hereditarias, debilitando el sistema inmune y favoreciendo la aparición de enfermedades oportunistas. Las inmunodeficiencias secundarias suelen aparecer como consecuencia de otros trastornos o por efectos secundarios de la medicación, normalmente, aparecen en edades avanzadas y son más frecuentes.

El comité de expertos de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) reconoce más de 400 formas de inmunodeficiencias primarias que se pueden clasificar en 9 grupos según el componente del sistema inmune alterado<sup>1</sup>:

1. Inmunodeficiencias que afectan a la inmunidad celular y humoral
2. Síndromes relacionados con inmunodeficiencias
3. Inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos.
4. Enfermedades por desregulación inmune.

5. Defectos congénitos del número y/o función de los fagocitos
6. Defectos de la inmunidad innata e intrínseca.
7. Trastornos autoinflamatorios
8. Déficit del complemento
9. Anemia aplásica.

Dentro del primer grupo se encuentran las inmunodeficiencias combinadas severas (SCID, *Severe Combined Immunodeficiency*), que son las formas más graves de inmunodeficiencias primarias, también conocidas como enfermedad del niño burbuja. Éstas se subdividen en SCID T- B+ (déficit solamente de linfocitos T) y SCID T- B- (déficit de linfocitos T y B)<sup>2</sup>. La inmunodeficiencia combinada severa por déficit de adenosina desaminasa (ADA-SCID) pertenece a este segundo grupo, caracterizándose por el déficit de células NK (*Natural Killer*), además de linfocitos T y B.

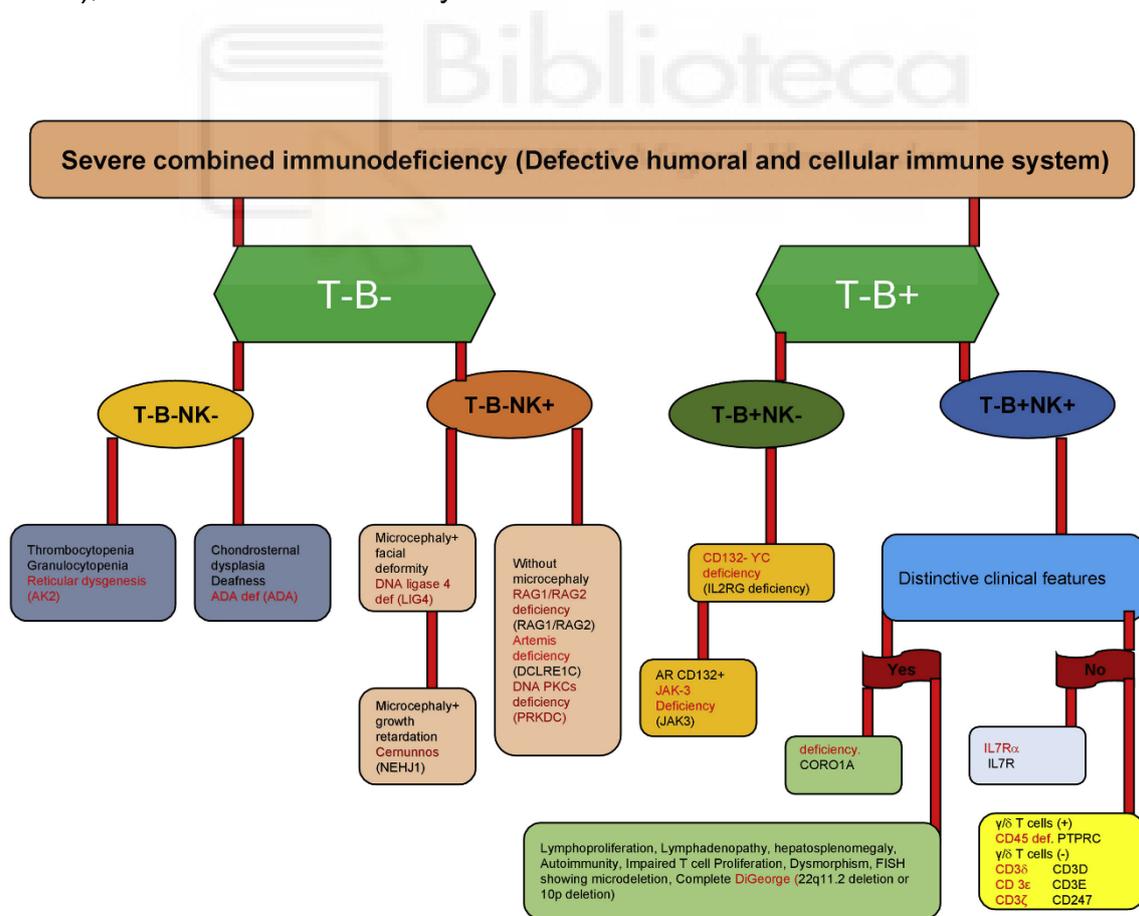
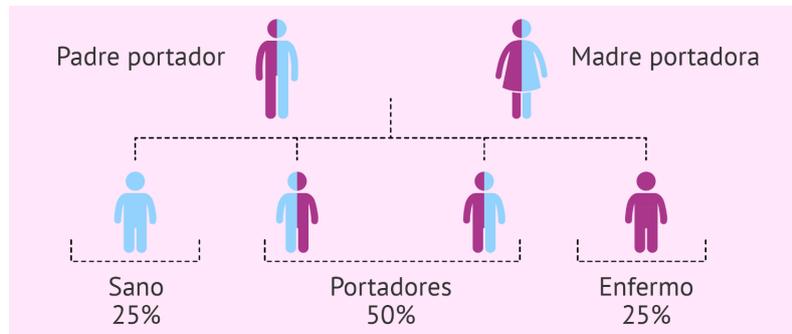


Figura 1. Clasificación de las SCID y patologías que derivan de éstas<sup>2</sup>

## II.2.- Causas del ADA-SCID

El ADA-SCID se caracteriza por ser autosómica recesiva. Esto quiere decir que para heredarla es necesario la adquisición del gen defectuoso de ambos progenitores.



**Figura 2. Mecanismo de la herencia autosómica recesiva<sup>3</sup>**

La causa de esta enfermedad es la ausencia de la enzima adenosina desaminasa (ADA) debida a mutaciones en ambas copias del gen *ADA*, un gen de 32kb con 12 exones situado en el brazo largo del cromosoma 20<sup>4</sup>. La ausencia de la enzima ADA como origen de esta inmunodeficiencia fue identificada en el año 1972 por Eloise Giblett (1921-2009), investigadora pionera en el campo de la Genética<sup>5</sup>.

La enzima ADA forma parte del metabolismo de las purinas, su ausencia provoca la acumulación de adenosina, desoxiadenosina y desoxiadenosina trifosfato (dATP). La acumulación de estos metabolitos es tóxica, incrementando la apoptosis de los timocitos (linfocitos T inmaduros), induciendo una señalización alterada de los receptores de células T y B, y afectando negativamente a la replicación y reparación de ADN<sup>2</sup>.

Esta enzima, aunque se expresa de manera ubicua, presenta niveles más altos en los tejidos linfoides<sup>6</sup>, interviniendo en el correcto desarrollo y mantenimiento del sistema inmune<sup>7</sup>.

Se estima que actualmente la incidencia del ADA-SCID en Europa es de 1:375000 a 1:66000 nacidos vivos<sup>6</sup>.

Los síntomas relacionados con el ADA-SCID incluyen<sup>8</sup>:

- Incorrecto desarrollo del infante (concretamente, falta de peso y de crecimiento).
- Infecciones graves con capacidad potencialmente mortal (meningitis, neumonía y sepsis).
- Infecciones oportunistas (neumonía neumocística, infecciones causadas por hongos e infecciones virales).
- Infecciones más frecuentes (otitis, sinusitis, diarrea, candidas en la boca o zona del pañal, infecciones y erupciones cutáneas y hepatitis).

### **II.3.- Modos de diagnóstico del ADA-SCID**

Muchos pacientes son diagnosticados durante los primeros 6-12 meses de vida, debido a la observación de infecciones oportunistas recurrentes.

Para diagnosticar el ADA-SCID existen los siguientes mecanismos<sup>6</sup>:

- 1- Prueba genética: se analiza el ADN del paciente con el fin de identificar mutaciones en ambas copias del gen que codifica la enzima ADA. Se conocen al menos 70 mutaciones distintas causantes de la enfermedad.
- 2- Prueba bioquímica: a partir de una muestra de sangre, se analiza el nivel de la actividad catalítica de la enzima ADA. Se considera un diagnóstico positivo cuando la actividad enzimática es de <1% con respecto a la actividad normal.
- 3- Pruebas indirectas: como en la citometría de flujo o un hemograma completo, en busca de linfocitopenia, aunque en la infancia temprana pueden aparecer niveles normales de IgG por transferencia de la madre a la placenta.

### **II.4.- Tipos de terapia existentes**

- Terapias paliativas de los síntomas

El objetivo que tienen las terapias paliativas es fundamentalmente aliviar los síntomas causados por la enfermedad, así como los efectos secundarios de

otros posibles tratamientos. En el ámbito de la ADA-SCID, estos cuidados paliativos consisten esencialmente en la denominada terapia de reposición con inmunoglobulina, antibióticos y antimicóticos. Por tanto, la terapia paliativa va encaminada a evitar o eliminar las infecciones oportunistas, pero no es curativa<sup>9</sup>.

- Terapia de reemplazo enzimático (TRE)

Dado que esta deficiencia es una enfermedad metabólica sistémica, y como los nucleósidos pueden atravesar membranas biológicas, esto desencadenó el intento de la transfusión sanguínea con el fin de aportar la enzima faltante. Sin embargo, hoy sólo se utiliza en situaciones de emergencia y no como tratamiento a largo plazo<sup>10</sup>.

Actualmente se utiliza la enzima ADA bovina conjugada con polietilenglicol (PEG-ADA). El PEG reduce la respuesta inmune a la enzima de origen bovino y aumenta la vida media de ésta<sup>11</sup>. La Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU (FDA) aprobó en 2019 el uso de este medicamento (Recovi), que se administra vía intramuscular una vez por semana. En Europa, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) sólo permite el uso compasivo. Se recomienda la iniciación de la TRE tras el diagnóstico de ADA-SCID mientras se planea la terapia curativa definitiva (trasplante a partir de un donante o terapia génica). Si estas terapias no fueran posibles se recomienda continuar con la TRE<sup>12</sup>.

- Trasplante de células madre hematopoyéticas (CMH)

Se trata de un proceso que busca restaurar la función de la médula ósea mediante la infusión de células madre hematopoyéticas a partir de un donante, que permite que se formen células sanas en la médula ósea del receptor. Los pacientes presentan una supervivencia del 86% cuando el donante es un hermano histocompatible y desciende a un 43% en caso de donantes haploidénticos no relacionados<sup>12</sup>.

Los trasplantes se pueden realizar con acondicionamiento mieloablativo previo mediante el uso de fármacos citotóxicos (busulfán o ciclofosfamida). De esta manera se elimina la médula ósea del paciente antes de realizar el trasplante. Sin embargo, se ha observado que los trasplantes sin acondicionamiento previo

tienen una tasa de supervivencia significativamente mayor (81% frente a un 54%)<sup>12</sup>.

Los estudios científicos demuestran la capacidad del trasplante de CMH, en caso de donantes compatibles, para la curación de anomalías metabólicas e inmunitarias a largo plazo<sup>13</sup>, por eso es la opción de preferencia si existe un hermano compatible con el paciente. Sin embargo, esta situación ocurre solamente en un 20% de los casos de ADA-SCID<sup>12</sup>.

- **Terapia génica**

Debido a la baja probabilidad de realizar un trasplante de donantes adecuados, se hace necesario buscar alternativas para la curación de estos pacientes. Por otro lado, la enzima ADA se expresa en todos los tejidos y los niveles requeridos para una actividad inmune normal son bajos, con lo que es un gen ideal para realizar ensayos de terapia génica.

Strimvelis es el único tratamiento basado en terapia génica, aprobado por la EMA en 2016<sup>14</sup>. Existen además otros ensayos clínicos, algunos muy recientes. En el apartado de Resultados y Discusión se encuentran una revisión de bibliografía disponible al respecto.

## **II.5.-Terapias Génicas: generalidades**

Se pueden definir como terapias experimentales, las cuales consisten en la inserción de un gen funcional en las células de pacientes con una patología, con el fin de corregirla. Las técnicas de terapia génica son utilizadas con la finalidad de tratar un trastorno alterando la composición genética del paciente como alternativa a las cirugías o la medicación. Aparte de las enfermedades hereditarias, este tipo de terapia también se puede usar para tratar algunos tipos de cáncer<sup>15</sup>.

Las terapias génicas se pueden clasificar en dos grandes categorías:

- *in vivo*: se introduce el gen directamente en el paciente

- *ex vivo*: se extraen células, normalmente del paciente, se modifican con el gen *in vitro* y se vuelven a introducir en el paciente.



**Figura 3. Terapia génica in vivo y ex vivo<sup>16</sup>**

En este tipo de terapias se utilizan unos vehículos, llamados vectores, los cuales tienen el objetivo de transferir un gen exógeno al interior de la célula del paciente, lo que se conoce como transducción. Hay una gran variedad de vectores, pero los podemos clasificar en dos grandes grupos: virales y no virales. Los vectores no virales son aquellos que utilizan métodos físicos (electroporación) o químicos (liposomas) para la transducción del material genético. Los vectores virales son virus modificados que permiten introducir material genético exógeno en el interior de una célula. Los más utilizados son los vectores adenovirales, los adenoasociados y los retrovirales<sup>17</sup>.

El genoma de éstos últimos consiste en dos moléculas de ARN protegidas por una cápside proteica y una envuelta lipídica que facilita la infección de la célula hospedadora. A continuación, se produce la transcripción inversa de su ARN a ADN complementario, y éste es transportado al núcleo para su integración en el genoma de la célula. El hecho de que los vectores retrovirales puedan integrarse en el genoma de la célula hospedadora supone una ventaja frente a los otros tipos de vectores virales, ya que se transcribe como cualquier otro gen de ésta, y se trasmite con cada replicación celular<sup>17</sup>. Sin embargo, un problema de los retrovirus es la posibilidad de mutagénesis insercional, interrumpiendo la

secuencia de un gen del paciente o promoviendo la activación de oncogenes. Esta última situación se describió en dos niños que desarrollaron leucemia tras un tratamiento con terapia génica para SCID ligada al cromosoma X<sup>18,19</sup>.

Dentro de los vectores retrovirales encontramos los vectores gammaretrovirales y los lentivirus. Los lentivirus pueden transducir células en división o quiescentes, mientras que los gammaretrovirus sólo pueden transducir células en división.

El primer ensayo de terapia génica en humanos aprobado por la FDA en 1990 fue, precisamente, para tratar a dos niñas con ADA-SCID<sup>20</sup>. Desde entonces se han realizado miles de ensayos clínicos, y se han aprobado varios tratamientos. En 2003, China fue el primer país en aprobar un medicamento (Gendicine) para tratar ciertos tipos de tumores. El primer medicamento aprobado por la EMA fue Glybera en 2012, para el tratamiento del déficit de lipoproteína lipasa, una enfermedad enzimática muy grave<sup>21,22</sup>.



### III. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica con el fin de poder analizar los tipos de terapia génica disponibles para pacientes con ADA-SCID, y determinar sus beneficios y posibles riesgos frente a los demás tipos de terapias existentes para esta misma patología.



## **IV- MATERIALES Y MÉTODOS**

En este apartado se detallará de forma clara y concisa el diseño del Trabajo de Fin de Grado y el procedimiento que se ha utilizado para seleccionar la información que se expone a continuación. La realización del presente trabajo fue autorizada por la Oficina Evaluadora de Proyectos de la Universidad Miguel Hernández con la autorización (*Anexo 4*).

### **IV.1 Diseño**

Revisión bibliográfica de artículos, ponencias, ensayos clínicos y libros científicos del ámbito de ciencias de la salud referentes a la inmunodeficiencia combinada severa y más concretamente a la provocada por la deficiencia de ADA.

### **IV.2 Fuente de obtención de datos**

Se obtuvieron los datos de la consulta directa a las siguientes bases de datos bibliográficas del ámbito de ciencias de la salud: principalmente MEDLINE (vía PubMed), pero también The Cochrane Library, Scopus, web of Science y bases de datos hospitalarias.

### **IV.3 Estrategia de búsqueda**

En primer lugar, para seleccionar las palabras clave se utilizó la página web de Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS). Se consideró adecuado el uso de los siguientes Medical Subject Heading (MeSH): "Severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency". La ecuación de búsqueda para su empleo en la base de datos MEDLINE (vía PubMed) fue: Search: "Severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency" [Supplementary Concept] Sort by: Most Recent

La estrategia se adaptó a cada una del resto de bases de datos que se consultaron. La búsqueda y selección final de los artículos se hizo entre septiembre y diciembre de 2022.

#### **IV.4 Criterios de selección**

Con el fin de obtener la información más adecuada para el trabajo, se escogieron para su estudio los artículos redactados en italiano, inglés y español que cumplieran los siguientes criterios: adecuarse a los objetivos de la búsqueda (ADA-SCID), cuya población de estudio incluyese a menores, y aquellos artículos de revistas que se pudieran recuperar íntegramente.

Para ello, se seleccionó el filtro de "ADA-SCID". Se incluyen los ensayos clínicos, libros, manuales, estudios, ponencias o revisiones científicas, quedando excluidos los informes de casos clínicos concretos por su bajo nivel de evidencia, y por haber sido refutados posteriormente. Un primer cribado se realizó leyendo los títulos y su resumen, excluyendo aquellos cuyo título no se adaptaba a la finalidad buscada o bien no incluyesen un abstracto adecuado. Posteriormente, se realizaron varias lecturas en profundidad de aquellos que superaron la primera criba, descartando los que no se consideraron adecuados para su inclusión en el trabajo.

Con el fin de obtener la mayor cantidad de información relacionada con el tema a tratar, se realizó una búsqueda manual de las referencias bibliográficas de los artículos que fueron seleccionados, incluyéndose los que se ajustaban a los criterios indicados anteriormente.

#### **IV.5 Resultados de la búsqueda**

En función del criterio de búsqueda seleccionados y aplicando los filtros anteriormente explicados, se obtuvieron un total de 417 artículos: En Pubmed se obtuvieron 324 (77,69%), en Scopus 70 (16,78%) y en The Cochrane Library 3 (0,72%) y 10 (2,39%) en la base de datos hospitalarias. De los obtenidos, tras leer su título y resumen, se seleccionaron un total de 70 artículos. Finalmente, se decidió elegir sólo los artículos referentes al primer ensayo clínico que se realizó para esta enfermedad, los artículos sobre los ensayos clínicos que dieron lugar a la aprobación de un tratamiento por la EMA, y la publicación más reciente, con fecha de 2021, sobre un ensayo clínico en el que se utiliza una estrategia diferente y más segura que en los anteriores.

La fecha de publicación de los artículos se encuentra comprendida entre 1976 y 2021. Los estudios analizados fueron principalmente artículos científicos y revisiones. Todos los artículos estaban redactados en inglés salvo uno de ellos que estaba redactado en español. La población objeto de estudio son niños, en sus primeros años de vida. Por tanto, el periodo de seguimiento se corresponde con el tiempo en que los infantes sufren la enfermedad, es decir, desde su detección hasta su curación o defunción.



## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1.- El primer ensayo clínico con terapia génica

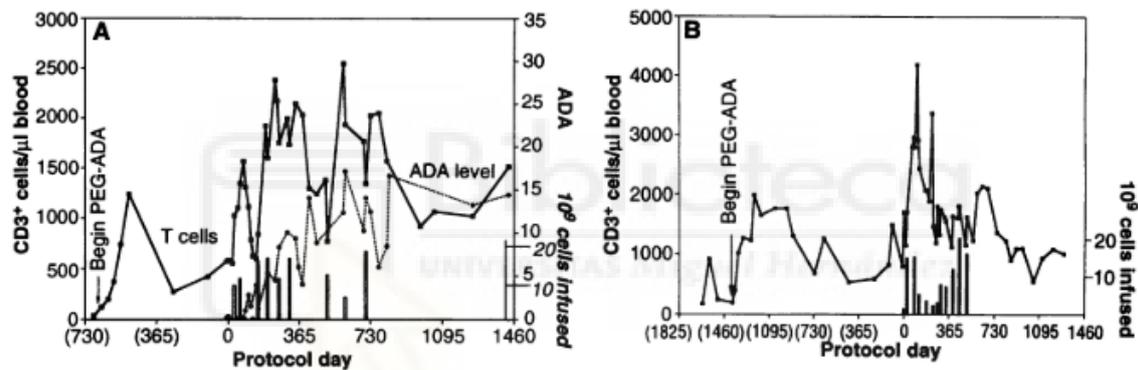
En el año 1990, se inició el primer ensayo clínico de la historia con terapia génica en humanos, cuyos resultados se publicaron en 1995<sup>20</sup>. Se utilizó un vector gammaretroviral con el ADN complementario del gen de la adenosina desaminasa (ADA) bajo el control del promotor y secuencias potenciadoras LTR (*Long Terminal Repeat*) de la región 5' del vector. Éste se usó para la transducción *ex vivo* de los linfocitos T de dos niñas (pacientes 1 y 2) con ADA-SCID.

Previamente al inicio del tratamiento, ambas pacientes fueron tratadas con PEG-ADA durante al menos 9 meses, esto con objeto de reconstituir al menos parcialmente su sistema inmunológico, así como para aumentar el número de linfocitos T en sangre periférica para su obtención y transducción con el vector. Durante el tratamiento se continuó con la administración de PEG-ADA para no poner en peligro la vida de las pacientes, en caso de que la terapia génica no funcionara.

Se obtuvieron muestras de células T de las pacientes y se crearon cultivos donde se indujo su proliferación, a continuación, se modificaron con el vector recombinante y finalmente se reinfundió a las pacientes entre los 9 y 12 días posteriores. Se realizaron un total de 11-12 infusiones por paciente durante los siguientes dos años.

La paciente 1, de 4 años de edad al inicio del ensayo, había tenido varias infecciones y un crecimiento muy lento hasta los 26 meses de edad. Después del tratamiento con PEG-ADA, mejoró su crecimiento, el recuento de células T, así como la respuesta proliferativa de los linfocitos frente a mitógenos (factores que actúan en el ciclo celular, favoreciendo la división celular) *in vitro*. Sin embargo, después de 2 años de TRE, los resultados solo eran parcialmente positivos. Se observaba persistencia de la inmunodeficiencia y linfopenia T, incapacidad para generar células normales T citotóxicas, producción defectuosa de inmunoglobulina y respuesta de anticuerpos débiles o ausentes frente a diferentes antígenos de vacunas.

Durante los primeros 5 a 6 meses de tratamiento de la paciente 1 con terapia génica, los niveles de linfocitos T habían mejorado mucho hasta alcanzar valores normales (Fig. 4A). Además, la cantidad de la enzima ADA, casi indetectable inicialmente en los linfocitos sanguíneos, aumentó progresivamente durante los primeros 2 años de tratamiento hasta alcanzar un nivel de aproximadamente la mitad de la concentración encontrada en los portadores heterocigóticos (que tienen sólo un alelo ADA funcional; Fig. 4A). Durante los siguientes 3 años, tanto el número reconstituido de células T de sangre periférica como la concentración elevada de enzima ADA en células T persistieron tras la última administración de tratamiento a la paciente 1. Esto indicaba que las células T periféricas pueden tener una vida más larga de lo que se suponía esperado, y que la expresión génica del vector retroviral no se había silenciado durante ese período (Fig. 4A).



**Figura 4. Recuento de linfocitos T.** A) Paciente 1. B) Paciente 2. Las medidas comenzaron desde el día del diagnóstico de ADA-SCID. Las barras verticales indican las fechas de las infusiones, y su altura representa el número de células infundidas. Los niveles de ADA se indican en nanomoles por minuto por  $10^8$  células. El número de células T está determinado por el total de células CD3+.

La paciente 2, que se inscribió en el ensayo a los 9 años, mostraba unos síntomas más leves que los observados en una SCID clásica, aunque había sufrido varias infecciones graves desde los 3 años. Comenzó el tratamiento con PEG-ADA a los 5 años, mostrando una mejora excelente en el recuento de células T periféricas. No obstante, entre el tercer y cuarto año de TRE reapareció la linfopenia T, la inmunodeficiencia persistía, y presentaba niveles insuficientes de células T citotóxicas frente a antígenos y células alogénicas. Las

isohemagglutininas (anticuerpos que generan aglutinados cuando entran en contacto con hematíes específicos) eran apenas detectables.

Al poco tiempo de comenzar la terapia génica, la paciente 2 mostró un rápido aumento de linfocitos T por encima de los valores normales, aunque estos descendieron a niveles medios-normales a partir de la quinta dosis (Fig. 4B). La cantidad de enzima ADA en los linfocitos T circulantes no aumentó de forma importante con respecto a las bajas cantidades detectadas antes del tratamiento con terapia génica (Fig. 4B). Esto podía deberse a las diferencias en los niveles de transferencia génica alcanzados en estas pacientes. Se realizó una PCR de la secuencia del vector para determinar la proporción de linfocitos T transducidos circulantes en ambas pacientes, encontrándose que en la paciente 1 había 10 veces más células modificadas que en la paciente 2. Esto indicó que la eficiencia de transferencia génica en esta última fue mucho menor.

Por otra parte, para evaluar si había expresión génica del vector, se realizó una transcripción inversa seguida de una PCR, lo que permite detectar el ARN mensajero derivado de éste. Los resultados positivos confirmaron que la expresión del vector persistió a lo largo del ensayo, y estaba correlacionada con la presencia de actividad enzimática ADA en las células T circulantes de ambas pacientes.

Para conocer el efecto de la terapia génica sobre la función inmune, se realizaron una serie de pruebas (test de hipersensibilidad cutánea retardada o DTH, y la actividad citolítica) antes, durante, y tras finalizar el tratamiento en ambas pacientes. Tanto la paciente 1 como la paciente 2 mostraron respuestas DTH positivas, cuando antes del inicio de la terapia ambas eran anérgicas. Se midió la actividad citolítica frente a células alogénicas o frente a células infectadas con influenza-A. La reactividad citolítica de las células T alcanzó valores normales durante el tratamiento en ambas pacientes.

Esta mejora del sistema inmune también tuvo efectos positivos en la función inmunitaria humoral, ya que mejoró de forma significativa el nivel de los anticuerpos a partir del tercer mes de tratamiento. Concretamente, las 2 pacientes tuvieron una mejoría en las respuestas de los anticuerpos a las vacunas contra *Hemophilus influenzae B* (HIB) y el tétanos, y, además, con la

terapia génica los linfocitos periféricos fueron capaces de producir inmunoglobulina M (IgM).

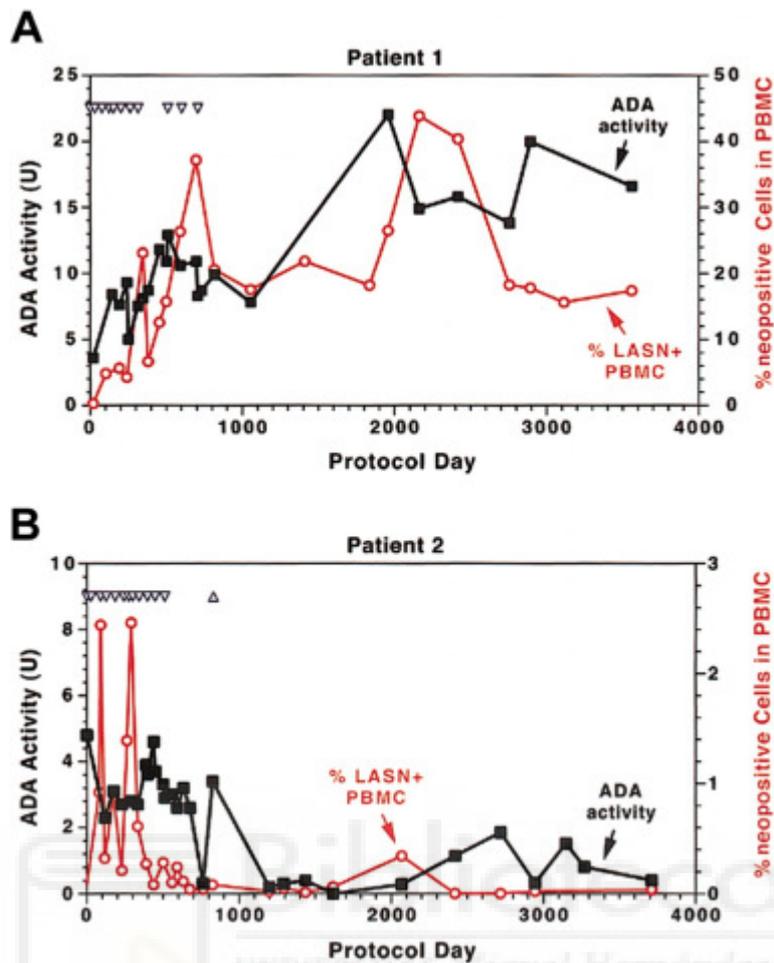
Como consecuencia, tras finalizar el tratamiento ambas pacientes pudieron comenzar a realizar vida normal, aunque ambas seguían recibiendo tratamiento con PEG-ADA una vez finalizada la terapia, pero a menores dosis. La sinusitis crónica y los dolores de cabeza desaparecieron por completo unos meses después del inicio del tratamiento. Por último, en cuanto a los efectos adversos del ensayo, a corto y medio plazo, no aparecieron problemas relacionados con los vectores, como leucemias u otras patologías malignas.

## **V.2.- Evaluación del primer ensayo clínico 10 años después**

Transcurridos 10 años desde la finalización del ensayo clínico descrito en el apartado anterior, se realizó una evaluación de las dos pacientes implicadas en dicho estudio<sup>23</sup>. Para ello, se utilizaron muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) tomadas y criopreservadas durante todos esos años.

Primero se determinaron los niveles de células que contenían el vector utilizado. Se encontró un descenso en los últimos 3 años en ambas pacientes, aunque mucho más severo en la paciente 2 (15 veces menos cantidad). Del mismo modo, el promedio de la actividad enzimática ADA era 3 veces menor en la paciente 2 que en la 1. La actividad ADA en esta paciente era significativamente mayor que antes de comenzar la terapia génica, mientras que en la paciente 2 era similar a antes de comenzar el tratamiento (Fig. 5).

Durante el ensayo clínico, ya se detectaron estas diferencias entre ambas pacientes (apartado V.1;<sup>20</sup>). Los autores indicaron que podía ser debido a la eficiencia de la transducción o a la capacidad de expansión celular *in vitro*. También podía deberse a la respuesta inmune desarrollada por la paciente 2 contra componentes del retrovirus. Aunque ambas pacientes generaron anticuerpos frente al vector, sólo la paciente 2 mostró una persistencia de los mismos tras finalizar el tratamiento.



**Figura 5. Actividad enzimática de ADA y detección del vector en PBMC.** A) Paciente 1. B) Paciente 2. La línea negra indica la actividad de ADA y la línea naranja el porcentaje de PBMC positivas para el vector.

Este estudio demostró que las células T modificadas con el vector pueden persistir en la circulación durante más de 12 años. Asimismo, el transgén derivado del vector mantuvo su expresión por más de una década, indicando resistencia al silenciamiento *in vivo*.

En cuanto a las pacientes, ambas permanecieron saludables y no desarrollaron infecciones graves. Durante todo ese tiempo se les continuó administrando dosis reducidas de PEG-ADA. Esto dificulta la obtención de conclusiones claras sobre la respuesta inmune de las pacientes. Existió la intención de detener el tratamiento con PEG-ADA, pero finalmente se optó por mantenerlo temiendo que se pudiera poner en peligro la vida de las pacientes.

Este primer ensayo demostró la eficacia y potencialidad de la terapia génica en el tratamiento del ADA-SCID, abriendo una puerta a nuevas posibilidades terapéuticas. Sin embargo, al realizarse únicamente en dos pacientes, la cuantificación de los posibles efectos adversos, fundamentalmente a largo plazo, no puede detallarse de forma adecuada.

### **V.3.- Ensayo con células madre hematopoyéticas combinado con busulfán**

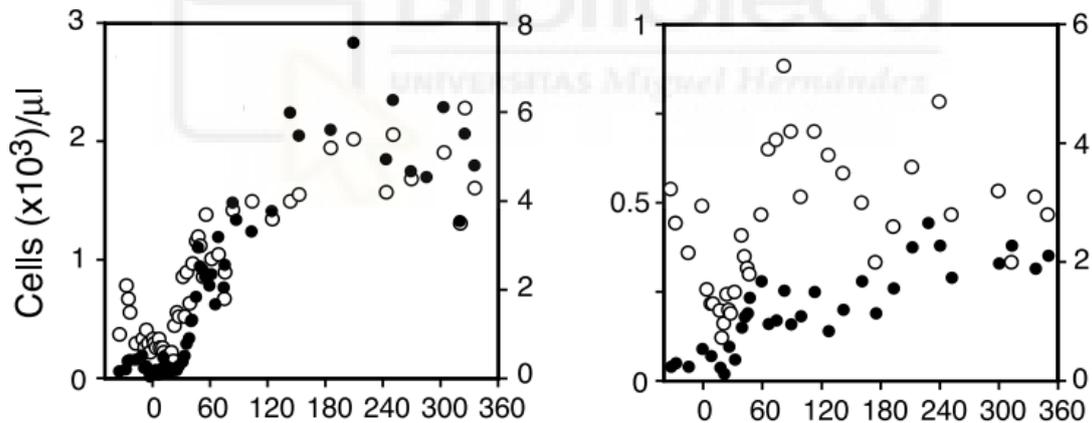
A raíz del primer ensayo realizado que demostró el gran potencial de la terapia génica<sup>20,23</sup>, empezaron a realizarse más ensayos con el fin de encontrar un futuro tratamiento que pudiera ser aprobado. Uno de estos ensayos fue llevado a cabo en el San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-TIGET) de Milán, cuyos resultados se publicaron en 2002<sup>24</sup>.

El estudio consistió en un protocolo mejorado de transferencia génica utilizando células madre hematopoyéticas (CMH) CD34+ (nomenclatura que significa que expresan el CD34), que permitía una transducción eficiente de las mismas. Éstas pueden colonizar de manera estable la médula ósea, manteniendo su capacidad de diferenciación en múltiples linajes, como células mieloides, células B, células NK y linfocitos T. El ensayo iba dirigido a dos pacientes con ADA-SCID, que carecían de un hermano histocompatible y para los que el tratamiento con PEG-ADA no era posible.

La paciente 1 tenía 7 meses de edad, mientras que la paciente 2 tenía 2 años y 6 meses en el momento en el que se inscribieron en el ensayo. La paciente 1 fue diagnosticada con ADA-SCID al nacer, siendo la tercera hija de una familia con otros dos niños afectados también por ADA-SCID, presentando infecciones pulmonares recurrentes antes de la terapia génica. La paciente 2 fue diagnosticada a los 6 meses de edad y sufría de neumonía, diarrea y sarna. A los 7 meses de edad fue sometida a un trasplante de médula ósea del padre sin acondicionamiento, que resultó en falta de injerto de las células del donante. Además, tuvo un hermano que falleció a los 3,5 años de edad por una inmunodeficiencia primaria no definida.

El ensayo empezó mediante la recolección de CMH CD34+ autólogas (obtenidas por purificación inmunomagnética) de la médula ósea de las pacientes. Posteriormente, fueron transducidas con el vector gammaretroviral GIADAI (con el ADN complementario del gen *ADA*) e infundidas 4 días después. Antes de proceder con la terapia, a ambas pacientes se les suministró busulfán para el acondicionamiento no mieloablativo. Además, se detuvo el tratamiento con PEG-ADA tres semanas antes de comenzar el ensayo.

En la paciente 1, los resultados del ensayo provocaron un aumento de las células B, NK y T (Fig. 6), así como la respuesta proliferativa de estas últimas, y en especial las células T naive (células que responden frente a nuevos patógenos que el sistema inmune todavía no reconoce), lo que sugiere una reconstitución de la actividad tímica. Los niveles de inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina G (IgG) alcanzaron valores normales. Las respuestas de los linfocitos T a varios estímulos también eran comparables a los controles normales.



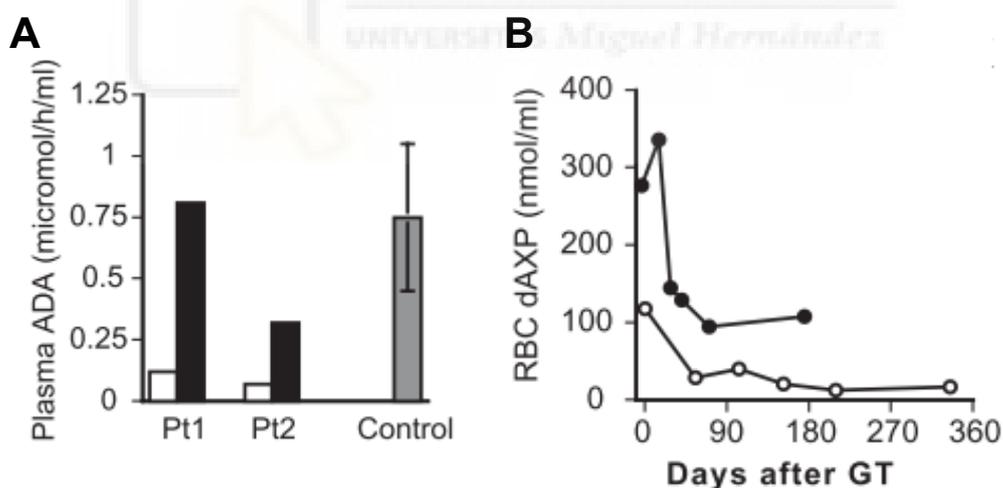
**Figura 6. Recuento total de linfocitos (círculos negros) y leucocitos (círculos blancos).** Izquierda: paciente 1. Derecha: paciente 2. Eje X: días tras la terapia.

La paciente 2 también experimentó un incremento del número de linfocitos, sobre todo de células T, pero menos que la paciente 1 (Fig. 6). También se encontró una respuesta positiva de éstas a distintos estímulos. La normalización de IgM e IgA indicó la reconstitución de la función de las células B. Doce meses después de la terapia génica, la paciente 2 se recuperó de la sarna, las infecciones

respiratorias y se recuperó con normalidad de dos episodios transitorios de diarrea.

Por otro lado, se analizó la proporción de células con el vector. La frecuencia de células corregidas genéticamente fue mayor en las de tipo linfocito con respecto a otros linajes. Esto indica una gran ventaja selectiva de las células B, NK y T modificadas frente a las no modificadas. Además, se concluyó que las CMH transducidas retienen su capacidad hematopoyética tanto *in vitro* como *in vivo* hasta, por los menos, 11 meses tras su infusión en las pacientes.

En ambas pacientes también aumentó la actividad ADA en el plasma sanguíneo. Asimismo, hubo un descenso de los metabolitos tóxicos de adenosina. Sin embargo, la mejora en ambos niveles fue superior en la paciente 1 (Fig. 7). Estas diferencias pueden deberse a que la paciente 2 recibió una menor cantidad de células transducidas, o a que comenzó el tratamiento a una edad mayor. Otra causa es una posible variabilidad en el grado de ablación de la médula ósea de ambas pacientes.



**Figura 7. Estudios bioquímicos de ADA y de metabolitos de purina.** A) Actividad de ADA en plasma de las pacientes 1 (Pt1) y 2 (Pt2), antes (barras blancas) y después (barras negras) del tratamiento. La barra en gris representa los valores control. B) Concentración de metabolitos tóxicos de adenosina (dAXP) en eritrocitos (RBC) de la paciente 1 (círculos blancos) y la paciente 2 (círculos negros).

Durante el tratamiento, las dos pacientes se encontraban en buen estado y no presentaron episodios infecciosos graves, mostrando un crecimiento y desarrollo

normales. Ninguna recibió terapia de reemplazo enzimático con PEG-ADA, ni durante ni tras el ensayo clínico, por lo que cualquier mejoría inmunológica se debía exclusivamente a la terapia génica.

Por tanto, estos resultados indican la seguridad y eficacia de la terapia génica combinada con acondicionamiento no mieloablativo para el tratamiento del ADA-SCID. Se cree que dicho acondicionamiento puede ser la razón de unos mejores resultados en este ensayo con respecto al anteriormente mencionado<sup>20,23</sup>.

#### **V.4.- Ampliación y seguimiento del ensayo con CMH combinado con busulfán**

En este estudio del SR-TIGET, publicado en 2009, se realiza un seguimiento a largo plazo de las dos pacientes previamente analizadas en Aiuti et al., 2002. Además, se incorporan otros 8 pacientes a los que se les aplicó el mismo protocolo<sup>25</sup>. El conjunto de pacientes objeto de dicho estudio se inscribió entre el mes de julio del año 2000 hasta septiembre del año 2006, eligiéndose niños con ADA-SCID que carecían de un hermano haploidéntico sano para un trasplante de CMH. También se incluyeron pacientes tratados con PEG-ADA durante al menos al menos 6 meses, donde este tratamiento resultara ineficaz por fallos inmunológicos como intolerancia, reacción alérgica o autoinmunidad.

Antes de la terapia génica, se obtuvieron y criopreservaron muestras de médula ósea para un posible uso posterior. El protocolo utilizado es el mismo que el descrito en Aiuti et al., 2002.

La Tabla 1 muestra un resumen de los resultados clínicos observados debidos a la terapia génica en los 10 pacientes estudiados.

Patient No.	Clinical History before Gene Therapy	Years of Follow-up	Relevant Infections after Gene Therapy	Serious Adverse Events after Gene Therapy	PEG-ADA	Clinical Condition after Gene Therapy
1	Recurrent respiratory infection, failure to thrive	8.0	None	None	No	Well
2	Chronic diarrhea, recurrent respiratory infection, scabies, failure to thrive	7.5	Skin molluscum, urinary infection	None	Initiated 4.5 yr after gene therapy	Well
3	Recurrent respiratory infection, dermatitis, failure to thrive, eating disorder	6.3	None	Prolonged neutropenia and thrombocytopenia	No	Well
4	Recurrent respiratory infection, oral infection with <i>Candida albicans</i> , skin BCG and bacterial infections, chronic diarrhea, failure to thrive	5.9	Varicella	None	No	Well
5	Recurrent respiratory infection, aseptic meningitis, chronic diarrhea, failure to thrive	4.4	Varicella	None	No	Well
6	CMV lung infection, EBV infection, recurrent respiratory infection, hearing deficit, failure to thrive	3.8	CVC-related infection, EBV reactivation, varicella	None	No	Well
7	Facial dysmorphism, eating disorder, staphylococcal infection, oral and genital infection with <i>C. albicans</i> , failure to thrive	2.8	None	Autoimmune hepatitis	No	Well, but with eating disorder
8	Developmental delay, recurrent respiratory infection, autoimmune hemolytic anemia, macrophage activation syndrome, hearing deficit, failure to thrive	2.5	Recurrent respiratory infection, urinary infection	Hypertension, prolonged neutropenia, autoimmune thrombocytopenia	Restarted 0.4 yr after gene therapy	Mild symptoms
9	<i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia	1.9	Gastroenteritis	None	No	Well
10	Postvaccinal BCG infection, recurrent respiratory infection, developmental delay, neurosensory deafness, genital ambiguity, congenital adrenal insufficiency, hypothyroidism, failure to thrive	1.8	CVC-related infection (two)	None	No	Well, but with developmental delay

\* Serious adverse events were those other than serious infections during the follow-up period after gene therapy. BCG denotes bacille Calmette-Guérin, CMV cytomegalovirus, CVC central venous catheter, EBV Epstein-Barr virus, and PEG-ADA polyethylene glycol-modified bovine adenosine deaminase.

Tabla 1. Resultados clínicos de los pacientes a estudio.

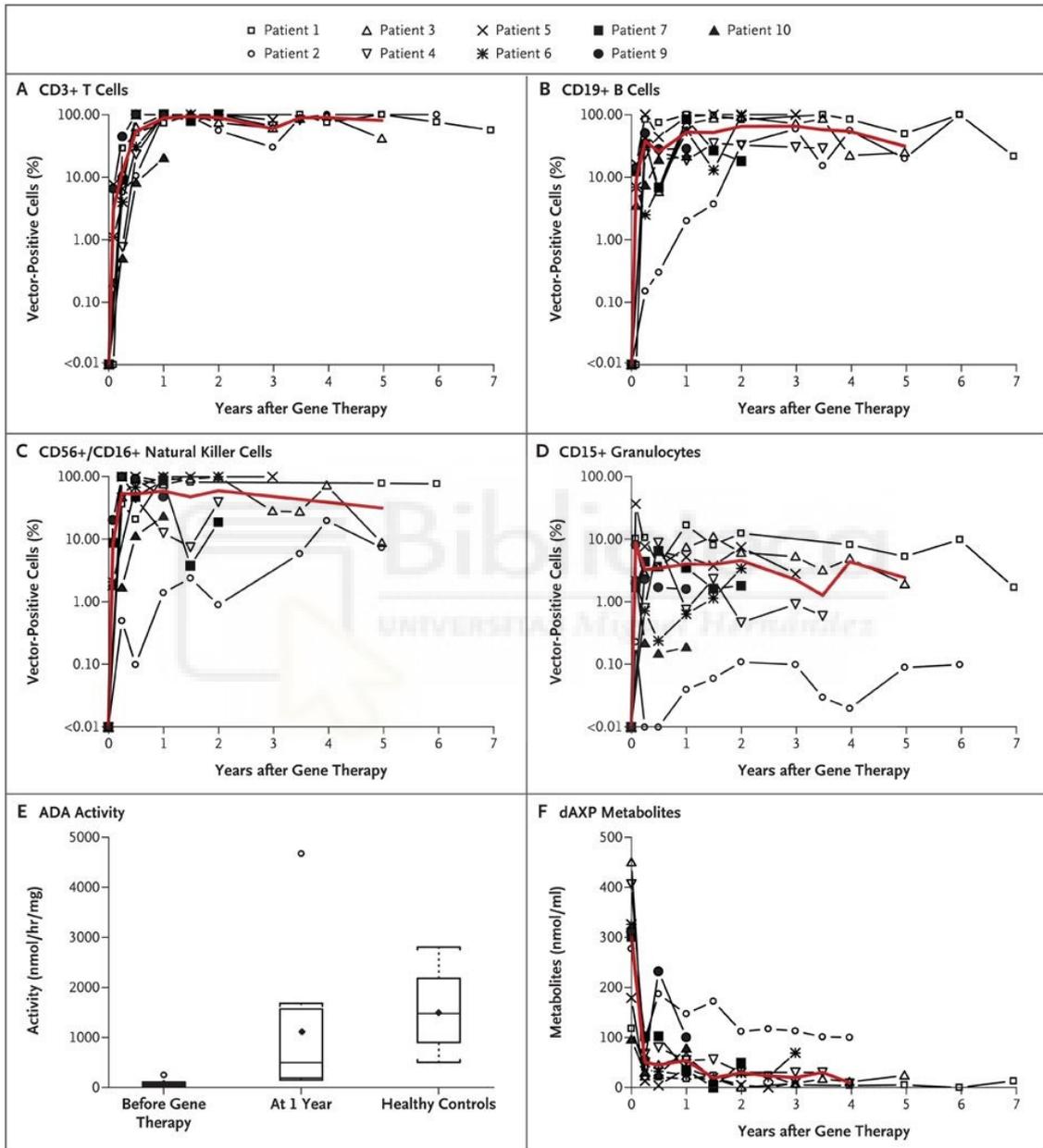
Primero, se analizó la presencia del vector en múltiples linajes celulares a partir de médula ósea. Un año tras el tratamiento, se encontraron los siguientes promedios de células modificadas con respecto al total de células de cada tipo: 5.1% de CMH CD34+, 3.5% de granulocitos, 8.9% de megalocitos, 3.8% de eritrocitos y 8% de células B. Un estudio similar a partir de sangre periférica dio los siguientes resultados: 88% de células T, 52.4% de células B y 59.2% de NK (Fig. 8A-D).

La presencia de la enzima ADA se documentó mediante la detección de su actividad enzimática en células mononucleares sanguíneas. No obstante, los niveles de metabolitos tóxicos de adenosina se mantuvieron bajos durante todo el período de seguimiento en todos los pacientes que no recibieron PEG-ADA posterior a la terapia génica, es decir, en todos excepto los pacientes 2 y 8 (Fig. 8E-F).

Tras la administración del vector ADA, se produjo un aumento progresivo de los recuentos de células T, que alcanzaron los niveles máximos entre 1 y 3 años después de la terapia. Los niveles de células NK aumentaron significativamente a los 3 años y mostraron una actividad citotóxica normal. Las respuestas proliferativas de las células T frente a mitógenos fueron normales a los 6-12 meses de seguimiento en todos los pacientes y se mantuvieron normales durante el periodo de seguimiento. El recuento de células B aumentó progresivamente tras la terapia génica, y en la última visita de seguimiento, los recuentos eran normales en cuatro pacientes. La proporción de linfocitos B de memoria CD27+ (homodímero transmembrana con enlace disulfuro que pertenece a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral) fue similar en los pacientes sometidos a terapia génica frente a controles de la misma edad.

A la finalización de este ensayo, los 10 pacientes permanecían con vida (incluidos los 2 pacientes iniciales estudiados en Aiuti et al., 2002). Sólo dos pacientes precisaron PEG-ADA durante el periodo de seguimiento, cuyos datos se usaron únicamente para evaluar la eficacia de la terapia desde su administración hasta que se reanudó el tratamiento de reemplazo enzimático (paciente 2), o solo para evaluar su seguridad (paciente 8). Ninguno de los pacientes recibió un trasplante de CMH tras la terapia génica. La duración del seguimiento fue de entre 1.8 a 8 años (Tabla 1). Los pacientes 1 a 6 reanudaron

su vida normal. Los pacientes aumentaron de peso y altura alcanzando índices casi normales, mientras que la tasa de infecciones graves, expresada como el número de eventos por cada 10 personas por mes de observación, disminuyó de 0,93 antes de la terapia génica a 0,13 después de la misma.



**Figura 8. Persistencia de células transducidas con ADA, actividad enzimática ADA y niveles de metabolitos de adenosina.** A-D) Proporción de células que contienen el vector. E) Actividad enzimática ADA antes y un año tras la terapia génica, en comparación a niveles de individuos sanos control. Líneas horizontales: mediana. Rombos: promedios. Corchetes: 1,5 veces el rango intercuartil. F) Niveles de metabolitos de adenosina (dAXP).

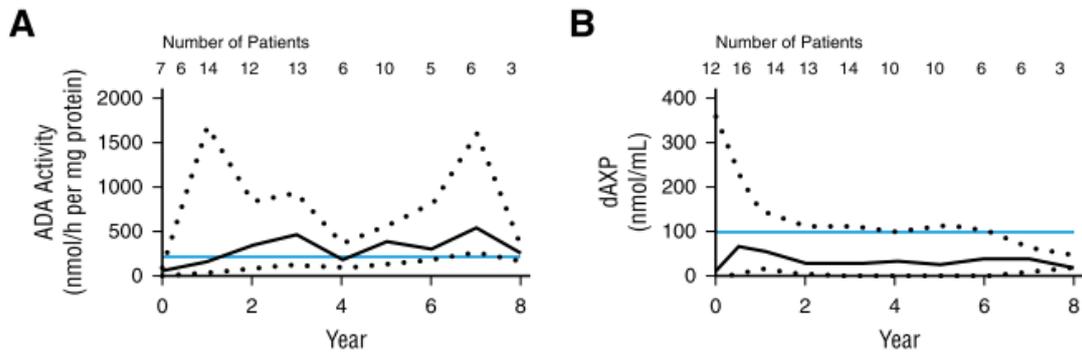
## **V.5.- Aprobación del protocolo con CMH combinado con busulfán**

En 2016, el SR-TIGET de Milán publica una nueva actualización de los resultados sobre seguridad y eficacia a largo plazo (entre 2.3 y 13.4 años después) sobre los pacientes ya sometidos a terapia génica<sup>24,25</sup>. Además, se analizaron 8 pacientes adicionales, con lo que eran 18 individuos en total<sup>26</sup>.

El protocolo en cuanto selección de pacientes, así como al desarrollo y administración de la terapia génica fue el mismo que el indicado en Aiuti et al., 2002.

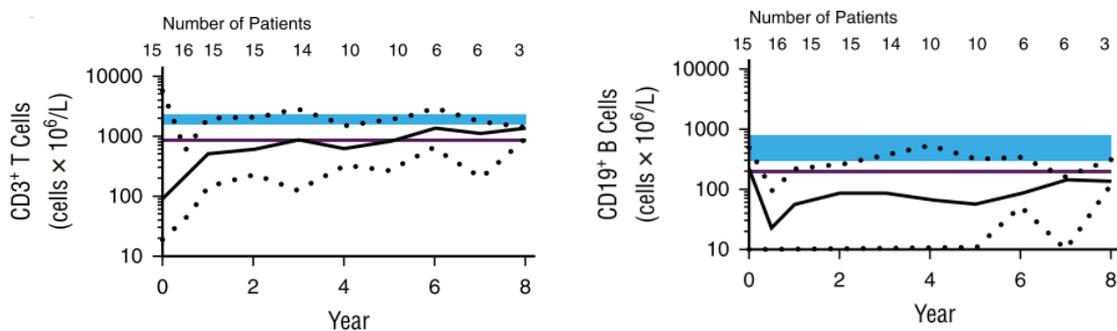
De nuevo se analizó la supervivencia de estos pacientes sin ningún tipo de intervención (trasplante de CMH o administración de PEG-ADA, posteriores a la terapia génica). Cuatro pacientes habían recibido previamente un trasplante de CMH sin éxito, y 15 pacientes habían recibido previamente PEG-ADA. Al inicio del estudio, algunos pacientes presentaban una o más de estas anomalías: retraso del crecimiento, problemas relacionados con el sistema nervioso central, retraso psicomotor o retraso en el desarrollo y anomalías auditivas. En el momento en que se recabaron los datos (mayo de 2014), todos los pacientes habían sobrevivido. Solamente 3 de los 18 pacientes reanudaron el tratamiento con PEG-ADA a largo plazo debido a una mala reconstitución inmunitaria tras el tratamiento (dos de ellos ya descritos en el apartado anterior). En general, todos los pacientes pudieron llevar una vida normal durante todo el seguimiento.

Durante los 3 primeros años de seguimiento, una media del 1-2% de las CMH CD34+ de la médula ósea contenían el vector, y durante el seguimiento a largo plazo este porcentaje pareció aumentar. Sin embargo, los autores indican que se requieren datos de más pacientes para corroborarlo. Asimismo, se determinó un aumento a largo plazo de la proporción de células modificadas genéticamente en otras poblaciones linfocitarias. También se observó un incremento en la actividad enzimática de ADA de los linfocitos de sangre periférica a largo plazo, de modo que se corrigió el defecto metabólico (Fig. 9).



**Figura 9. Estudio de la actividad de ADA.** Las líneas de puntos negros representan valores máximos y mínimos. El número de pacientes que contribuyó a cada dato aparece indicado. A) Niveles de la actividad de ADA en linfocitos. La línea azul representa un 10% de los valores normales (umbral mínimo). B) Niveles de metabolitos de adenosina (dAXP) en eritrocitos. La línea azul representa los valores encontrados en pacientes con trasplantes de CMH exitosos.

La reconstitución inmunitaria se observó a partir del sexto mes después de la terapia, con un aumento del número de linfocitos T y NK periféricos. También se pudo demostrar la capacidad de proliferación y respuesta de los linfocitos T. No obstante, el recuento de células B se mantuvo bajo, aunque hubo respuestas positivas del sistema inmune a la vacunación (Fig. 10). Todos los pacientes se sometieron a terapia de suplementación IVIG (inmunoglobulina intravenosa, un tratamiento realizado para pacientes con déficit de anticuerpos) antes y después de la terapia génica. Una vez finalizado el tratamiento, 6 de ellos siguieron con el tratamiento IVIG.



**Figura 10. Recuento de células T y B.** Recuento de células T CD3+ (izquierda) y de células B CD19+ (derecha). Las líneas de puntos negros representan valores máximos y mínimos. El número de pacientes que contribuyó a cada dato aparece indicado. Las líneas azul y morada representan la mediana y el percentil cinco, respectivamente, de los valores en niños sanos.

Antes de la terapia génica, se produjeron 40 infecciones graves en 14 pacientes (82%). Tras la terapia, se notificaron 15 infecciones graves en 10 pacientes (59%), de las cuales 12 (80%) tuvieron lugar entre los 4 meses y 3 años tras la terapia. Entre los 4 y los 8 años del seguimiento, sólo se notificaron 3 infecciones graves.

Se notificaron efectos adversos producidos durante o tras el tratamiento en los 18 pacientes, principalmente infecciones de las vías respiratorias superiores, gastroenteritis, rinitis, e infecciones del tracto urinario. Un total de 15 pacientes tuvieron efectos adversos serios tras la terapia génica, aunque en todos los casos se resolvieron adecuadamente. Debido al momento en el que tuvieron lugar todos estos efectos adversos, se dedujo que probablemente estaban relacionados con el acondicionamiento por administración de busulfán, y no debidos a la terapia génica propiamente.

Así pues, el estudio demostraba la seguridad de la terapia génica, complementada con un acondicionamiento con busulfán no mieloablativo a dosis bajas. El riesgo del uso de vectores retrovirales radica en la aparición de enfermedades como la leucemia o enfermedades hematológicas entre otras. No obstante, al finalizar el seguimiento no se notificaron casos de leucemia u otras enfermedades graves en los pacientes de este estudio. Los datos de eficacia y seguridad de este tratamiento, ya no solo a corto, sino también a medio-largo plazo, propiciaron la autorización en de este protocolo por parte de la EMA en 2016 para su comercialización como tratamiento bajo el nombre comercial de Strimvelis<sup>14</sup>.

En 2020, cuando había 33 pacientes con ADA-SCID tratados con Strimvelis, se notificó el primer caso de leucemia linfocítica de células T en un niño, casi 5 años después del tratamiento<sup>27</sup>. La causa es la inserción del vector retroviral unas 40 kb aguas arriba del gen *LMO2*, un conocido protooncogén. La activación de este gen también está implicada en otros casos de leucemia asociados terapia génica para SCID ligada al cromosoma X<sup>18,19</sup>. Aunque a fecha de enero de 2023 sigue siendo el único caso de leucemia conocido, se han detectado inserciones cercanas a *LMO2* en otros 5 pacientes, así como cercanas al protooncogén *CCND2* también en 5 pacientes<sup>26</sup>, por lo se requerirá un seguimiento para detectar posibles desarrollos cancerosos.

## V.6.- Ensayo con un lentivirus autoinactivante en CMH

El caso de leucemia debido al tratamiento génico con un vector gammaretroviral, condujo al desarrollo y aplicación de vectores alternativos más seguros. En 2021, Kohn y colaboradores publicaron los resultados de un ensayo clínico en el que se utilizó un vector lentiviral con capacidad de autoinactivación<sup>28</sup>. En este vector (EFS-ADA) se ha eliminado el promotor de la secuencia LTR de la región 3'. Tras su inserción en el genoma de la célula hospedadora, el vector carece de los promotores de ambas secuencias LTR. La expresión del ADN complementario del gen *ADA* está regulada el promotor de EF-1 (Elongation Factor-1) humano.

Los pacientes de este estudio fueron 50 niños provenientes de Estados Unidos (EE.UU.) y Reino Unido (R.U.), diagnosticados con ADA-SCID, que tenían como mínimo un mes de edad y que carecían de un hermano histocompatible (o un donante emparentado). Se tomaron CMH CD34+ de la médula ósea o de sangre periférica de estos pacientes, y se transdujeron con el vector lentiviral, para ser administradas posteriormente vía intravenosa. Todos los pacientes recibieron busulfán previamente para un acondicionamiento no mieloablativo. Además, también se les administró PEG-ADA desde el momento del diagnóstico hasta sólo 30 días después del tratamiento con terapia génica. Los pacientes fueron objeto de seguimiento durante 24 meses en EE.UU. y 36 meses en R.U.

Se analizó la seguridad del tratamiento en los pacientes, no detectándose enfermedades o complicaciones debidas a mutagénesis insercional. No obstante, sí hubo efectos adversos en todos los pacientes, aunque la mayoría fueron leves o moderados. En EE.UU., 12 pacientes presentaron uno o más efectos adversos graves, la mayoría infecciones respiratorias (27%) e infecciones gastrointestinales (17%), de los cuales sólo uno se consideró que estaba relacionado con el tratamiento. En los pacientes del R.U., la mayoría de los problemas detectados en los pacientes también fueron leves o moderados, aunque también se detectaron afecciones graves en 11 de los 20 pacientes. La más frecuente fue la pirexia (fiebre esencial) en el 30% de los pacientes. Un acontecimiento adverso grave relacionado con el tratamiento se produjo por la contaminación del producto farmacológico. Dos pacientes en los estudios de EEUU y dos pacientes en el estudio del RU sufrieron efectos adversos graves

de inflamación de reconstitución inmunitaria. Se consideró que ninguno de estos efectos adversos eran debido a la terapia génica.

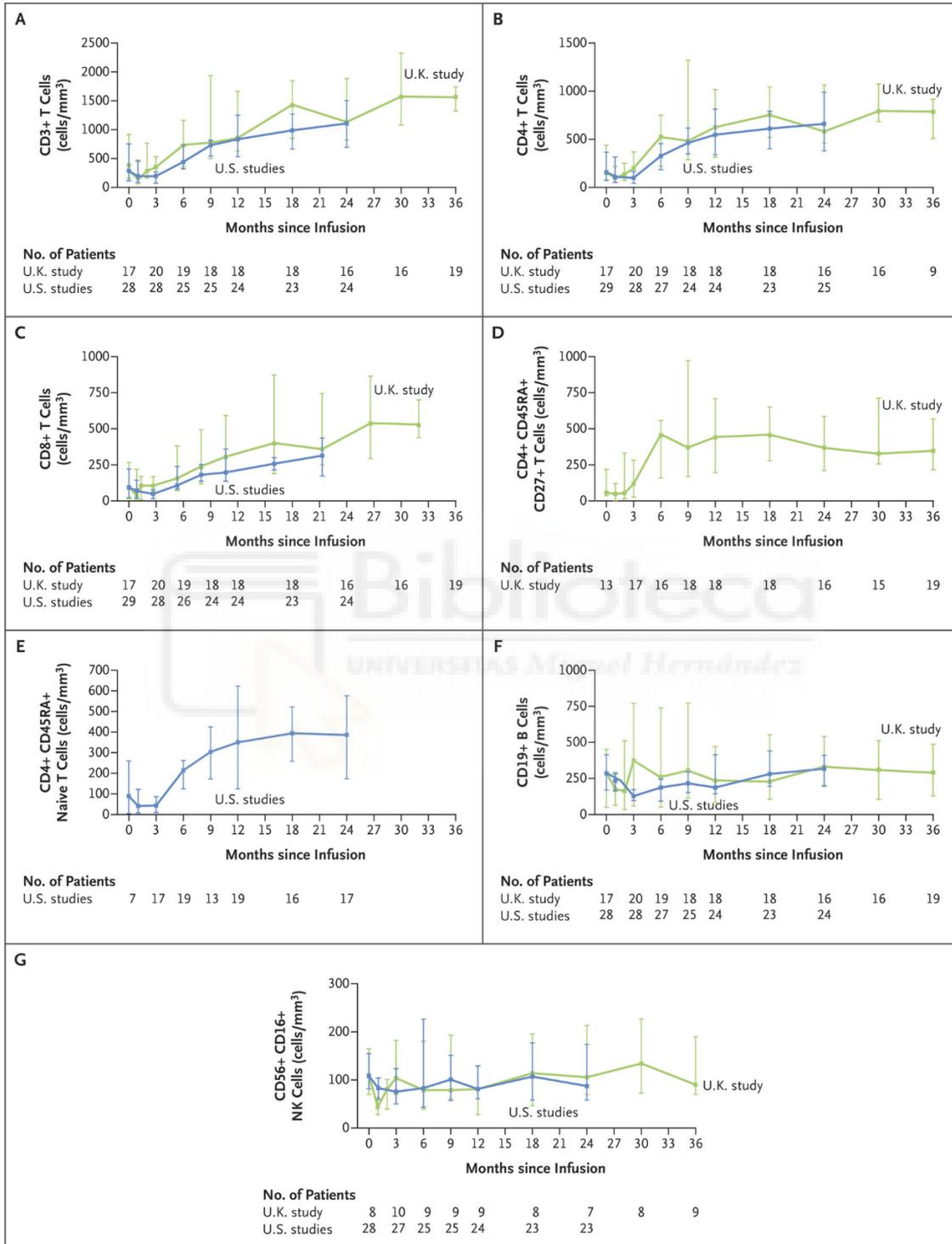
La supervivencia global fue del 100% para los periodos evaluados. En este periodo, la supervivencia sin eventos adversos (siendo estos el rescate por trasplante alogénico o la reanudación del tratamiento con PEG-ADA) fue del 97% para los pacientes de los estudios de EE.UU. y del 95% para los pacientes del estudio del R.U. La causa fue el reinicio del tratamiento con PEG-ADA en dos de los pacientes (un americano y otro inglés), debido a niveles insuficientes de la actividad ADA.

Los granulocitos y las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) modificadas genéticamente se pudieron detectar a partir del tercer mes, manteniéndose estable (granulocitos) o incrementando (PBMC) durante el seguimiento en todos los pacientes. Además, en los pacientes del estudio del R.U., se observó un aumento de células T y B que contenían el vector. Asimismo, se determinó un incremento de la actividad enzimática ADA, así como un gran descenso en los niveles de los metabolitos tóxicos de adenosina.

El recuento de linfocitos alcanzó en la mayoría de los pacientes los rangos normales esperados para la edad de cada paciente (Fig. 11). No obstante, la media de los recuentos disminuyó tras el acondicionamiento y la retirada del PEG-ADA previo a la terapia génica, pero comenzaron a recuperarse a partir del tercer mes, con aumentos sostenidos hasta el final del estudio. El recuento de las células T naive también aumentó y se mantuvo estable, lo que puede indicar la reaparición de la función tímica. Por último, tras esta terapia génica se produjo una reducción de las enfermedades oportunistas en los pacientes.

Como conclusión, el tratamiento de ADA-SCID con terapia génica lentiviral *ex vivo* de CMH ha dado como resultado a una supervivencia generalizada, corrección metabólica, reconstitución inmune funcional y recuperación tímica. La evolución clínica sin complicaciones de la mayoría de los pacientes puede atribuirse a la baja dosis de dosis de busulfán utilizada para el acondicionamiento. Los datos obtenidos del estudio son muy prometedores para este protocolo, ya que, si bien no tiene una efectividad absoluta, sí que ha

logrado la recuperación de la mayoría de los pacientes, sin grandes efectos adversos.



**Figura 11. Mediana absoluta de los recuentos de linfocitos.** Datos del seguimiento en EE.UU. (línea azul) y en R.U. (línea verde). El número de pacientes aparece indicado.

Actualmente el trasplante de CMH de un donante histocompatible y la terapia génica se consideran opciones equivalentes para el tratamiento de ADA-SCID. Sin embargo, la terapia génica emplea células del propio paciente, por lo que no puede provocar la enfermedad de injerto contra huésped, y, por tanto, no se requieren terapias inmunosupresivas, lo que representa una gran ventaja frente al trasplante alogénico.



## VI.- CONCLUSIONES

La terapia génica, al ser un campo casi desconocido hasta hace unos pocos años, provocaba inquietud e incertidumbre en el mundo científico sobre su uso y/o posibles efectos adversos no deseados, aunque también se conocía su potencial curativo. El primer ensayo, que versaba alrededor de la terapia génica utilizando un vector gammaretroviral para la transducción *ex vivo* de linfocitos T, permitió solucionar estas inquietudes al demostrar la mejoría de 2 pacientes con ADA-SCID, así como también la ausencia de grandes efectos adversos. Un seguimiento de estas pacientes una década después reafirmó los resultados anteriores, y por tanto el potencial de la terapia génica, aunque destacando la evolución diferente en cada una de ellas. Sin embargo, como se mantuvo el tratamiento con PEG-ADA, aunque a dosis bajas, los resultados sobre el sistema inmune no son claros.

Un ensayo posterior, en el que se realizaba una transferencia génica utilizando CMH, previo acondicionamiento de los pacientes con busulfán a bajas dosis, mostró una mejora de la eficiencia del tratamiento. El seguimiento realizado a largo plazo al conjunto de pacientes sometidos a este tratamiento demostró una mejoría de su sistema inmunitario, sin requerir la mayoría de ellos la administración de PEG-ADA. En 2016 la EMA aprobó el uso de este protocolo para su comercialización con el nombre de Strimvelis. Sin embargo, pocos años después se notificó un caso de leucemia por mutagénesis insercional del vector en un paciente que recibió este tratamiento, lo que plantea el uso de vectores alternativos.

Con el fin de mejorar la seguridad de este tratamiento y eliminar el riesgo de leucemia, se desarrolló un protocolo con un vector lentiviral autoinactivante para la transducción de CMH, también con busulfán a dosis bajas. Este ensayo es muy prometedor, y ha mostrado muy buenos resultados en cuanto a su eficiencia, reconstitución inmunológica y seguridad.

Actualmente, la terapia génica es una opción viable para la curación de pacientes con ADA-SCID que no tienen la opción de un trasplante de CMH.

## VII.- BIBLIOGRAFÍA

1. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Al-Herz W, Ailal F, Chatila T, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *J Clin Immunol*. 2020;40(1):66–81.
2. Kumrah R, Vignesh P, Patra P, Singh A, Anjani G, Saini P, et al. Genetics of severe combined immunodeficiency. *Genes Dis*. 2020;7(1):52–61.
3. Francos A, Alcaide A, Rey V, Salvador Z, Fernández S. Autosomal recessive inheritance pattern [Internet]. *invitRA*. 2020. Disponible de: <https://www.invitra.com/en/genetic-disorders-and-pgd/autosomal-recessive-inheritance-pattern/>
4. Hellani A, Almassri N, Abu-Amero KK. A novel mutation in the ADA gene causing severe combined immunodeficiency in an Arab patient: A case report. *J Med Case Rep*. 2009;3(1):1–5.
5. Giblett ER. Back to the beginnings: an autobiography. *Transfus Med Rev*. 2006;20(4):318–21.
6. Flinn AM, Gennery AR. Adenosine deaminase deficiency: A review. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13(1):5–11.
7. Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, Lupidi G, Vittori S, Volpini R, et al. Adenosine deaminase: Functional implications and different classes of inhibitors. *Med Res Rev*. 2001;21(2):105–28.
8. Bradford KL, Moretti FA, Carbonaro-Sarracino DA, Gaspar HB, Kohn DB. Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immune Deficiency (SCID): Molecular Pathogenesis and Clinical Manifestations. *J Clin Immunol*. 2017;37(7):626–37.
9. Fernández J. Inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) - Inmunología y trastornos alérgicos [Internet]. *Manual MSD*. 2021. Disponible de: <https://www.msmanuals.com/es-es/professional/inmunología-y-trastornos-alérgicos/inmunodeficiencias/inmunodeficiencia-combinada-grave-idcg>

10. Polmar SH, Stern RC, Schwartz AL, Wetzler EM, Chase PA, Hirschhorn R. Enzyme Replacement Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency and Severe Combined Immunodeficiency. *N Engl J Med*. 1976;295(24):1337–43.
11. Xu X, Negandhi J, Min W, Tsui M, Post M, Harrison R V., et al. Early enzyme replacement therapy improves hearing and immune defects in adenosine deaminase deficient-mice. *Front Immunol*. 2019;10:416.
12. Secord E, Hartog NL. Review of Treatment for Adenosine Deaminase Deficiency (ADA) Severe Combined Immunodeficiency (SCID). *Ther Clin Risk Manag*. 2022;18:939–44.
13. Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic Stem Cell Transplantation—50 Years of Evolution and Future Perspectives. *Rambam Maimonides Med Journa*. 2014;5(5):e0028.
14. Aiuti A, Roncarolo MG, Naldini L. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products. *EMBO Mol Med*. 2017;9(6):737–40.
15. Fischer MD. Sobre la terapia génica para enfermedades de la retina. *Ophthalmologica*. 2017;238(1):48–55.
16. Cómo funcionan las terapias génicas y celulares para tratar el cáncer o enfermedades de la visión [Internet]. Tucuentasmucho. 2017. Disponible de: <https://www.tucuentasmucho.com/como-funcionan-las-terapias-genicas-y-celulares-para-tratar-el-cancer-o-enfermedades-de-la-vision>
17. Maier P, Von Kalle C, Laufs S. Retroviral vectors for gene therapy. *Future Microbiol*. 2010;5(10):1507–23.
18. 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(5644):415–9.
19. Nam CH, Rabbitts TH. The role of LMO2 in development and in T Cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion. *Mol Ther*. 2006;13(1):15–25.

20. 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(5235):475–80.
21. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene*. 2013;525:162–9.
22. Keeler AM, ElMallah MK, Flotte TR. Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions. *Clin Transl Sci*. 2017;10:242–8.
23. Muul LM, Tuschong LM, Soenen SL, Jagadeesh GJ, Ramsey WJ, Long Z, et al. Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. *Blood*. 2003;101(7):2563–9.
24. Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*. 2002;296(5577):2410–3.
25. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, Cassani B, Callegaro L, et al. Gene Therapy for Immunodeficiency Due to Adenosine Deaminase Deficiency. *N Engl J Med*. 2009;360(5):447–58.
26. Cicalese MP, Ferrua F, Castagnaro L, Pajno R, Barzaghi F, Giannelli S, et al. Update on the safety and efficacy of retroviral gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *Blood*. 2016;128:45–54.
27. Agency EM. Strimvelis: First Case of Lymphoid T-Cell Leukaemia After Insertional Oncogenesis. *Eur Med Agency*. 2021;2022.
28. Kohn DB, Booth C, Shaw KL, Xu-Bayford J, Garabedian E, Trevisan V, et al. Autologous Ex Vivo Lentiviral Gene Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency. *N Engl J Med*. 2021;384:2002–13.