



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

TERAPIA GÉNICA EN PACIENTES CON INMUNIDAD SEVERA COMBINADA LIGADA AL X (X-SCID)

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Febrero 2019

Autor: Marta Navas Martí
Modalidad: Revisión bibliográfica
Tutor/es: Antonio Martínez Laborda

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	3
1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo general.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Diseño del trabajo.....	17
4.2 Fuente de extracción de documentos.....	17
4.3 Metodología de búsqueda	17
4.4 Selección de artículos.....	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
5.1 Resultados de la búsqueda	20
5.2 Análisis de los resultados	21
5.2.1 Primer ensayo de terapia génica para la X-SCID.....	21
5.2.2 Complicaciones de la terapia génica.....	23
5.2.3 Resultados a largo plazo.....	26
5.2.4 Desarrollo de nuevos vectores.....	27
5.2.5 Terapia génica lentiviral combinada con Busulfán	31
6. CONCLUSIÓN	35
7. REFERENCIAS.....	36

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
<i>X-SCID</i>	X-Linked Severe Combined Immunodeficiency (Inmunidad Severa Combinada Ligada al X)
<i>SCID</i>	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i> (inmunodeficiencia combinada grave)
<i>IDPs</i>	Inmunodeficiencias Primarias
<i>IUIS</i>	Unión Internacional de Sociedades de Inmunología
<i>SFDA</i>	State Food and Drug Administration of China (Administración Estatal de Alimentos y Medicamentos de China)
<i>CHMP</i>	Comité de Medicamentos de Uso Humano
<i>GMP</i>	<i>Good Manufacturing Practice</i>
<i>EMA</i>	Agencia Europea de Medicamentos
<i>IL</i>	Interleucina
<i>ADA-SCID</i>	Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency (Inmunodeficiencia Combinada Grave por Déficit de Adenosina Desaminasa)
<i>CMH</i>	Células Madre Hematopoyéticas
<i>cDNA</i>	ADN Complementario
<i>AAV</i>	Virus Adenoasociados
<i>LV</i>	Lentivirus
<i>MFG</i>	Vector derivado del gammaretrovirus de la leucemia murina de Moloney
<i>LTR</i>	Long Terminal Repeat (Repetición Terminal Larga)
<i>SIN</i>	Vector auto-inactivante
<i>ALL-T</i>	T-cell acute lymphoblastic leukaemia (Leucemia Linfoblástica Aguda T)

1. RESUMEN

La cadena γ común del receptor de citoquinas, que está codificada por el gen de la subunidad gamma del receptor de interleucina-2 (IL2RG), es un componente funcional crítico de los receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Las mutaciones naturales en IL2RG son responsables de la enfermedad de **inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X (X-SCID)**. Esta condición se caracteriza por la falta total de linfocitos T y células NK, mientras que las células B están presentes, aunque inmaduras. Debido a los riesgos del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, se hace evidente la necesidad de buscar nuevas estrategias terapéuticas como la terapia génica.

En el año 2000, se publica el primer ensayo de terapia génica para la X-SCID, en el cual se trató a dos lactantes con un vector gammaretroviral de primera generación con el cDNA del gen *IL2RG* sin acondicionamiento previo de la médula ósea, dando resultados prometedores en cuanto al recuento y desarrollo de linfocitos T. Esto llevó a la incorporación de nuevos pacientes para la valoración de los resultados a mayor escala, observándose las primeras complicaciones debido al diagnóstico de leucemia linfobástica aguda en algunos pacientes debido a mutagénesis insercional. Para paliar estas complicaciones, se desarrollaron nuevos vectores, como fueron los vectores auto-inactivantes (SIN) gammaretrovirales y lentivirales.

Un ensayo reciente se ha centrado en el estudio de la utilización de quimioterapia acondicionadora y un vector lentiviral SIN para el restablecimiento de la inmunidad de los linfocitos T, así como de los linfocitos B y las células NK que no fueron restablecidos a largo plazo en los ensayos previos.

Palabras clave: terapia génica, vectores retrovirales, mutagénesis insercional, activación oncogénica, X-SCID.

2. INTRODUCCIÓN

Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y del Comité de Clasificación de Inmunodeficiencias Primarias (IDPs) de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS), las inmunodeficiencias primarias se pueden clasificar en 8 grupos teniendo en cuenta el fenotipo característico y el principal componente del sistema inmune afectado: ⁽¹⁾

- 1) **Inmunodeficiencias combinadas de linfocitos T y linfocitos B.**
- 2) Inmunodeficiencias predominantemente de anticuerpos.
- 3) Otros síndromes de inmunodeficiencia bien definidos.
- 4) Enfermedades por desregulación inmune.
- 5) Defectos congénitos del número o función de los fagocitos.
- 6) Defectos de la inmunidad innata.
- 7) Trastornos auto-inflamatorios.
- 8) Deficiencias del complemento.

Los pacientes con inmunodeficiencia combinada grave (SCID, por sus siglas en inglés de *Severe Combined Immunodeficiency Disease*) pertenecientes al primer grupo pueden clasificarse de acuerdo con los subconjuntos de linfocitos presentes en su sangre. (Tabla 1) ⁽²⁾

Tabla 1: clasificación de las inmunodeficiencias combinadas graves.

TRASTORNO ESPECÍFICO	DEFICIENCIA SUBYACENTE	MODO DE HERENCIA
SUBGRUPO T⁺B⁺		
SCID ligada a X	Cadena γ de los receptores de citoquinas mutada	Recesivo ligado al X.
SCID autosómica recesiva	JAK3 tirosina quinasa mutada	Autosómico recesivo.
SUBGRUPO T⁻B⁻		
Deficiencia de adenosina desaminasa	Enzima ADA	Autosómico recesivo
Deficiencia de purina nucleósido fosforilasa	Enzima PNP	Autosómico recesivo
SUBGRUPO T⁺B⁻		
Síndrome de Omenn	Deficiencia parcial de la enzima RAG	Autosómico recesivo
SUBGRUPO T⁺B⁺		
Síndrome de linfocitos desnudos	Activador de transcripción MHC clase II (4 proteínas)	Autosómico recesivo
	MHC clase I defecto TAP	Autosómico recesivo
Deficiencia de ZAP-70	Dominio de quinasa de PTK asociado a TCR, ZAP-70	Autosómico recesivo
TRASTORNOS MULTISISTÉMICOS		
Síndrome de Wiskott-Aldrich	Proteína WAS	Recesivo ligado al X
Ataxia telangectasia	Proteína ATM para reparación de ADN	Autosómico recesivo

Actualmente, no se han realizado estudios epidemiológicos con la precisión necesaria para conocer con exactitud la incidencia y prevalencia de estas enfermedades, pero la SCID ligada al cromosoma X (X-SCID) probablemente afecta al menos a 1 de cada 100,000 a 200,000 recién nacidos. Sin tratamiento, los varones afectados generalmente no viven más allá de la infancia.

La X-SCID es una inmunodeficiencia combinada de tipo celular y humoral con un patrón de herencia recesiva ligada al sexo, por lo que se observa casi exclusivamente en los varones hemicigotos. Está causada por alelos patógenos de pérdida de función del gen *IL2RG* (también conocido como γc), localizado en la región Xq12-13.1. (Figura 1) ⁽³⁾

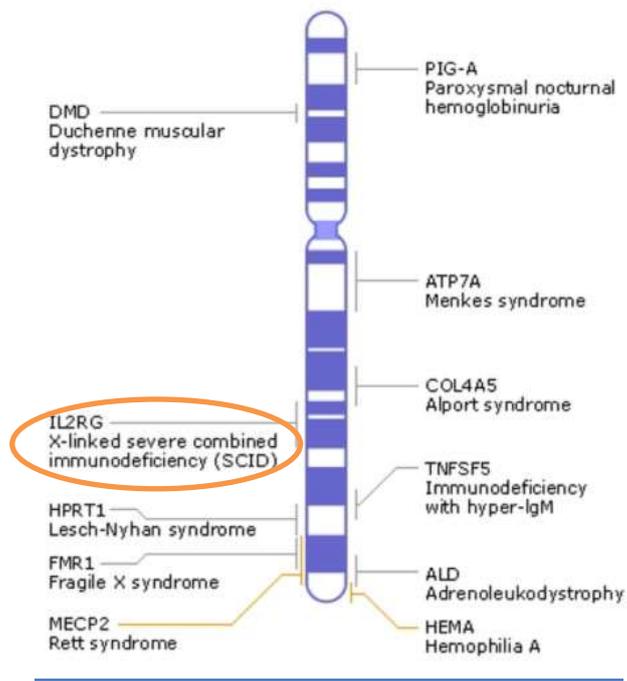


Figura 1: Idiograma humano – Enfermedades del cromosoma X

El gen *IL2RG* codifica la cadena gamma común del receptor de la IL-2 (IL-2R γ), compartida por los receptores de interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15. Por lo tanto, las mutaciones en este gen perjudican a las respuestas a una multitud de citocinas. (Figura 2) ⁽²⁾

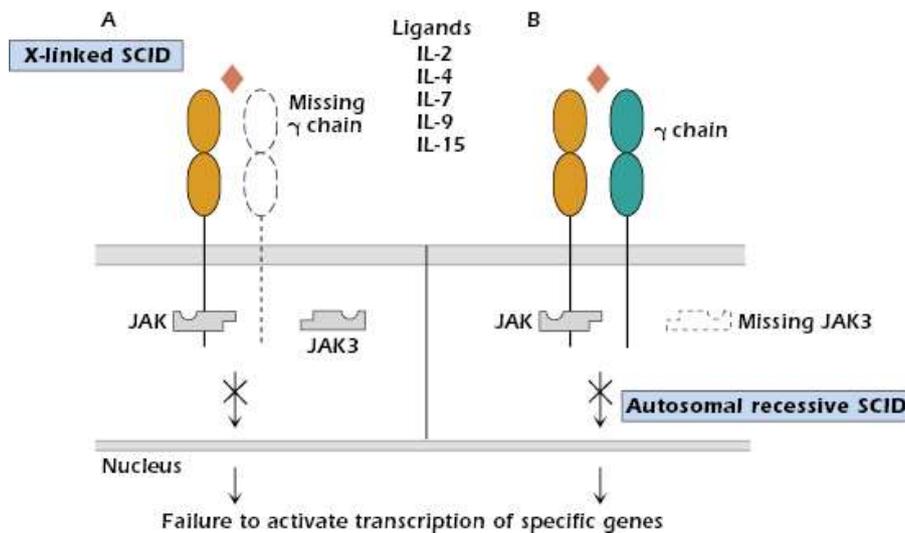


Figura 2: T - B + subgrupo. (A) Cuando falta esta cadena, los receptores de citocinas que comparten la cadena y común no generan señales intracelulares después de la unión del ligando. (B) La señalización del receptor de citocina mediada por la cadena y común es defectuosa cuando falta la tirosina quinasa JAK3. Ambos resultan en SCID

La principal característica clínica de esta inmunodeficiencia es la susceptibilidad a procesos infecciosos, siendo éste el dato característico de las IDPs y el que normalmente es reconocido por los médicos. Los pacientes desarrollan cuadros frecuentes, recurrentes y en ocasiones crónicos, involucrando gérmenes habituales, así como oportunistas. Principalmente, las infecciones suelen afectar el tracto respiratorio superior (sinusitis crónica, otitis media aguda de repetición, otitis media crónica), tracto respiratorio inferior (neumonías adquiridas en la comunidad graves, frecuentes o complicadas, bronquitis crónica), tracto gastrointestinal (diarrea crónica, diarrea aguda recurrente, malabsorción) y en ocasiones cursan con bacteremias y cuadros de sepsis.⁽⁴⁾

Con respecto al nivel **inmunológico**, aparece una grave linfopenia, con bajos niveles de linfocitos T y células naturales asesinas (células NK, *natural killer*). Los niveles séricos de inmunoglobulinas reflejan la presencia de IgG maternas y una ausencia de IgM, IgA e IgE.

El **diagnóstico** empieza con la sospecha por infecciones recurrentes desde edades muy tempranas por patógenos oportunistas como *Candida albicans*, *Pneumocystis jirovecii* o citomegalovirus usualmente tratadas en la sala de emergencias pediátricas, además de diarreas crónicas, infecciones bacterianas recurrentes de localización múltiple e infecciones persistentes a pesar del tratamiento convencional.

Ante la sospecha, se analiza la inmunidad celular a partir del cribado neonatal. Las pruebas confirmatorias incluyen: recuento de linfocitos, enumeración de los subconjuntos de linfocitos por citometría de flujo y pruebas moleculares de *IL2RG* (el único gen del que se sabe que sus variantes patogénicas producen X-SCID). Respecto al recuento total de linfocitos, el número de linfocitos T y de células NK es más bajo en comparación con los lactantes normales de la misma edad. Los linfocitos B están presentes, pero no son funcionales. La variante patógena en los varones afectados es detectada en

más de un 99% de los casos mediante el análisis de secuencia de la región codificante del gen *IL2RG*.⁽³⁾

El **manejo** de pacientes con X-SCID debe tener lugar en unidades pediátricas y normalmente requiere aislamiento protector para disminuir el riesgo de infección. Como medidas protectoras, no se debe administrar vacunas con microorganismos vivos al paciente o a sus cuidadores, y de ser necesarios productos sanguíneos, éstos deben ser irradiados, reducidos en el número de leucocitos y negativos para citomegalovirus. Se puede administrar también profilaxis para evitar infecciones, incluyendo terapia con inmunoglobulina parenteral (subcutánea o intravenosa), profilaxis para neumonía por *Pneumocystis jirovecii* con Trimetoprim-Sulfametoxazol, profilaxis para infecciones fúngicas con Fluconazol, anticuerpos monoclonales para virus sincitial respiratorio (Palivizumab) y profilaxis para virus de la familia de los herpesvirus con Aciclovir. De igual manera, se debe iniciar tratamiento sintomático con soporte de nutrición parenteral y tratamiento agresivo de las infecciones.⁽⁴⁾

La única terapia curativa definitiva que se ha venido empleando para todos los tipos de SCID es el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (CMH). Esta terapia reemplaza las células defectuosas de la médula ósea con las células sanas de un donante. No obstante, el trasplante de CMH también conlleva riesgos como infecciones virales potencialmente letales y la enfermedad de injerto contra hospedador o rechazo del injerto. También se debe tener en cuenta que el trasplante será exitoso si existe la posibilidad de generar nuevos linfocitos T, lo que depende de la función tímica que se relaciona sustancialmente con la edad del paciente. En pacientes que carecen de un donante adecuado para el trasplante de CMH, se estudia el uso de la terapia génica con CMH modificadas del propio paciente (trasplante autólogo).⁽⁵⁾

En las últimas décadas, la terapia génica ha mostrado un gran avance y se ha convertido en una de las grandes alternativas como tratamiento a esta enfermedad.

La **terapia génica** consiste en la modificación genética directa de las células del paciente con el objetivo de lograr resultados terapéuticos, pudiendo implicar la introducción de material genético en las células diana. Esta terapia se puede clasificar en dos categorías, dependiendo de cuáles son las células genéticamente modificadas, las de la línea germinal o las somáticas. La aplicación de estas técnicas a la línea germinal da lugar a una modificación permanente del genoma que puede transmitirse a los descendientes, lo que actualmente está prohibido en humanos por razones éticas. En cuanto a las células somáticas, busca modificar células o tejidos específicos del paciente sin que la modificación se transmita a la descendencia, siendo el procedimiento actualmente aceptado.

Algunos tipos de procedimientos de terapia génica ocurren *in vivo*, es decir, el ácido nucleico terapéutico, con ayuda o no de un vector, se introduce directamente en las células diana del paciente, a menudo mediante inyección en un órgano, como puede ser un músculo, un ojo o el cerebro, En otros casos, se introduce indirectamente en las células diana, por ejemplo, a través de una inyección en el torrente sanguíneo. (Figura 3)

La terapia génica *ex vivo* consiste en extraer células de un paciente, cultivarlas y modificarlas genéticamente *in vitro*, para luego devolver las células modificadas al paciente. Dado que las células del paciente son modificadas genéticamente en el laboratorio, tienen la enorme ventaja de que pueden analizarse en profundidad para identificar aquéllas en las que la modificación genética prevista ha sido exitosa. Las células correctamente modificadas pueden amplificarse en cultivo e inyectarse en el paciente. (Figura 3) ⁽⁶⁾

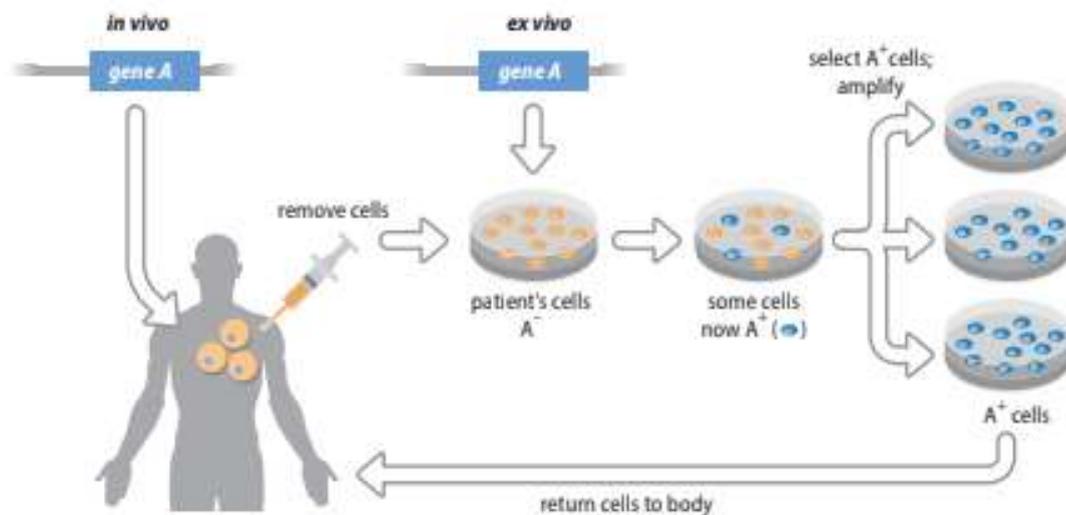


Figura 3: Terapia génica ex vivo e in vivo. En la terapia génica ex vivo, las células se extraen del paciente y se modifican genéticamente en el laboratorio (en este caso, se ilustra un procedimiento de aumento génico en el que un gen terapéutico, el transgen A, se expresa para hacer un producto genético, producto A, que falta en las células del paciente). Se seleccionan las células modificadas, se amplifican en cultivo y se reintegran al paciente. El procedimiento permite un control detallado de las células modificadas para asegurar que tengan la modificación genética correcta antes de que se devuelvan al paciente. En ocasiones, esta estrategia no es posible, y las células deben modificarse dentro del cuerpo del paciente (terapia génica in vivo).

En la práctica, la terapia génica ex vivo se ha dirigido a ciertos trastornos, principalmente sanguíneos (por ejemplo, la SCID por deficiencia en desaminasa de adenosina o ADA-SCID y la X-SCID), aunque también a algunos trastornos de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, la leucodistrofia metacromática), en los cuales las células modificadas genéticamente son células de la médula ósea que se han extraído del paciente y luego han sido tratadas para enriquecer las CMH corregidas genéticamente.

La terapia génica podría definirse actualmente como la provisión de fármacos, en donde el fármaco es un ácido nucleico suministrado a una célula diana con una formulación farmacéutica específica. El ácido nucleico suele estar protegido dentro de un vector para asegurar un viaje seguro al lugar de acción y

ser lo suficientemente eficiente para poder unirse a la membrana celular y permitir la entrada al sitio de acción intracelular. ⁽⁶⁾

En los **vectores virales**, esta protección está constituida por una cápside proteica. Además, algunos de ellos, como los retrovirus, poseen una envoltura adicional. Una capa formada por una bicapa lipídica, derivada de las células infectadas, con proteínas virales incrustadas que les aseguran el reconocimiento de receptores celulares para facilitar la entrada del virus en la célula.

Actualmente, entre los vectores virales más utilizados están los retrovirales y los virus adenoasociados (AAV). En el caso de los AAV, empleados fundamentalmente en terapia génica *in vivo*, se trata de parvovirus no asociados a enfermedades humanas, por lo que son relativamente seguros. Se elimina la mayoría del genoma del virus para que no se integre en el genoma del huésped y con ello se consigue disminuir el riesgo de las reacciones inmunes secundarias y la mutagénesis de inserción. Debido a estas ventajas, los vectores AAV se emplean comúnmente en la terapia génica. Sin embargo, tienen como limitación principal la restricción del tamaño de las construcciones en las que se pueden integrar los genes de interés, no pudiendo superar el inserto las 4,5 Kb.

Los vectores retrovirales, que incluyen a los gammaretrovirus y los lentivirus (LV), se usan principalmente en terapia génica *ex vivo*. El ciclo de vida del retrovirus implica la entrada celular, la transcripción inversa del genoma de ARN en un ADN complementario (cDNA) y la integración de éste en el genoma de la célula huésped. A diferencia de los gammaretrovirus, cuyo cDNA no puede atravesar la membrana nuclear, por lo que sólo se pueden emplear como vectores en células que se están dividiendo, el cDNA de los LV sí puede atravesar dicha membrana, de manera que los vectores LV se pueden emplear tanto en células que se dividen como en células diferenciadas que no se dividen. Los vectores retrovirales permiten la transferencia de insertos de mayor tamaño que los vectores AAV, de unas 8 Kb, y se produce la inserción de la construcción

genética en el genoma del huésped, lo que permite una expresión génica superior y mantenida. ⁽⁷⁾

La terapia génica se ha ido modificando y perfeccionando a lo largo de las últimas décadas, con diversos hitos que han tenido un gran impacto en su desarrollo.

El primer protocolo clínico aprobado oficialmente para introducir un gen foráneo en humanos fue aprobado por el Comité Asesor de ADN Recombinante (RAC) en diciembre de 1988. Así, en 1989, Rosenberg y colaboradores utilizaron un marcaje genético de células con el gen bacteriano *NeoR*, que confiere resistencia al antibiótico neomicina, para rastrear los movimientos y supervivencia a largo plazo de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en pacientes con melanoma metastásico. A partir de este ensayo inicial, Rosenberg trató a dos pacientes con melanoma metastásico con TIL modificados *ex vivo* que expresaban el factor de necrosis tumoral, revelando que no hubo un crecimiento de las células malignas en el lugar de la inyección.

El 14 de septiembre de 1990, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) aprobó por primera vez un ensayo de terapia génica con un intento terapéutico en humanos. Dos niñas que sufrían de deficiencia de adenosina desaminasa (ADA-SCID), una enfermedad monogénica que conduce a inmunodeficiencia combinada severa, fueron tratadas con linfocitos T extraídos de la sangre de estas pacientes y posteriormente modificados *ex vivo* para expresar el gen normal con la consiguiente producción de adenosina desaminasa. La primera paciente obtuvo una respuesta temporal positiva, mientras que la segunda tuvo una respuesta mucho menor. Aunque el beneficio clínico de la terapia no pudo ser evaluado, ya que también se administraron dosis reducidas de PEG-ADA junto a la terapia génica, los dos ensayos demostraron que los linfocitos T modificados persistieron en circulación diez años después del tratamiento y mejoró la calidad de vida de ambas pacientes.

La terapia génica experimentó un auge hasta 1999, año en que se produjo el primer evento negativo grave. Jesse Gelsinger, de 18 años, sufría una deficiencia parcial de ornitina transcarbamilasa (OTC), una enzima hepática del ciclo de la urea, que se requiere para la eliminación de exceso de nitrógeno. El sistema inmunitario de Gelsinger respondió inmediatamente después de una administración de dosis altas de adenovirus recombinantes y murió cuatro días después debido a un fallo multiorgánico. Este caso se convirtió en el primer paciente en el que su muerte podría estar directamente relacionada con el vector viral utilizado para el tratamiento. ⁽⁸⁾

Entramos en el siglo XXI y China se convirtió en el primer país en aprobar un producto basado en terapia génica para uso clínico (Gendicine™). Se trata de un vector adenoviral que recibió la aprobación para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Cabe destacar en este caso el hecho de que la Administración Estatal de Alimentos y Medicamentos de China (SFDA) aprobó Gendicine™ sin datos de un ensayo clínico estándar de fase III. En consecuencia, poco después de la aprobación de Gendicine™, se discutió la eficacia del tratamiento. ^{(8) (9)}

En 2008, CereproR, un medicamento basado en genes, que recibió la primera certificación comercial GMP (*Good Manufacturing Practice*) en la UE, se convirtió en el primer y hasta ahora el único vector adenoviral que ha completado un ensayo clínico de fase III. Sin embargo, el Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) desaconsejó su aprobación y la compañía retiró la solicitud de aprobación debido a las diferentes irregularidades que se produjeron durante el ensayo, lo que impedía demostrar los beneficios del medicamento. ⁽¹⁰⁾

A lo largo de este siglo, se han mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos para el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber (2009), ADA-SCID e inmunodeficiencia combinada severa ligada a X. (2010), síndrome de Wiskott-Aldrich (2010), la β -talasemia (2011) y hemofilia B (2011).

El 19 de julio de 2012, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) recomendó por primera vez un producto de terapia génica (Glybera) para su aprobación en la Unión Europea. Consiste en un vector AAV diseñado para expresar la lipoproteína lipasa en el tejido muscular para el tratamiento de la deficiencia grave de esta enzima. ⁽⁸⁾ ⁽⁹⁾

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica para valorar los beneficios y los riesgos de la terapia génica como tratamiento de la enfermedad en pacientes con inmunidad severa combinada ligada al X (X-SCID).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño del trabajo

Se trata de una revisión bibliográfica en la que se revisa y analiza a través de una lectura crítica la información disponible en la literatura científica sobre las aplicaciones de la terapia génica en el tratamiento de la inmunidad severa combinada ligada al X (X-SCID).

4.2 Fuente de extracción de documentos

Los artículos revisados en este trabajo se obtuvieron de la búsqueda directa de la bibliografía científica mediante distintas bases de datos, a través de internet. Las bases de datos utilizadas fueron MedLine (vía PubMed) base de datos de referencia sobre medicina basada en la evidencia.

4.3 Metodología de búsqueda

Para realizar la búsqueda de documentos en las diferentes bases de datos, inicialmente se definieron los términos de búsqueda mediante palabras clave en forma de Medical Subject Headings (MeSH), para ello se consultó el Thesaurus, desarrollado por la U.S National Library of Medicine. Se consideró adecuado el uso de los siguientes descriptores:

DESCRIPTORES	DeCS	MeSH
Terapia génica	Terapia Génica	Gene Therapy
X-SCID	Enfermedades por Inmunodeficiencia Combinada Ligada al Cromosoma X	X-Linked Combined Immunodeficiency Diseases

Así pues, en la ecuación de búsqueda se emplearon los términos Mesh: “X- Linked Combined Immunodeficiency Diseases” y “Gene Therapy”. La ecuación de búsqueda se formuló utilizando el conector booleano AND,

quedando de la siguiente forma: ("Gene Therapy"[Mesh]) AND "X-Linked Combined Immunodeficiency Disease"[Mesh].

La ecuación final resultante se desarrolló para su uso en la base de datos MedLine, vía PubMed, empleando el filtro temporal Published in the last five years.

La ecuación final de búsqueda fue la siguiente:

("Gene Therapy"[Mesh]) AND X-Linked Combined Immunodeficiency Diseases Filters: published in the last 5 years.

La búsqueda se realizó por última vez el 14 de diciembre a las 11:52h.

4.4 Selección de artículos

La selección de los artículos para su posterior estudio se realizó siguiendo y teniendo en cuenta unos criterios de selección con la finalidad de distinguir los artículos o documentos que aportaban información útil de aquellos que no poseían información relevante o deseada.

Los criterios de inclusión fueron:

- Los artículos escritos en inglés o castellano.
- Se aceptan revisiones bibliográficas y artículos originales.
- Aquellos artículos que trataran únicamente sobre la terapia génica y sus aplicaciones en la inmunodeficiencia severa ligada al X.

Se excluyeron los documentos que:

- Trataban otros aspectos relacionados con la terapia génica y sobre las aplicaciones de la terapia génica en otras enfermedades.
- No se podían consultar por no estar disponible la versión completa del texto a través del acceso personalizado de la UMH.
- Los artículos identificados como publicación duplicada.

El número de documentos se amplió examinando las referencias bibliográficas citadas en los artículos seleccionados inicialmente, con la finalidad de obtener un mayor volumen de información relevante.

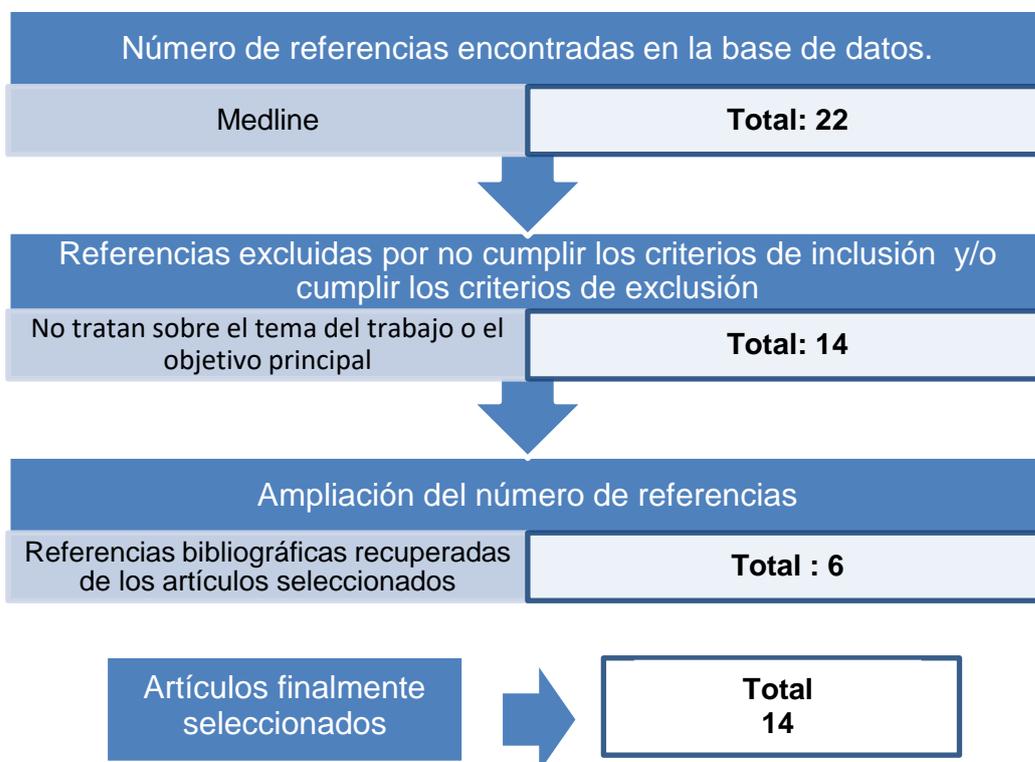
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados de la búsqueda

Después de aplicar los criterios de búsqueda y los filtros, se obtuvieron un total de 22 referencias de la base de datos empleada, de las cuales catorce fueron excluidas por no cumplir los criterios de inclusión comentados anteriormente.

Por otro lado, de la revisión de las referencias bibliográficas de los artículos seleccionados se recuperaron 6 artículos. Finalmente, fueron seleccionados 14 artículos para el análisis.

Así pues, se puede observar mediante el siguiente diagrama la metodología utilizada en la selección de documentos que finalmente se revisaron en este trabajo:



5.2 Análisis de los resultados

En este apartado, se analiza cronológicamente la información recabada desde el año 2000, cuando se publica el primer ensayo de terapia génica para la inmunidad severa combinada ligada al X (X-SCID) hasta la actualidad.

5.2.1 Primer ensayo de terapia génica para la X-SCID

La transferencia de genes a las células madre hematopoyéticas (CMH) de pacientes con hemoglobinopatías, deficiencias inmunes congénitas y enfermedades de almacenamiento lisosómico, seguidas de su trasplante autólogo, podría proporcionar los mismos beneficios que el trasplante alogénico, sin las complicaciones inmunológicas del rechazo del injerto, la enfermedad del injerto contra el huésped y la terapia inmunosupresora postrasplante.

Se intentó la terapia génica para la X-SCID, ya que ofrece un modelo confiable para la terapia génica y se trata de una condición letal para la que su única cura mediante trasplante alogénico de médula ósea presentaba muchas complicaciones. Los experimentos previos de transferencia *in vitro* del gen *IL2RG* (también conocido como γ_c) habían demostrado la restauración de su expresión, así como el desarrollo de linfocitos T y células NK.

El vector con el transgén empleado (MGF- γ_c) es una construcción gammaretroviral basada en el virus de la leucemia murina de Moloney (MFG) en la que el cDNA del gen *IL2RG* se expresa bajo el control del promotor y secuencias potenciadoras (*enhancers*) presentes en el LTR (repetición terminal larga, *Long Terminal Repeat*) 5' del vector. (Figura 4)

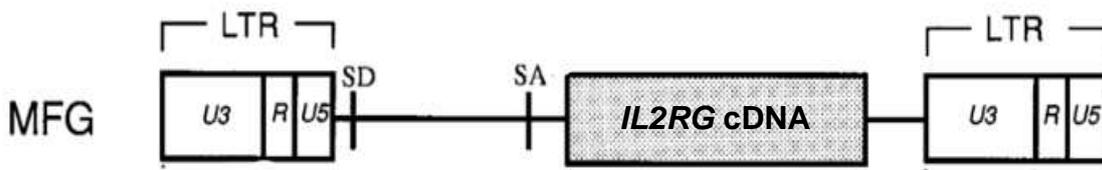


Figura 4: Representación esquemática del vector retroviral MFG con el transgén *IL2RG*.

A finales del siglo XX, en el Hospital Necker de Paris, Francia, se trataron dos pacientes de 11 y 8 meses afectados de X-SCID que cumplieron los criterios de elegibilidad para un ensayo de terapia génica *ex vivo* con *IL2RG*. El diagnóstico de la enfermedad se basó en la determinación del fenotipo de linfocitos sanguíneos y la identificación de mutaciones en el gen *IL2RG* en ambos pacientes.

Después de la extracción de médula y la separación de las células CD34+ (CMH), se preactivaron 9.8×10^6 y 4.8×10^6 células CD34+ por kilogramo de peso corporal de P1 y P2, respectivamente, y a continuación se infectaron durante 3 días con el sobrenadante que contenía la construcción MFG- γ c. Tras la transformación, se infundieron en los pacientes sin quimioablación y sin acondicionamiento con inmunosupresores en P1 y P2.

Los recuentos de linfocitos T aumentaron a partir del día 30 en P1, mientras que los linfocitos T que expresaban *IL2RG* se detectaron en la sangre de P2 en el día 60, produciéndose a continuación un incremento notable en los conteos de linfocitos T (Figura 5). Las células asesinas naturales (células NK, *natural killer*) que expresaban *IL2RG* se detectaron en la sangre de P2 en el día 30. En P2, sólo se pudieron detectar a los 150 días (Figura 5).

Estos resultados demuestran que, en los dos pacientes, se confirió una ventaja selectiva a las células progenitoras de los linfocitos T y las células NK, lo que permitió el desarrollo completo de ambos tipos celulares maduros y funcionales. Como consecuencia del desarrollo y la función sostenida del

sistema inmune, se observó una mejoría clínica en ambos pacientes. P1 y P2 abandonaron el aislamiento protector en los días 90 y 95, y pudieron estar en casa 11 y 10 meses, respectivamente, después de la transferencia génica sin ningún tratamiento adicional. Ambos disfrutaron de un crecimiento y desarrollo psicomotor normales, y no se observaron efectos secundarios. ^{(11) (12)}

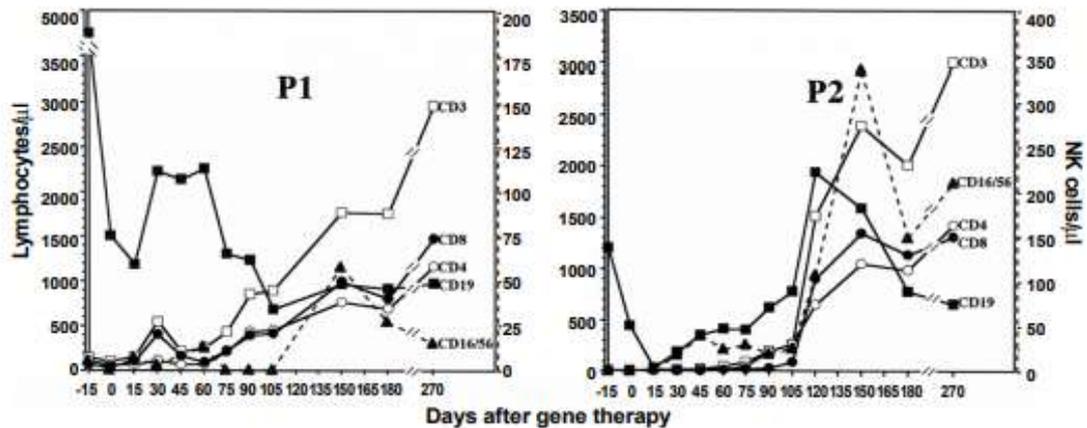


Figura 5: Estudio longitudinal de subconjuntos de linfocitos del paciente 1 (P1) y del paciente 2 (P2). Los recuentos absolutos de linfocitos T (CD3, CD8 y CD4), linfocitos B (CD19) y células NK (CD16, CD56) se muestran en función del tiempo. El día 0 es la fecha de inicio del tratamiento. La escala para las células NK está en el lado derecho de cada panel.

5.2.2 Complicaciones de la terapia génica

Los resultados anteriores y un segundo informe de ese mismo año sobre el bienestar prolongado de los dos pacientes convencieron a la comunidad científica de que por fin se había logrado culminar con éxito un ensayo de terapia génica en la especie humana.

El mismo grupo que trató a los dos lactantes P1 y P2 incorporó a 8 nuevos pacientes con X-SCID, a los que trataron con el mismo método de trasplante de células autólogas de médula ósea con corrección genética. Siendo en total 10 los pacientes estudiados.

Siete de los nuevos pacientes desarrollaron la función normal de los linfocitos T y B después de la terapia génica y no requirieron más tratamiento, incluidas las infusiones intravenosas de inmunoglobulina, mostrándose la terapia ineficaz en P3 debido a esplenomegalia persistente (Figura 6.A). Sin embargo, durante los meses 30 y 34, se observó en P4 y P5 un incremento exponencial en el número de linfocitos T, aumentando hasta 300,000 por μl (Figura 6.B). P4 y P5 fueron diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda T (ALL-T). Tras esto, se inició el tratamiento convencional para ALL-T. El tratamiento de P5 se inició bajo el protocolo ALL-T del Grupo de Estudio de Cáncer Infantil, se completó su remisión clínica completa tras los dos meses y se mantuvo. El tratamiento para P4 no fue eficaz y murió a causa de la leucemia, siendo el segundo caso de muerte atribuible a un ensayo de terapia génica.

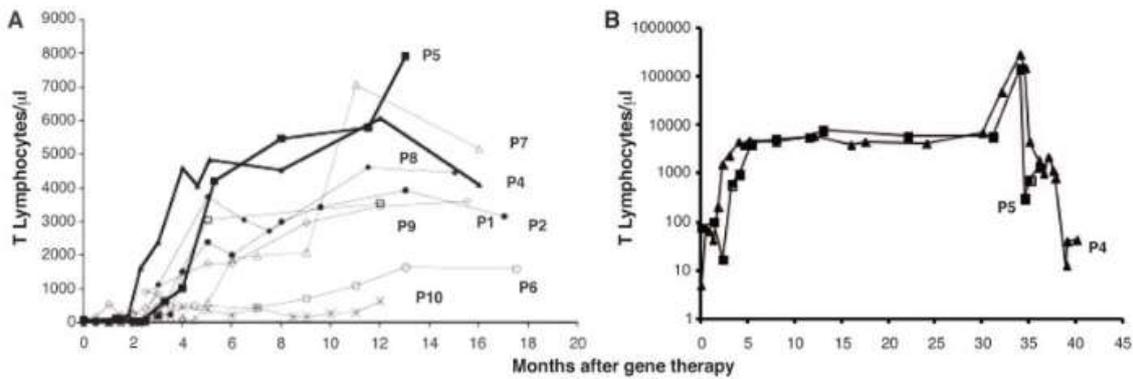


Figura 6: Cinética y características de los linfocitos T anormales en P4 y P5. (A) Cinética longitudinal de recuentos de linfocitos T en la sangre de los pacientes tratados (P1, P2 y P4 a P10), que recuperaron la inmunidad de los linfocitos T. (B) Cinética de los linfocitos T de P4 (triángulos) y P5 (cuadrados), que desarrollaron una proliferación incontrolada de linfocitos T.

Se demostró que la complicación fue debida a una población clonal expandida de células T positivas gamma-delta circulantes. El clon de linfocitos T que transportaba el transgén se insertó en el gen del cromosoma 11 *LMO2*, un protooncogén.

El producto del gen *LMO2* es crucial para la hematopoyesis normal y cumple una función reguladora en el desarrollo de las células progenitoras. En P4 y P5, este protooncogén, debido a cambios genéticos, como las inserciones de la construcción genética empleada, sufrió una conversión oncogénica que dio lugar a su expresión aberrante, lo que produjo ALL-T infantil. En el caso de P4, la inserción ocurrió en un intrón del gen, y en P5, tuvo lugar en la región 5' del gen. (Figura 7)

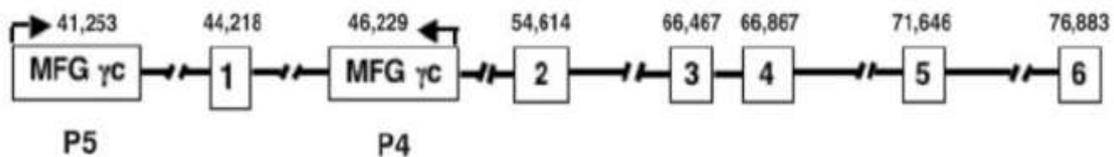


Figura 7: Mapa del gen *LMO2* con las inserciones activadoras oncogénicas de la construcción genética

La mutagénesis insercional es una complicación potencial de los intentos de transferencia génica con vectores gammaretrovirales, debido a la preferencia que tienen en insertarse en regiones 5' e intrones de genes que se transcriben activamente, como sucede con el gen *LMO2* en las CMH. Los vectores gammaretrovirales tienen el potencial de inducir un cambio maligno si se insertan dentro o cerca de un gen que regula el crecimiento celular, debido a los potentes potenciadores de la transcripción presentes en la LTR 5' del vector que incrementan la expresión del gen. ^{(13) (14)}

Con posterioridad, los pacientes P7 y P10 de este estudio también desarrollaron ALL-T, pudiendo ser curados. En un ensayo adicional de similares características realizado en Londres, en el que se trataron 10 pacientes, se observó el desarrollo de ALL-T en uno de ellos, que sobrevivió.

En resumen, de un total de 20 pacientes en ambos ensayos, 5 pacientes desarrollaron ALL-T, de los que falleció uno de ellos. Cuatro de los pacientes presentaron la inserción en el gen *LMO2* y uno en el gen *CCND2*. ⁽¹⁵⁾

5.2.3 Resultados a largo plazo

Antes de poder asegurar el éxito completo de la terapia génica en pacientes con X-SCID tras los resultados obtenidos a corto plazo y conocer realmente hasta qué punto este tratamiento estaba asociado con un riesgo de leucemia aguda y la magnitud de esa consecuencia, era preciso la observación de los resultados a largo plazo. Para ello, se estudió el estado de los pacientes transcurridos 10 años de la terapia inicial en el Hospital Necker. No se incluye en el estudio a P9, que fue tratado en Australia.

Todos los niños, excepto uno, incluidos los tres sobrevivientes de leucemia, presentaron reconstitución del sistema inmune, observándose la presencia sostenida de linfocitos T con características funcionales normales (Figura 8). Uno de los pacientes recibió tratamiento de reemplazo con inmunoglobulinas. La reconstitución de células T fue similar a la presentada en pacientes que se sometieron con éxito a un trasplante alogénico de CMH. Se observó cierta variabilidad individual en la reconstitución de linfocitos T, que parecía correlacionarse fuertemente con el número de células transducidas inyectadas y la diversidad de sitios de integración dentro del conjunto de células. En todos los pacientes, a diferencia de lo observado en los resultados a corto plazo, no se detectaron linfocitos B derivados de las células transducidas, observándose una deficiencia a largo plazo tanto de linfocitos B como de células NK. Todos los pacientes, pudieron vivir normalmente en un entorno no protegido y hacer frente a los microorganismos sin consecuencias perjudiciales mientras crecían normalmente en peso y en altura. Todos asistieron regularmente al colegio y, con la excepción de uno de ellos, no tuvieron retrasos en la progresión entre cursos.

En conclusión, la terapia génica *ex vivo* para X-SCID puede resultar en la corrección del fenotipo SCID. Sin embargo, no se produjo a largo plazo una colonización eficiente de la médula ósea con las células progenitoras de linfocitos B y de células NK, y no se podía ignorar el riesgo de desarrollar una afección maligna relacionada con el tratamiento. ⁽¹⁶⁾

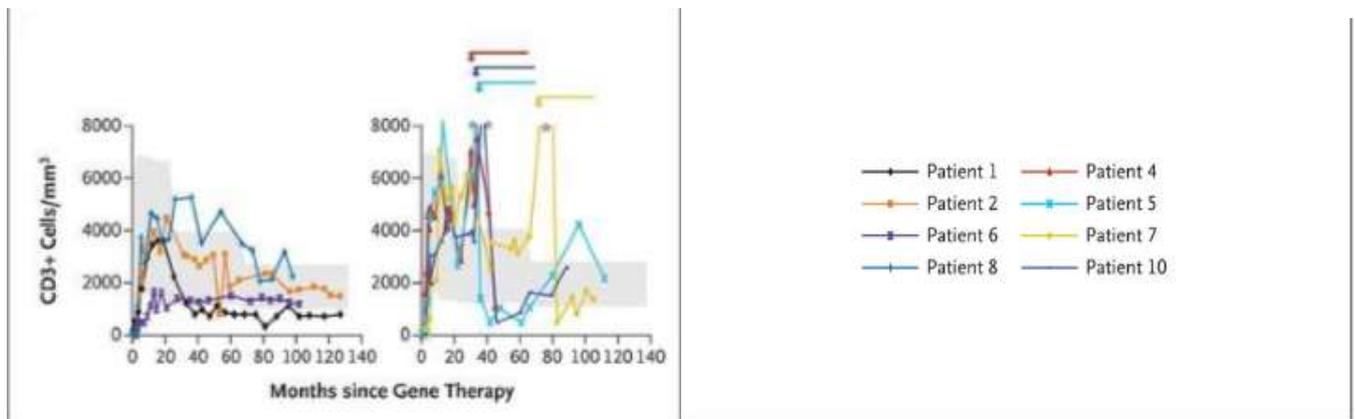


Figura 8: Reconstitución de linfocitos T a largo plazo.

5.2.4 Desarrollo de nuevos vectores.

En los ensayos iniciales de terapia génica dirigida a X-SCID, se usó un vector derivado del gammaretrovirus de la leucemia murina de Moloney (MFG) de primera generación al que se le había insertado para su expresión el cDNA de *IL2RG* (MFG- γ c). Esta construcción molecular contenía potentes secuencias potenciadoras (*enhancers*) dentro de las LTR que indujeron la transactivación de los protooncogenes *LMO2* o *CCND2* en los pacientes que desarrollaron leucemia.

Durante la siguiente década, se desarrolló un vector de segunda generación. Un vector gammaretroviral auto-inactivante (SIN- γ c), en el que se eliminó el potenciador de la región U3 de los LTR del MFG, de modo que la integración viral tendría menos probabilidad de transactivar un gen cercano. Estos vectores auto-inactivantes, o SIN, necesitaban estar equipados con un promotor interno para impulsar la expresión del gen de interés. Estos promotores pueden expresarse de forma ubicua para impulsar una expresión transgénica robusta y sostenida en las células diana. La desventaja es que son propensos a

la sobreexpresión y la expresión errónea en las células progenitoras tempranas, y pueden silenciarse por metilación. (Figura 9). ^{(15) (17)}

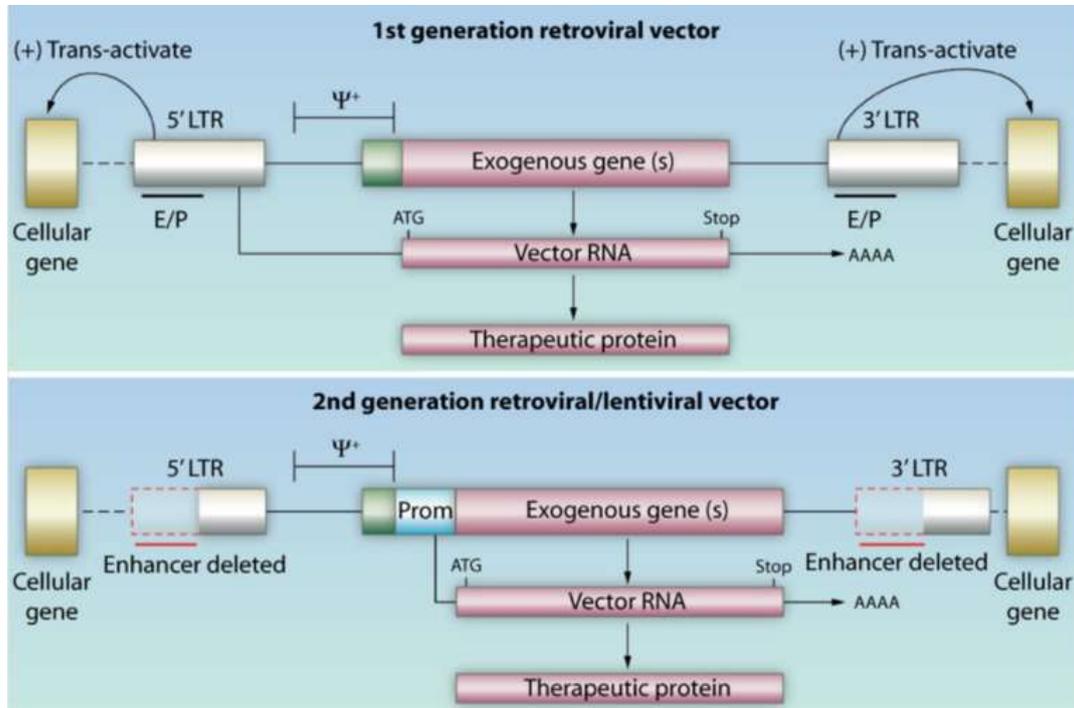


Figura 9: En los vectores retrovirales *IL2RG* de primera generación, el potenciador y los promotores (E / P) de los LTR pueden trans-activar protooncogenes celulares adyacentes a los sitios de integración de vectores (líneas discontinuas). En los vectores retrovirales *IL2RG* de segunda generación, los potenciadores se eliminan y los promotores internos impulsan la transcripción del gen exógeno.

Se realizó un primer ensayo usando un vector gammaretroviral SIN con el cDNA de *IL2RG* (SIN- γ C) con la finalidad de comprobar si el promotor incorporado era tan potente como el del LTR 5' para la expresión del gen y si la modificación evitaría la mutagénesis oncogénica de inserción.

Se incluyeron nueve niños con mutaciones en *IL2RG*. A continuación, se extrajeron células CMH, se sometieron a transducción con sobrenadante de grado clínico SIN- γ C y se infundieron en los pacientes con una dosis media de 7.8×10^6 por kilogramo sin acondicionamiento previo.

Sobrevivieron ocho de nueve pacientes. El paciente 5 murió por una infección de adenovirus diseminada preexistente 4 meses después de la terapia génica. En los 7 pacientes restantes, se observó la eliminación de infecciones preexistentes, producción de linfocitos T y una cinética de recuperación de los números de linfocitos T similar a la de ensayos anteriores en los que se usaron vectores con sus LTR completos (Figura 10). No se observó la reconstitución sostenida de células B, ni células NK. Ninguno de los pacientes mostró efectos secundarios adversos de gran calibre como el diagnóstico de ALL-T. ⁽¹⁸⁾

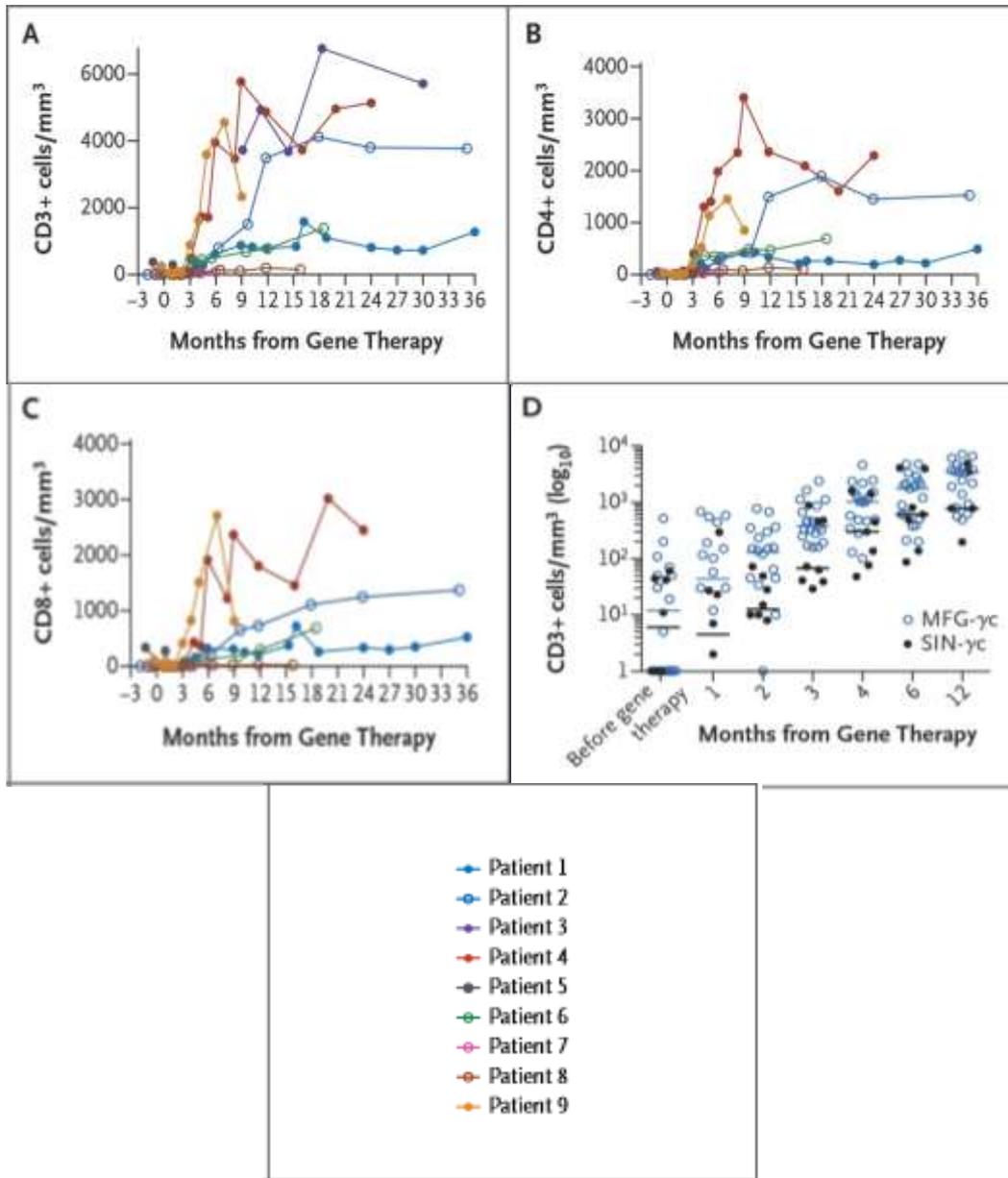


Figura 10: Los paneles A, B y C muestran cambios a lo largo del tiempo en el número de linfocitos T CD3 +, CD4 + y CD8 +, respectivamente. El panel D muestra los recuentos de células CD3 + en los momentos indicados después de la terapia génica, en comparación entre los 20 pacientes inscritos en ensayos previos usando el vector MFG-yc.

5.2.5 Terapia génica lentiviral combinada con Busulfán

Como hemos visto, la terapia génica con vectores gammaretrovirales de primera generación restauró la inmunidad de linfocitos T, pero dio como resultado leucemia inducida por los LTR de los vectores. La segunda generación de estos vectores (vectores SIN) tuvo un programa de seguridad mejorado, pero no restableció la inmunidad de los linfocitos B y las células NK cuando se utilizó sin quimioterapia acondicionadora.

Los vectores lentivirales, otro tipo de vector retroviral, presentan una serie de ventajas respecto a los gammaretrovirales. A diferencia de éstos, los lentivirales no tienen tendencia a insertarse cerca de los promotores y elementos reguladores de los genes que se transcriben activamente, reduciendo así la probabilidad de activación oncogénica de protooncogenes. Además, son capaces de transducir células que no se dividen, lo que permite reducir el tiempo de cultivo al eliminar la necesidad de tratar las células con citocinas para inducir la división celular. Este es un aspecto importante, ya que poder mantener *ex vivo* las poblaciones de CMH en su estado natural de división lenta es crítico para la implantación efectiva de las células tras el trasplante. Finalmente, los vectores lentivirales permiten la integración de transgenes de mayor tamaño que los permitidos por los vectores SIN gammaretrovirales.

Sin embargo, al igual que los vectores gammaretrovirales, los lentivirales también se integran en el genoma del huésped de forma semialeatoria, no pudiéndose descartar su inserción en protooncogenes. Por tanto, se procedió a la eliminación de las secuencias *enhancer*-promotor de los LTR de los vectores lentivirales, dando como resultado vectores lentivirales SIN con un menor riesgo de tumorigénesis por inserción. (Figura 9).^{(19) (20)}

En un nuevo ensayo, se utilizó un vector lentiviral SIN para transferir el cDNA de *IL2RG* a CMH tras acondicionamiento no mieloablativo con dosis reducida de busulfán. Se incluyeron ocho recién nacidos (edad media, 3.5 meses) con X-SCID recién diagnosticado. Antes de la terapia génica, los

pacientes 1, 7 y 8 tenían injerto de linfocitos T maternos y cinco pacientes tenían infecciones preexistentes. Antes de la infusión de células CMH transducidas, todos los pacientes recibieron dosis individualizadas de busulfán.

En siete de los lactantes, la combinación de un vector lentiviral SIN y acondicionamiento con busulfán resultó en una reconstitución inmunológica amplia y una transducción eficiente de la construcción molecular a diversos linajes, que incluyen linfocitos T, linfocitos B, células NK, células mieloides y células progenitoras de la médula ósea. El octavo bebé presentó inicialmente un recuento insuficiente de linfocitos T, pero éstos se desarrollaron en el paciente después de un impulso de células con corrección genética sin acondicionamiento de busulfán. (Figura 11).

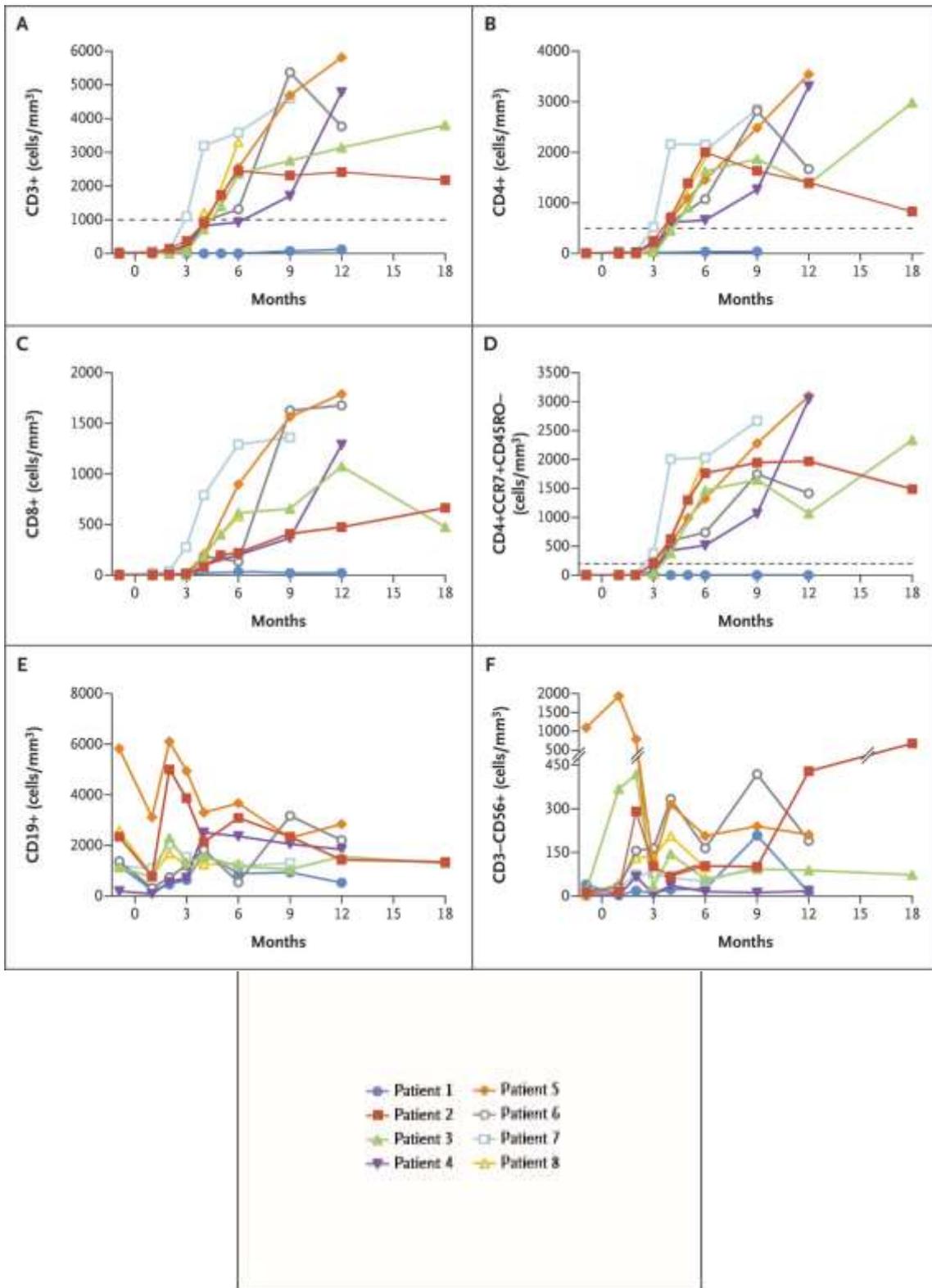


Figura 11: Reconstitución inmune después de la terapia génica. Los paneles A, B, C y D muestran cambios a lo largo del tiempo en el número de linfocitos T CD3 +, CD4 +, CD8 + y CD4+ CCR7+ CD45RO-. El panel E muestra cambios a lo largo del tiempo en el número de linfocitos B y el panel F muestra cambios a lo largo del tiempo en el número de células NK.

Las infecciones previas desaparecieron en todos los lactantes y todos continuaron creciendo normalmente. Los niveles de IgM se normalizaron en siete de los ocho lactantes, de los cuales cuatro interrumpieron la administración de suplementos de inmunoglobulina intravenosa. Tres de estos cuatro bebés tuvieron una respuesta a las vacunas.

En conclusión, la terapia génica con un vector lentiviral SIN y acondicionamiento con una baja exposición de busulfán en lactantes con X-SCID recién diagnosticado no mostró efectos tóxicos graves destacables y dio lugar a la correcta implantación en la médula ósea de células transducidas de múltiples linajes celulares, reconstitución de linfocitos T y B funcionales, y normalización de los conteos de células NK durante un seguimiento medio de 16 meses. ⁽²⁰⁾

6. CONCLUSIÓN

La terapia génica ha supuesto una innovación y avanza hacia una cura definitiva para la X-SCID.

La utilización de vectores gammaretrovirales de primera generación sin acondicionamiento previo de la médula ósea reconstituye la inmunidad de linfocitos T, aunque no la de linfocitos B y células NK a largo plazo.

El uso de vectores gammaretrovirales de primera generación, además, presenta el riesgo de inducción oncogénica de protooncogenes por mutagénesis insercional.

El desarrollo de nuevos vectores retrovirales (gammaretrovirales y lentivirales) auto-inactivantes evitan la mutagénesis insercional y la consiguiente aparición de leucemia.

La utilización de un vector lentiviral auto-inactivante y quimioterapia acondicionadora de médula ósea permite el restablecimiento de la inmunidad tanto de linfocitos T como de linfocitos B y células NK

Actualmente, los resultados evidencian que la terapia es segura, bien tolerada por los pacientes y con mejoras sintomáticas significativas. No obstante, se requiere continuar la investigación para su optimización.

7. REFERENCIAS

1. Partida A, Tutor G, Sara D, Espinosa E, México P. INP UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. 2014.
2. Immunodeficiency Disorders and Neoplasias of the Lymphoid System | Oncohemakey Key [Internet]. [cited 2020 Jan 23]. Available from: <https://oncohemakey.com/immunodeficiency-disorders-and-neoplasias-of-the-lymphoid-system/>
3. Martínez Martínez L. Diagnóstico Molecular y Genético de Inmunodeficiencias Primarias ligadas al X.
4. X-Linked Severe Combined Immunodeficiency - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2020 Jan 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301584>
5. Booth C, Gaspar HB, Thrasher AJ. Treating Immunodeficiency through HSC Gene Therapy. Vol. 22, Trends in Molecular Medicine. Elsevier Ltd; 2016. p. 317–27.
6. Schinzel A. Genetics and Genomics in Medicine. Eur J Hum Genet. 2015 May;23(5):719–719.
7. Heilbronn R, Weger S. Viral vectors for gene transfer: Current status of gene therapeutics. Vol. 197, Handbook of Experimental Pharmacology. 2010. p. 143–70.
8. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. Gene. 2013 Aug 10;525(2):162–9.
9. Keeler AM, ElMallah MK, Flotte TR. Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions. Vol. 10, Clinical and Translational Science. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 242–8.
10. CHMP. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA RETIRADA DE LA SOLICITUD DE COMERCIALIZACIÓN para CEREPRO [Internet]. [cited 2020 Jan 23]. Available from: <http://www.emea.europa.eu>
11. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, De Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nussbaum P, et al. Gene therapy for XSCID: The first success of gene therapy. *Pediatr Res*. 2000;48(5):578.
12. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, De Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nussbaum P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* (80-). 2000 Apr 28;288(5466):669–72.
13. Buckley RH. Gene therapy for SCID - A complication after remarkable progress. Vol. 360, *Lancet*. Elsevier Limited; 2002. p. 1185–6.
14. 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* (80-). 2003 Oct 17;302(5644):415–9.
15. Scott CT, Defrancesco L. Gene therapy's out-of-body experience. *Nat Biotechnol*. 2016 Jun 9;34(6):600–7.
16. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Picard C, Wang GP, Berry CC, et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2010 Jul 22;363(4):355–64.
17. Cavazzana M, Six E, Lagresle-Peyrou C, André-Schmutz I, Hacein-Bey-

- Abina S. Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency: Where Do We Stand? *Hum Gene Ther*. 2016 Feb 1;27(2):108–16.
18. Hacein-Bey-Abina S, Pai S-Y, Gaspar HB, Armant M, Berry CC, Blanche S, et al. A Modified γ -Retrovirus Vector for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Oct 9 [cited 2020 Jan 23];371(15):1407–17. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1404588>
 19. Popping the Bubble: Promising Results From a Phase I-II Lentiviral Gene Therapy Trial for X-SCID. 2019;
 20. Mamcarz E, Zhou S, Lockey T, Abdelsamed H, Cross SJ, Kang G, et al. Lentiviral Gene Therapy Combined with Low-Dose Busulfan in Infants with SCID-X1. *N Engl J Med* [Internet]. 2019 Apr 18 [cited 2020 Jan 23];380(16):1525–34. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1815408>