



FACULTAD DE FARMACIA

GRADO EN FARMACIA

Terapia génica de la Leucodistrofia Metacromática.

Memoria de trabajo de fin de grado.

Sant Joan d'Alacant

2022

Autor: Isabel Bardisa Serrano.

Modalidad: Revisión bibliográfica.

Tutor: Antonio Martínez Laborda.

ÍNDICE:

1. RESUMEN.....	3
2. PALABRAS CLAVE.....	3
3. ABREVIATURAS.....	4
4. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	5
A. LEUCODISTROFIA METACROMÁTICA.....	5
B.TERAPIA GÉNICA.....	10
5. OBJETIVOS.....	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
A.TRES PRIMEROS PACIENTES.....	19
a. Eficacia.....	19
b. Seguridad.....	24
B. AMPLIACIÓN A NUEVE PACIENTES.....	25
a. Eficacia.....	26
b. Seguridad.....	31
C. AMPLIACIÓN A 29 PACIENTES.....	31
a. Eficacia.....	32
b. Seguridad.....	36
D. LIMITACIONES Y COMERCIALIZACIÓN.....	37
8. CONCLUSIÓN.....	38
9. BIBLIOGRAFÍA.....	39

1. RESUMEN.

La leucodistrofia metacromática es un síndrome neurodegenerativo letal con herencia autosómica recesiva, perteneciente al grupo de las enfermedades de depósito lisosomal. La enfermedad se debe, en la mayoría de los casos, a la deficiencia de la enzima lisosomal arilsulfatasa A (ARSA) y, más raramente, a la deficiencia en proteína B activadora de esfingolípidos (Sap B). Esta deficiencia produce la acumulación de sulfátidos, presentes en la mielina, formándose así los gránulos metacromáticos en los oligodendrocitos, macrófagos y algunas neuronas del sistema nervioso central (SNC), así como en las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP), lo que resulta en desmielinización y, en consecuencia, en deterioro motor y cognitivo progresivo.

Los tratamientos convencionales de esta patología no son eficaces para curar o disminuir los síntomas del deterioro motor y cognitivo, periférico y central, debido a que no consiguen ni curar la enfermedad ni reducir o detener completamente su sintomatología, porque o no tienen eficacia o si la tienen es temporal y solo sobre la neuropatía del SNC, no sobre la neuropatía periférica.

Como resultado, se comenzó a estudiar la terapia génica, empleando una estrategia en la que se trasplantaban células madre hematopoyéticas autólogas modificadas mediante vectores lentivirales para sobreexpresar el gen ARSA.

Se realizó un ensayo clínico en el que se estudió la eficacia y la seguridad en pacientes con MLD infantil tardía y MLD juvenil temprana. Se observó un aumento de la actividad ARSA en SNP y SNC, una mejoría de la función motora gruesa y del coeficiente intelectual, y una disminución de la desmielinización y atrofia cerebral.

2. PALABRAS CLAVE.

Arilsulfatasa A (ARSA), Leucodistrofia metacromática, Terapia génica, Vector Lentiviral.

3. ABREVIATURAS.

<u>AAV</u> : virus adenoasociados.	<u>MLD</u> : leucodistrofia metacromática.
<u>ADA-SCID</u> : inmunodeficiencia combinada severa por deficiencia de adenosina desaminasa.	<u>MPB</u> : sangre periférica movilizada.
<u>ARSA</u> : arilsulfatasa A.	<u>mU</u> : cantidad de enzima requerida para convertir 1 nanomol de sustrato hidrolizado, en 1 min a 37°C, nmol/ml/h.
<u>Arsa-cel</u> : Atidarsagene autotemcel.	<u>MUS</u> : 4-methyl-umbellipheryl-sulphate.
<u>BBB</u> : barrera hematoencefálica.	<u>NCV</u> : velocidad de conducción nerviosa.
<u>BM</u> : médula ósea.	<u>PB</u> : sangre periférica.
<u>CBCT</u> : trasplante de células de la sangre del cordón umbilical.	<u>PBMC</u> : células mononucleares de sangre periférica.
ERT: terapia de reemplazo enzimático.	<u>PEG-ADA</u> : adenosina desaminasa conjugada con polietilenglicol.
<u>GMFM</u> : medida de la función motora gruesa.	<u>Sap</u> : Saponina.
<u>GMF-CMLD</u> : motricidad gruesa en la escala de funciones para MLD.	<u>SCID-X1</u> : inmunodeficiencia combinada severa ligada al X.
<u>HDs</u> : individuos sanos.	<u>SNC</u> : sistema nervioso central.
<u>HSC</u> : células madre hematopoyéticas.	<u>SNP</u> : sistema nervioso periférico.
<u>HSCT</u> : trasplante de células madre hematopoyéticas.	<u>TIL</u> : linfocitos infiltrantes de tumor.
<u>IS</u> : sitios de integración.	<u>UCLA</u> : Universidad de California en Los Ángeles.
<u>LI</u> : pacientes/hermanos no tratados.	<u>VCN</u> : copias del vector con el transgén por genoma.
<u>LCR</u> : líquido cefalorraquídeo.	
<u>LLQ</u> : límites inferiores de cuantificación.	

4. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

A. LEUCODISTROFIA METACROMÁTICA.

La leucodistrofia metacromática (MLD) es un síndrome neurodegenerativo con herencia autosómica recesiva, perteneciente al grupo de las enfermedades de depósito lisosomal, caracterizadas por deficiencias hereditarias de enzimas implicadas en la degradación de macromoléculas en los lisosomas. ⁽¹⁾ Se trata de una enfermedad rara, con una prevalencia mundial de 1:40.000 a 1:160.000.

⁽²⁾

La enfermedad se debe, en la mayoría de los casos, a la deficiencia de la enzima lisosomal arilsulfatasa A (ARSA) y, más raramente, a la deficiencia en proteína B activadora de esfingolípidos (Sap B o saposina B), como consecuencia de mutaciones de pérdida de función en los genes *ARSA* y *PSAP*, respectivamente.

La degradación de los sulfátidos, que en el sistema nervioso son galactocerebrósidos con la galactosa sulfatada, tiene lugar gracias a un primer paso, la eliminación del grupo sulfato, catalizado por ARSA (Figura 1). Los sulfátidos están entre los esfingolípidos más comunes de la mielina, la vaina protectora que recubre los axones de las neuronas, producida por los oligodendrocitos en el sistema nervioso central (SNC) y las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP).

La acumulación de sulfátidos, por la deficiencia de ARSA, da lugar a los gránulos metacromáticos en las tinciones con azul de toluidina de los oligodendrocitos, macrófagos y algunas neuronas del SNC, así como en las células de Schwann en el SNP, y resulta en desmielinización y, en consecuencia, en los deterioros motor y cognitivo progresivos que caracterizan a la MLD.

El gen *PSAP* codifica un precursor, la prosaposina (pSap) que, al escindirise, da las cuatro saposinas (SapA, SapB, SapC y SapD). Una deficiencia de todas ellas es una condición muy grave, letal entre el primer y cuarto mes, la encefalopatía por deficiencia de prosapina. La deficiencia únicamente de SapB, sin afectar a las otras saposinas, también causa MLD. SapB actúa como cofactor

de ARSA, formando un complejo con el sulfátido que es esencial para la acción de la enzima (Figura 1).⁽¹⁾

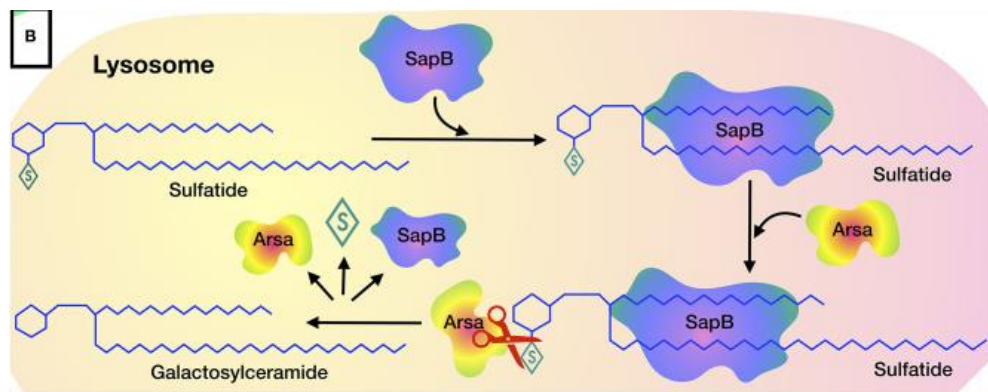


Figura 1: Degradación de los sulfátidos. La degradación se produce en el lisosoma, donde se requiere la proteína SapB para la hidrólisis del sulfátido por la enzima ARSA, mediante escisión del grupo sulfato.

La manifestación clínica del déficit de ARSA es diversa en cuanto a la edad de inicio, la velocidad de progresión y los síntomas iniciales. Esto se traduce en la existencia de tres subtipos clínicos de MLD, que se distinguen principalmente por la edad de aparición:

- MLD infantil tardía, que comprende del 50% al 60% de las personas afectadas. Es la forma más grave de la enfermedad. Su manifestación clínica comienza antes de los 30 meses de edad y se caracteriza por la ausencia de actividad ARSA o por una actividad residual, lo que conlleva una rápida neurodegeneración. Como resultado, en ausencia de terapia, se produce la muerte a los pocos años desde el inicio de la enfermedad.
- MLD juvenil temprana, aproximadamente 20%-30%. Se manifiesta clínicamente con una edad de inicio entre los 30 meses y los 16 años. Se caracteriza por una progresión más lenta que la de la forma infantil tardía. La muerte de la mayoría de los pacientes se produce antes de los 20 años, aunque la supervivencia es variable.
- MLD adulta, aproximadamente 15%-20%. Su manifestación clínica suele darse una vez cumplidos los 16 años, pudiendo comenzar los síntomas, en ocasiones, en la cuarta o quinta década de vida. Presenta una progresión lenta de la enfermedad, con períodos de relativa estabilidad junto a otros de regresión. Sin embargo, la etapa final es similar a la de

las formas infantil tardía y juvenil temprana. La duración de la enfermedad desde el inicio de los síntomas oscila entre varios años y décadas, con una esperanza de vida del paciente de unos 20 a 30 años tras el diagnóstico.⁽²⁾

El gen *ARSA* presenta dos tipos de alelos de pérdida de función implicados en la MLD: los alelos nulos 0, que no codifican una enzima activa, y los alelos R, que codifican una enzima con actividad residual, igual o menor a 1%.

Los individuos afectados suelen presentar una correlación entre el genotipo, con la actividad *ARSA* asociada a éste, y el fenotipo de MLD. De manera que, los genotipos que contienen dos alelos 0 provocan una forma infantil tardía, los genotipos en los que se combinan los alelos nulo y R causan la forma juvenil temprana y los genotipos que contienen dos alelos R causan la forma adulta.

No obstante, no siempre existe una correlación exacta entre el genotipo y el fenotipo. Sí suele darse en los pacientes con dos alelos 0, que manifestarán la forma infantil tardía de MLD. Sin embargo, los individuos con uno o dos alelos R presentan una considerable variabilidad fenotípica, lo que sugiere la participación de otros factores genéticos y/o de factores ambientales.

Cabe destacar que el 10-15 % de la actividad enzimática *ARSA* ya es suficiente para la degradación de los sulfátidos y el mantenimiento de una vida normal. En consecuencia, la pseudodeficiencia de *ARSA*, causada por alelos con actividades superiores al 5%, no da lugar a la enfermedad, ya que la actividad residual es suficiente.

La efectividad de los tratamientos se reduce significativamente después de la aparición de los síntomas, por lo que un diagnóstico temprano es de vital importancia. El diagnóstico prenatal se suele realizar midiendo la actividad *ARSA* en las células del líquido amniótico o en muestras de vellosidades coriónicas. Además, se evalúa la acumulación de sulfátidos para excluir la pseudodeficiencia de *ARSA*. Otro método de diagnóstico es la determinación de

mutaciones genéticas, si bien deben tenerse en cuenta posibles discrepancias en la correlación entre fenotipo y genotipo para los individuos con alelos R.

A pesar de ello, debido a que se trata de una enfermedad rara, no está incluida dentro de las pruebas genéticas que se hacen a los fetos o a los recién nacidos, salvo en las familias portadoras de la mutación, en las que sí se realizan pruebas de diagnóstico precoz. Como resultado, comúnmente la MLD se diagnostica después del nacimiento, cuando aparecen los síntomas. Esto es particularmente complicado en el caso de las formas de MLD de inicio tardío, como la forma adulta, ya que suele confundirse con una esquizofrenia u otros trastornos mentales, lo que retrasa el comienzo del tratamiento correcto.

Una vez realizado el diagnóstico de MLD por las manifestaciones clínicas, se realizan una serie de pruebas: análisis genético para mutaciones de los genes *ARSA* y *PSAP*, resonancia magnética nuclear del cerebro, análisis por espectrometría de masas del nivel de sulfátidos en plasma y orina, pruebas bioquímicas de la actividad *ARSA* en fibroblastos cutáneos, leucocitos y orina del paciente, y evaluación del tamaño de los nervios periféricos mediante ultrasonido. Además, varias de estas pruebas también sirven para la evaluación de la efectividad del tratamiento.

Hasta la fecha, no hay ninguna terapia aprobada para la MLD. La principal dificultad en el tratamiento de las enfermedades que afectan al sistema nervioso surge de la escasa permeabilidad de la BBB (barrera hematoencefálica), que restringe el acceso de los compuestos terapéuticos durante la administración sistémica, dando como resultado que muchos enfoques terapéuticos presenten una baja efectividad.

Se han ensayados varios tratamientos para la MLD, entre los que destacan el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), el trasplante de células de la sangre del cordón umbilical (CBCT), la terapia de reemplazo enzimático (ERT) y la terapia génica con vectores virales.

En el HSCT, las células madre trasplantadas dan lugar a diferentes tipos celulares que migran al SNC y SNP donde secretan la enzima ARSA, que puede ser aprovechada por las células endógenas.

Los pacientes con las formas juvenil y adulta que recibieron HSCT antes o inmediatamente después del inicio de los síntomas presentaron una estabilización temporal de la enfermedad, con disminución de la tasa de pérdida de las funciones cognitivas y motoras, que dependen del SNC. Sin embargo, la estabilización de la gravedad de la enfermedad y la reducción de la desmielinización del SNC no estuvieron acompañadas con la estabilización de la enfermedad en los nervios periféricos, por lo que el HSCT no parece tener eficacia en la detención de la progresión de la neuropatía periférica.

Por tanto, el HSCT solo parece tener eficacia para reducir, que no eliminar, la progresión de la enfermedad en el SNC de los pacientes asintomáticos o con un diagnóstico temprano tras la aparición de los síntomas, afectados de las formas juvenil o adulta de la MLD. Estudios post mortem de los cerebros de pacientes trasplantados han mostrado la presencia de células gliales con actividad ARSA derivadas de las HSC del donante. Sin embargo, los oligodendrocitos y astrocitos del paciente no presentaron actividad de la enzima, posiblemente debido a una producción insuficiente de ARSA por parte de las células derivadas de las HSC trasplantadas.

Una alternativa similar al HSCT es el CBCT. El cordón umbilical es una fuente adicional de HSC, aunque también contiene tipos celulares adicionales, como células mesenquimales y células progenitoras endoteliales. El CBCT presenta las ventajas de que las células del cordón umbilical migran más eficazmente al SNC y, además, gracias al almacenamiento que hay de cordones umbilicales, la selección del donante adecuado es más rápida.

Sin embargo, se ha demostrado que la efectividad del CBCT no difiere significativamente de la del HSCT. Los pacientes con las formas infantiles tardías y juveniles de MLD que reciben CBCT antes del inicio de los síntomas conservan temporalmente una función cognitiva normal, pero sufren neuropatía periférica grave.

La terapia de reemplazo enzimático (ERT), que tiene como finalidad aumentar el nivel de la enzima ARSA en los tejidos afectados, fue una de las primeras estrategias utilizadas para el tratamiento de la MLD. La BBB constituye un serio obstáculo para el paso de la enzima desde el torrente sanguíneo al SNC cuando se realiza una administración intravenosa, ya que ARSA tiene un elevado peso molecular, por lo que se inyecta la enzima en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

A pesar de haberse obtenido resultados prometedores con ratones modelo de la MLD, los ensayos clínicos en humanos muestran resultados ambiguos en la función motora, o directamente no han mostrado una desaceleración en la pérdida de la función motora ni cambios en el nivel de sulfátidos en el LCR. Una de las desventajas de la utilización de la ERT es la reducida vida media de la enzima ARSA en el LCR, de solo 10 minutos.⁽¹⁾

La ausencia de tratamientos convencionales eficaces para la curación de la MLD es un estímulo para el desarrollo de estrategias innovadoras, como la terapia génica. Se han realizado ensayos para la introducción de la versión correcta del gen *ARSA*, con la finalidad de expresarlo en los pacientes, tanto mediante estrategias *in vivo*, empleando vectores basados en virus adenoasociados (AAV), como utilizando estrategias *ex vivo*, con vectores retrovirales.⁽²⁾ En este trabajo, se desarrollará esta última terapia basada en la modificación *ex vivo* de HSC y la reintroducción en los pacientes de las células modificadas mediante trasplante autólogo.

B. TERAPIA GÉNICA.

La terapia génica constituye un conjunto de técnicas biotecnológicas que buscan tratar la enfermedad mediante la transferencia o modificación de material genético. Como resultado, presenta el potencial para curar y dar tratamiento a enfermedades que no son curables o son intratables con tratamientos convencionales.

Existen dos estrategias efectivas para la entrega de genes en la terapia génica clínica. Se suelen emplear sistemas de vectores optimizados para la

entrega *in vivo* a células o tejidos diana posmitóticos, o la entrega *ex vivo* en células autólogas, seguida de transferencia de nuevo al paciente.

- Para la aplicación clínica de la terapia *in vivo* (Figura 2), se introduce de manera directa el vector con el gen terapéutico en el paciente, cerca o dentro del órgano diana. Esta estrategia ha tenido éxito en el tratamiento de enfermedades oculares, trastornos neurológicos y las hemofilias.
- Para la aplicación clínica de la terapia *ex vivo* (Figura 2), se realiza una extracción de células del propio paciente (autólogas) y se colocan en un cultivo, donde se les transfiere el material genético mediante un vector. A continuación, las células modificadas son transferidas al paciente. Esta estrategia ha tenido éxito en el tratamiento de trastornos metabólicos, inmunológicos y diferentes tipos de leucemias.⁽³⁾

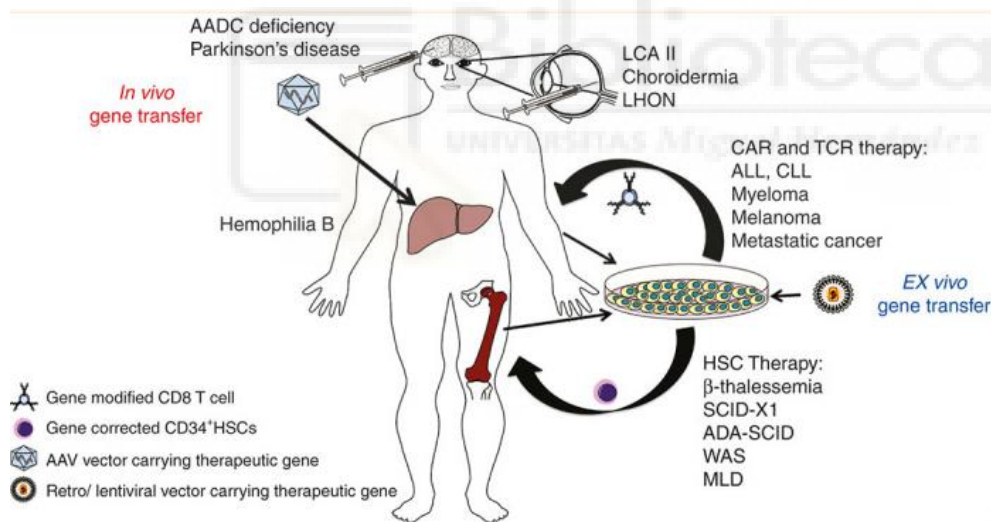


Figura 2: Traslación de genes *in vivo* y *ex vivo*.⁽³⁾.

Existen varias estrategias a la hora de abordar el tratamiento con terapia génica (Figura 3). Una de ellas es la terapia de aumento génico, que consiste en la introducción del gen terapéutico en el paciente para compensar un déficit de función en el gen (Figura 3A). Este es el caso de la terapia génica para la MLD.

Otras consisten en el silenciamiento de un gen cuya expresión causa la enfermedad o es un gen esencial de un patógeno (Figura 3A), la reparación de la mutación de un gen (Figura 3A) o la eliminación directa de las células enfermas, mediante la introducción en ellas de genes citotóxicos, o la eliminación

indirecta, potenciando la respuesta del sistema inmune contra éstas (Figura 3B).⁽⁴⁾

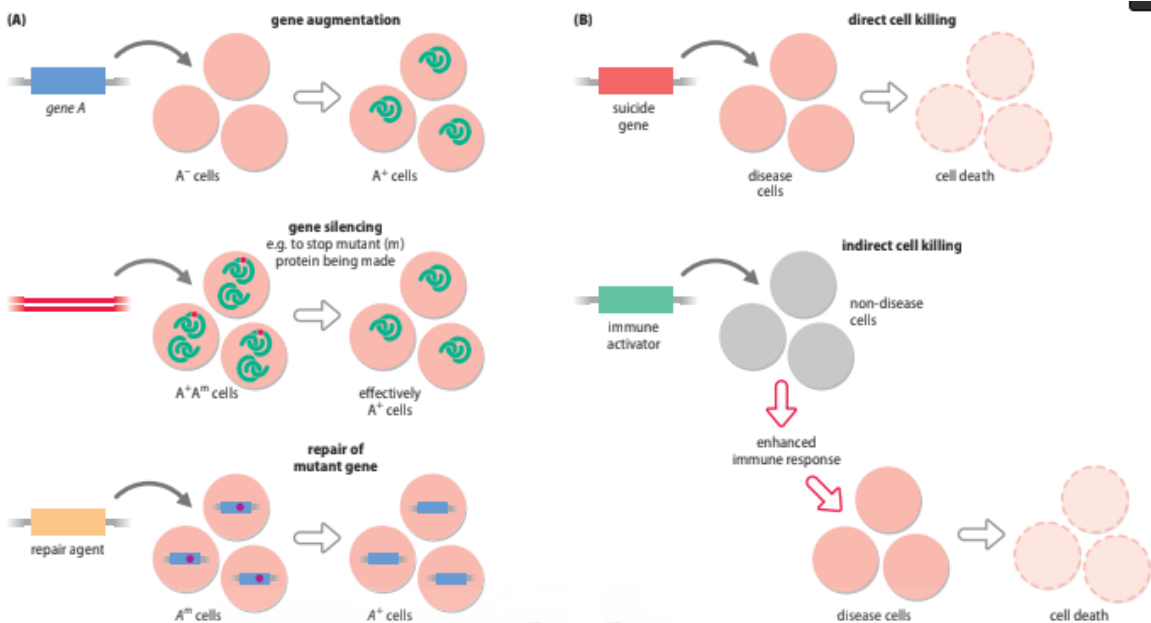


Figura 3. Tipos generales de estrategias al abordar tratamientos con terapia génica.⁽⁴⁾

En 1961, una década después del descubrimiento de que los fagos pueden transferir material genético de una bacteria a otra mediante el fenómeno conocido como transducción, Howard Temin descubrió la transferencia de genes mutados a células eucarióticas tras la infección con un retrovirus. El ADN transferido se insertaba en una posición cromosómica, pudiendo heredarse de forma estable. Además, descubrió que la información genética podía pasar de ARN a ADN, mediante el fenómeno conocido como transcripción inversa o retrotranscripción. Estos resultados pusieron en evidencia que los retrovirus podrían ser muy útiles para transferir genes terapéuticos a las células de interés.

En 1980, Martin Cline fue el primero en utilizar ADN recombinante en un ensayo de terapia génica. A pesar de haber obtenido éxito tan solo parcial en ratones y de no contar con la aprobación de su institución, UCLA, se propuso probar esta estrategia en enfermos de β -talasemia severa, una enfermedad que causa anemia grave y cuyo único tratamiento era la transfusión frecuente de sangre. Se trataron dos pacientes, uno en Israel y otro en Italia, mediante transfusión de células de la médula ósea con un clon recombinante que

contenía el gen de la β -globina, y la posterior reintroducción de las células modificadas en los enfermos mediante trasplante autólogo, sin que hubiera beneficio clínico. En consecuencia, Cline se vio obligado a renunciar a su cargo en la dirección de su departamento en UCLA y se le retiraron varios proyectos de investigación.

En 1988, se aprobó el primer protocolo clínico oficial para introducir un gen foráneo en humanos. SA Rosenberg y colaboradores extrajeron linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) de pacientes con melanoma metastásico, a los que les transfirieron un gen de resistencia a neomicina como marcador con ayuda de un vector retroviral y, a continuación, administraron los TIL modificados a los pacientes. Este ensayo demostró que la transferencia de genes en humanos con un vector retroviral era posible y se podía realizar con seguridad. Así mismo, pudieron determinar la viabilidad y la supervivencia de los TIL a largo plazo en la circulación sanguínea, los ganglios linfáticos y los tumores.

A partir de este resultado positivo, Rosenberg y colaboradores publicaron en 1993 un ensayo para determinar la eficacia de TIL modificados *ex vivo*, para expresar el gen del factor de necrosis tumoral, en el tratamiento de dos pacientes con melanoma avanzado. Aunque no consiguieron la curación de los enfermos, sí pudieron observar la presencia a largo plazo de los TIL modificados en los tumores, la no proliferación de los tumores en el sitio de la inyección y la ausencia de células tumorales tras la eliminación quirúrgica de los tumores tres semanas después de la inyección.

Entre los dos estudios anteriores, el mismo grupo de investigadores realizó el primer ensayo aprobado en el que se empleó un gen terapéutico. Trataron dos niñas con inmunodeficiencia combinada severa por deficiencia de adenosina desaminasa (ADA-SCID) con linfocitos T extraídos de su propia sangre, los cuales habían sido modificados *ex vivo* para expresar el gen que codifica la enzima. Las dos pacientes presentaron un incremento de los niveles de adenosina desaminasa en sangre, en lo que se puede considerar el primer éxito parcial de la terapia génica, ya que las dos niñas siguieron siendo tratadas con ERT mediante la administración de PEG-ADA.

La terapia génica experimentó un gran auge durante la década de los 90 hasta la muerte de Jesse Gelsinger, que puede considerarse el primer hecho adverso directamente atribuible a la terapia génica, ocurrida en un ensayo para el tratamiento de una deficiencia parcial de ornitina transcarbamilasa. Tuvo una fuerte respuesta inmunológica tras la administración de una dosis muy alta del vector adenoviral empleado, con fallo multiorgánico y posterior muerte a los cuatro días.

Poco después de la muerte de Jesse Gelsinger, se publicaron los que se pueden considerar los primeros éxitos completos de la terapia génica, con ensayos *ex vivo* utilizando vectores retrovirales para el tratamiento de dos inmunodeficiencias combinadas severas, la ligada al X (SCID-X1), en el año 2000, y la ADA-SCID, en 2002. Lamentablemente, en los ensayos para el tratamiento de la SCID-X1, se produjo el segundo hecho adverso atribuible a la terapia génica. De los 20 niños incluidos en los ensayos, 5 de ellos desarrollaron leucemia, con la muerte de uno de ellos. Este hecho alertó sobre los riesgos de la inserción del ADN exógeno en los genomas de los pacientes en los ensayos con vectores retrovirales.⁽⁵⁾

Para la realización de estas técnicas, se suelen emplear vectores, vehículos que facilitan la transferencia del ácido nucleico terapéutico a las células diana. Los vectores pueden ser de tipo no viral, como los liposomas. Otros están basados en virus, siendo los vectores virales más prometedores los basados en adenovirus, virus adenoasociados (AAV) y retrovirus.

Los vectores AAV son los que han demostrado mayor éxito clínico para la administración de genes *in vivo*, aunque presentan limitaciones por el tamaño reducido de los transgenes que pueden albergar, algo más de 4,5 kb. Los AAV son virus de la familia Parvoviridae, que requieren la contribución de un adenovirus o un herpesvirus para poder replicarse. No son patogénicos, por lo que provocan una respuesta moderada del sistema inmune.

Los vectores AAV no dan lugar a integración en el genoma hospedador, de manera que el ADN transferido se estabiliza como una unidad extracromosómica o episoma, lo que disminuye los riesgos relacionados con la

inserción del transgén y pone límites a la expresión a largo plazo en las células posmitóticas. ^{(6) (7)}

Los vectores retrovirales son los más utilizados en estrategias *ex vivo*. Realizan su acción terapéutica tras la transcripción inversa del ARN empaquetado en la cápside viral y la integración del ADN terapéutico en el genoma de las células diana.

Los vectores gammaretrovirales fueron desarrollados en la década de 1980 y principios de 1990. Solo sirven para la transferencia de genes a células en división. Esto se debe a que, una vez ha tenido lugar la retrotranscripción, el ADN generado no puede atravesar la membrana nuclear, por lo que solo pueden actuar durante la división celular, ya que la membrana nuclear desaparece durante la mitosis. Posteriormente, se diseñaron vectores basados en lentivirus, otro género perteneciente a la familia Retroviridae. A diferencia de los vectores gammaretrovirales, los lentivirales permiten la transferencia de genes también a células que no se dividen, por lo que pueden transferir ADN a una mayor variedad de tipos celulares.

Los vectores lentivirales integran su ADN de manera preferente en las regiones codificantes de genes que se transcriben activamente, a diferencia de los gammaretrovirales, que lo integran en la región 5' no traducida de los genes, promotores y regiones reguladoras, lo que aumenta el riesgo de activación oncogénica por mutagénesis insercional en las células hematopoyéticas.⁽⁶⁾

Los retrovirus se han mostrado particularmente útiles en los ensayos para enfermedades como la SCID-X1 y la ADA-SCID, en los que se empleó trasplante autólogo en la médula ósea de las células modificadas. Como resultado, se han abierto nuevas vías de tratamiento para pacientes, evitando la necesidad de donantes compatibles, la supresión inmunológica y la complicación de la enfermedad de injerto contra huésped. Se ha seguido una estrategia similar para tratar la MLD, mediante trasplante autólogo de la médula ósea con células modificadas genéticamente para expresar el gen *ARSA*.

5. OBJETIVOS.

Los objetivos de esta revisión bibliográfica son determinar la eficacia y la seguridad de la terapia génica utilizada en el tratamiento de la leucodistrofia metacromática.

Considero que es una determinación importante, pues los tratamientos convencionales no consiguen ni curar la enfermedad ni reducir o detener completamente su sintomatología, porque o no tienen eficacia o si la tienen es temporal y solo sobre la neuropatía del SNC, no sobre la neuropatía periférica.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para la realización de esta revisión bibliográfica se ha realizado una búsqueda en la base de datos Medline a través de Pubmed. Para ello se han buscado los descriptores de la población leucodistrofia metacromática, y de la intervención terapia génica, en los Descriptores de Ciencias de la Salud (DeCS), obteniendo como resultado:

- DeCS: Leucodistrofia Metacromática; Terapia Génica
- MeSH: Metachromatic leukodystrophy; Gene Therapy

Por otro lado, en Medline se buscó tanto información por separado de la leucodistrofia metacromática y de la terapia génica, como de manera conjunta, obteniendo los siguientes resultados:

- Metachromatic leukodystrophy: ("leukodystrophy, metachromatic"[MeSH Terms] OR ("leukodystrophy"[All Fields] AND "metachromatic"[All Fields]) OR "metachromatic leukodystrophy"[All Fields] OR ("metachromatic"[All Fields] AND "leukodystrophy"[All Fields])) AND ((y_5[Filter]) AND (review[Filter]))
 - Artículos: 40.
- Gene Therapy: ("genetic therapy"[MeSH Terms] OR ("genetic"[All Fields] AND "therapy"[All Fields]) OR "genetic therapy"[All Fields])

OR ("gene"[All Fields] AND "therapy"[All Fields]) OR "gene therapy"[All Fields] AND ((y_5[Filter]) AND (review[Filter]))

- Artículos: 31507.
- Metachromatic leukodystrophy y Gene Therapy: "metachromatic leukodystrophy"[All Fields] AND "gene therapy"[All Fields]
 - Artículos: 110

Para realizar dicha búsqueda se añadieron los filtros:

- Últimos cinco años, marcando fecha de publicación el filtro de “5 years”.
- Revisiones, se filtran revisiones como tipo de artículo, con el filtro de “Review”.

Para la selección de los artículos se emplearon una serie de criterios de inclusión y exclusión, de manera que:

Se tuvo en cuenta que fuera terapia génica exclusiva de la leucodistrofia metacromática, se incluyó las que incluían terapias génicas con trasplante de médula ósea y vectores lentivirales exitosas. Por otro lado, se incluyeron los que trataban del trasplante de células madre hematopoyéticas con el gen *ARSA* corregido en médula ósea, ya que hay ensayos exitosos en humanos.

También se incluyó la forma infantil tardía y la juvenil tardía, ya que éstas son las formas más graves, con lo que se eliminaron aquellos artículos que trataran la adulta. Por otro lado, se excluyeron los ensayos en animales, y se centraron en humanos. Además, se excluyó aquellos que empleaban los vectores AAV.

Por otra parte, para obtener información de la terapia génica, se seleccionaron 4 artículos, los cuales presentaron información sobre la historia, progreso de la terapia genética, y los vectores lentivirales y AAV, ya que son los empleados en la terapia genética de la leucodistrofia metacromática.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Ensayos previos en modelos de ratón con MLD han demostrado la prevención y corrección de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, tras un trasplante autólogo de HSC (HSCT autólogo) modificadas con vectores lentivirales para sobreexpresar el cDNA del gen *ARSA*. La estrategia implicó la producción de varias inserciones por genoma en las células transducidas, lo que dio lugar a una expresión extensa y suprafisiológica del gen en toda la progenie de las HSC, incluidas las células mielogénicas que migran al sistema nervioso (microglía y macrófagos), lo que a su vez produjo la corrección cruzada de células residentes en los SNC y SNP.

La implantación de esta estrategia en humanos presentaba numerosos desafíos. Entre otros aspectos, no estaba claro si los lentivirus podían transducir HSC humanas con la eficacia requerida. Además, la seguridad de los vectores es un tema muy importante, pues con otros vectores retrovirales, como los gammaretrovirales, que también integran genes en las HSC, se mostró el potencial de desencadenar leucemia, mediante mutagénesis de inserción. Aunque varios estudios demostraron que los lentivirus reducen el riesgo de inserción genotóxica, por su avanzado diseño y selección del sitio de integración, existía la posibilidad de que al aumentar la carga de la integración total se perdiera dicha ventaja de bioseguridad.

Como resultado, se optimizaron los vectores lentivirales para la transferencia de genes en HSC humanas y se diseñó un ensayo clínico en fase I/II de pacientes con MLD infantil tardía o juvenil temprana, los cuales fueron tratados con HSCT autólogo (ensayo clínico NCT01560182). El tratamiento consistió en el aislamiento de HSC de los propios pacientes, su transducción *ex vivo* con un vector lentiviral portador del cDNA del gen *ARSA* y el trasplante de las células transducidas en la médula ósea de los pacientes.

Los pacientes recibieron pretratamiento mieloablativo con 14 dosis de busulfán, desde cuatro días antes de la terapia hasta 24 horas antes de la infusión de las células transducidas. Este régimen de acondicionamiento fue bien tolerado.

A. TRES PRIMEROS PACIENTES.

El ensayo clínico se inició con tres pacientes, a los cuales se les hizo un seguimiento de 24 meses al MLD01 y de 18 meses a los pacientes MLD02 y MLD03.

No se incluyeron agentes inmunosupresores, ya que, los pacientes expresaban residuos de proteína ARSA no funcional, por lo que era poco probable que se desencadenara una respuesta inmune contra la enzima.

Los tres pacientes presentaban formas presintomáticas de MLD, en base a la falta de signos clínicos evidentes de la enfermedad, con independencia de la presencia de anomalías en pruebas instrumentales (electroneurografía y/o resonancia magnética nuclear del cerebro).

Todos mostraron deficiencia de ARSA y mutaciones asociadas con la MLD infantil tardía. Además, tenían hermanos mayores con diagnóstico de MLD infantil tardía dentro de los dos años de edad. Como resultado, se les empezó a tratar entre 2 y 12 meses antes de la edad de aparición de los síntomas en los hermanos.

a. Eficacia.

La transducción de las células HSC (CD34⁺) se optimizó para obtener 2 o más copias del vector con el transgén por genoma (VCN), ya que éste es el número de inserciones observado en los estudios preclínicos con ratones MLD que conferían la sobreexpresión del gen *ARSA* requerida para la eficacia terapéutica.

Tras un mes del trasplante, se observó un injerto estable de alto nivel de células transducidas en la médula ósea y en la sangre periférica de todos los pacientes. Entre el 45 y el 80% de las colonias obtenidas a partir de células de la médula ósea de los pacientes presentaron inserciones del vector lentiviral transgénico (Figura 4A). La media de inserciones en las células HSC de la médula ósea estuvo en un rango entre 0,9 y 1,9 VCN (Figura 4B). Por tanto, teniendo en cuenta este último dato y los porcentajes de células de la médula

ósea con inserciones (45% - 80%), estos valores implicaron un VCN de 2 a 4 en las células transducidas.

Los tipos celulares derivados de las HSC presentaron un VCN elevado y estable. Esto se observó en los granulocitos (CD15⁺) y los monocitos (CD14⁺) del paciente MLD01, así como en el conjunto de sus células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos B (CD19⁺), linfocitos T (CD3⁺) y células natural Killer (CD56⁺) (Figura 4C), y en las células mononucleares de sangre periférica de los tres pacientes (Figura 4D).⁽⁸⁾

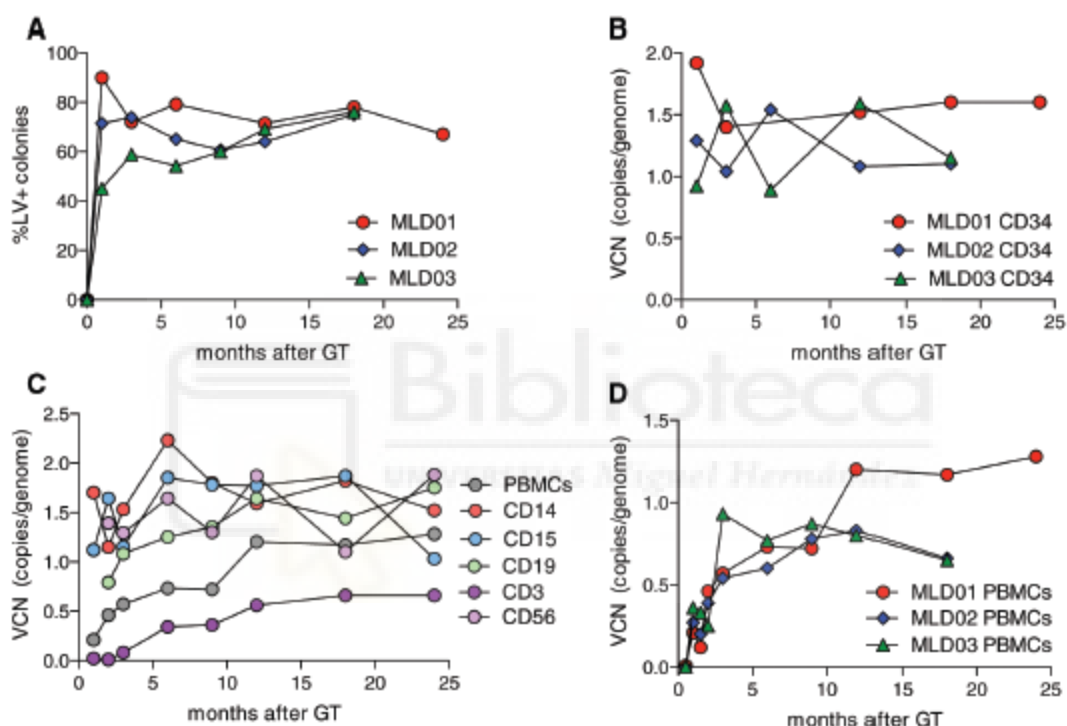


Figura 4: Marcaje genético en los pacientes tras recibir HSCT autólogo con las células transducidas. A) Evaluación del injerto de las células transducidas, expresado como porcentaje de colonias positivas para lentivirus (LV+) sobre el total de colonias analizadas frente a los meses después de la transducción. B-D) Evaluación del VCN expresado como LV/genoma humano en las células derivadas de la médula ósea y sangre periférica frente a los meses tras la transducción.

Como consecuencia del alto marcaje genético, se reconstituyó la actividad de la ARSA hasta valores por encima de los normales en poblaciones de células mieloides, como los granulocitos (CD15⁺) (Figura 5A) y los monocitos (CD14⁺) (Figura 5B). Además, las enzimas aisladas de las células de los pacientes fueron capaces de hidrolizar los sulfátidos, confirmando así su completa funcionalidad.

Los monocitos dan lugar a microglías que migran al SNC y a macrófagos que migran al SNP, secretando la enzima que puede ser aprovechada por las células residentes endógenas. En consecuencia, también se aisló ARSA funcional en el LCR de los tres pacientes un año después del trasplante (dos años en el caso del paciente MLD01), con niveles y actividades comparables a las de muestras obtenidas de individuos sanos (HDs), mientras que no se pudo aislar enzima ARSA antes del tratamiento (Figuras 5C y 5D). Estos resultados demuestran la expresión estable y por encima de lo normal de ARSA en todos los linajes hematopoyéticos, y la entrega eficiente y biodisponible de la enzima en el SNC después del HSCT autólogo con las células transducidas. ^{(8) (9)}

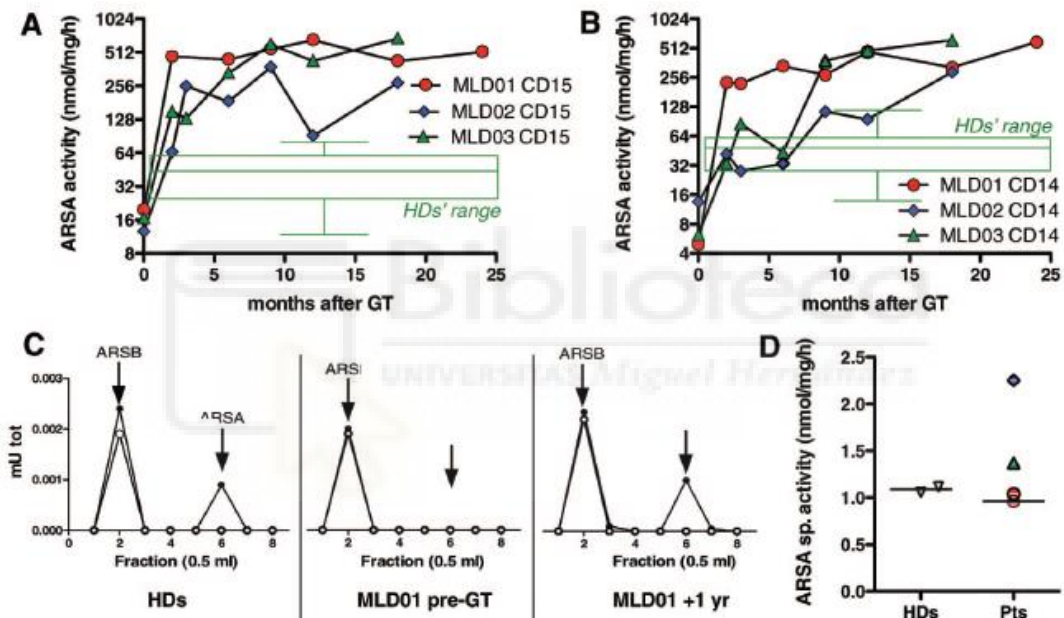


Figura 5. Expresión de la ARSA en pacientes tras recibir HSCT autólogo con las células transducidas. La actividad ARSA se midió en mU (cantidad de enzima requerida para convertir 1 nanomol de sustrato hidrolizado, en 1 min a 37°C, nmol/ml/h). A-B) Evaluación de la actividad ARSA en células de la sangre periférica frente a los meses tras la transducción, y frente al rango de actividad de pacientes sanos (HDs). C) Representación de la cromatografía DEAEcelulosa de las enzimas ARSB y ARSA en fracciones del LCR, en pacientes sanos y en los pacientes con MLD antes y 1 año después de la transducción. D) Actividad específica ARSA frente al sustrato 4-methyl-umbelliperyl-sulphate (MUS) en el LCR de pacientes sanos (HDs) y pacientes con MLD tratados (Pts).

Para la evaluación de las manifestaciones clínicas, se comparó las de los pacientes con las de los hermanos con MLD infantil tardía no tratados (LI). Los dos hermanos mayores del paciente MLD01 presentaron regresión del

rendimiento psicomotor, y detención de adquisición de nuevas habilidades motoras y cognitivas a los 18 meses de edad. Además, mostraron una rápida progresión de la enfermedad después del inicio, hasta alcanzar el nivel 6 de la motricidad gruesa en la escala de funciones para MLD (GMF-CMLD) a los 30 meses, al estar en sillas de ruedas y ser incapaces de sostener su cabeza y tronco. En cambio, a los 39 meses de edad, MLD01 presentaba un nivel 2 de GMF-CMLD, al ser capaz de ponerse de pie de forma independiente, caminar y correr con una sola ayuda (la mano de otro individuo o un andador), y la medida de la función motora gruesa (puntuación GMFM) aumentó progresivamente a un valor de 193, mucho más elevado que los registros de los hermanos afectados (LI), lo que sugiere un desarrollo motor continuo (Figura 6A).

Se realizó una evaluación cognitiva de MLD01 mediante la escala Bayley de desarrollo de bebés y niños pequeños, observándose un nivel normal de coeficiente intelectual para la edad cronológica del paciente, con un lenguaje normal y unas habilidades cognitivas adecuadas en todos los tiempos probados, incluido el de los 39 meses, en el que los hermanos no eran capaces de realizar cualquier acto voluntario de habla. Además, la neuropatía periférica preexistente de MLD01, medida con el índice de velocidad de conducción nerviosa (índice NCV), mejoró después del tratamiento (Figura 6B).

La resonancia magnética nuclear del cerebro de MLD01 mostró una ligera falta de homogeneidad de la señal, presente desde la evaluación inicial y estable a partir de entonces, y una pequeña área de hiperintensidad en el cuerpo caloso que apareció a los 12 meses de seguimiento y se mantuvo estable a partir de entonces. Todos estos hallazgos fueron normales para la edad del paciente. Por el contrario, los hermanos (UT LI MLD) no tratados desarrollaron desmielinización extensa y severa asociada con atrofia difusa de los 24 a 36 meses de edad. (Figura 6C)

Los pacientes MLD02 y MLD03 permanecieron totalmente asintomáticos, con normalidad motora y cognitiva para su edad. Sin embargo, el tiempo de seguimiento después del momento previsto de inicio de los síntomas fue más breve que en el caso de MLD01. Los tiempos de seguimientos fueron de 7 meses

para MLD02 y 10 meses para MLD03 más allá del tiempo previsto de inicio de los síntomas, y en ambos con un seguimiento de 18 meses después del inicio del tratamiento.

MLD02 y MLD03 tuvieron un GMF-CMLD de 0 en la última evaluación, que contrastó mucho con la evaluación de sus respectivos hermanos afectados, a la misma edad. Además, en ambos, después del tratamiento, su puntuación GMFM aumentó progresivamente con la adquisición normal de los hitos motores para la edad (Figura 6A). Los dos pacientes presentaron una puntuación de coeficiente intelectual normal en la escala de Bayley de desarrollo de bebés y niños pequeños.

Por otro lado, el paciente MLD02 mostró velocidades dentro del rango normal (n.r.) de conducción motora y sensorial, mientras que MLD03 mostró una leve neuropatía desmielinizante (Figura 6B). Ambos pacientes presentaron una resonancia magnética cerebral con una progresión normal de la señal de la sustancia blanca, debido a la mielinización en el último seguimiento.⁽⁸⁾

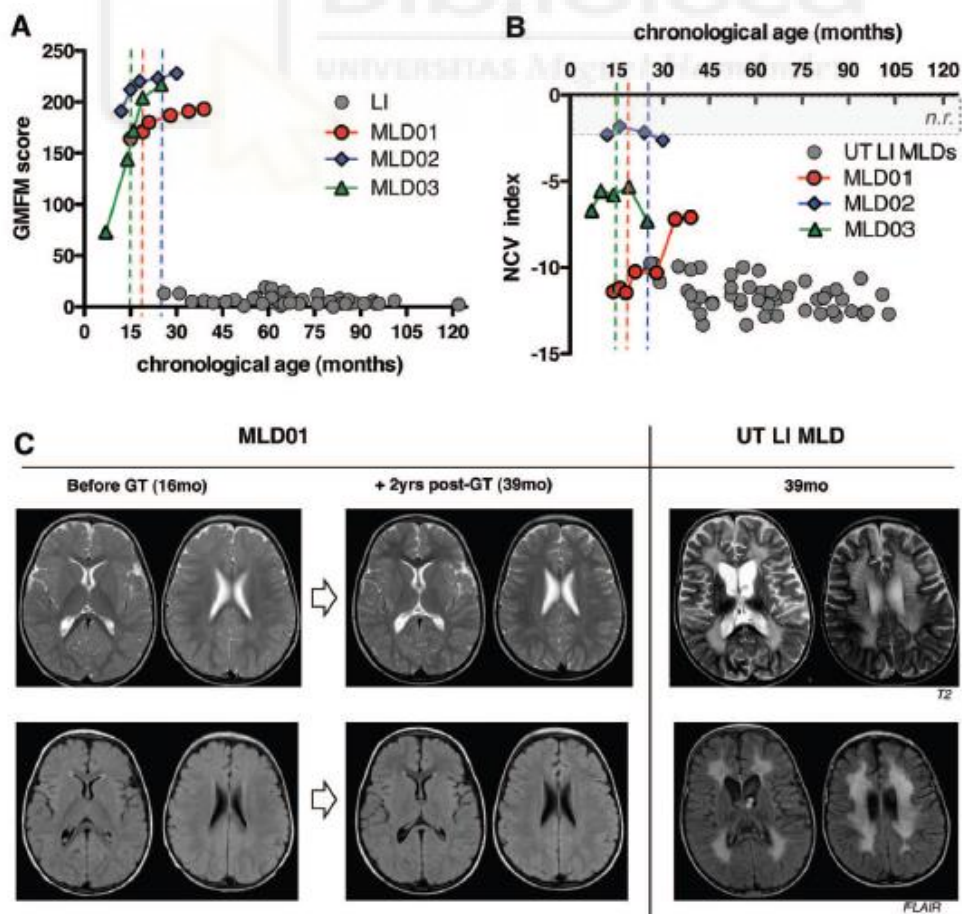


Figura 6. Seguimiento clínico de los pacientes tras recibir HSCT autólogo con las células transducidas. A-B) Puntuación GMFM (A) e índice NCV (B) de los pacientes MLD tratados y los pacientes no tratados (LI). Las líneas punteadas indican la edad esperada de inicio de la enfermedad en relación con la aparición de síntomas en los hermanos no tratados. C) Imágenes de resonancia magnética nuclear del paciente MLD01 antes del tratamiento y dos años después, y de un paciente no tratado (LI MLD) a la misma edad que MLD01.⁽⁸⁾

b. Seguridad.

El tratamiento provocó neutropenia grave (recuento absoluto de neutrófilos < 500/ml), desde el día +9 hasta el día +45 después del trasplante. Los pacientes requirieron soporte transfusional hasta el día +45 para el tratamiento de la trombocitopenia y la anemia. A partir de entonces, recuperaron rápidamente los parámetros hematológicos normales.

Se produjeron dos eventos adversos graves por infecciones relacionadas con la utilización de catéter venoso central, que rápidamente se resolvieron mediante tratamiento con antibiótico. En ningún momento se detectó replicación de lentivirus, anticuerpos contra la proteína lentiviral Gag p24 o anticuerpos contra la enzima ARSA en la sangre periférica de los pacientes.

Para determinar si hubo algún incidente con la seguridad del vector lentiviral en los pacientes, se monitoreó la dinámica clonal de repoblación hematopoyética a nivel molecular, mediante el análisis de la integración genómica del vector en las células hematopoyéticas reconstituidas de los pacientes. Debido a la casi aleatoria integración de los lentivirus, cada inserción representa un marcador genético, que permite rastrear el comportamiento clonal de las células individuales transducidas.

Para el estudio, se obtuvo ADN genómico de células de la médula ósea (CD34⁺) y de los tipos celulares derivados de éstas (subconjuntos mieloides, linfocitos B y linfocitos T) en los meses 1, 3, 6, 9 y 12 después del trasplante para los tres pacientes, y en el mes 18 para MLD01 y MLD02.

Los sitios de integración (IS) se mapearon para los tres pacientes en los diferentes tipos celulares, observándose coincidencia con las preferencias publicadas previamente de integración lentiviral dentro de las unidades transcripcionales, y se midió la abundancia relativa de cada clon celular con una inserción concreta. Casi todos los clones celulares marcados por un IS específico representaron sólo una fracción del total de clones en un momento dado. Así, como resultado del estudio, se observó que unos pocos clones celulares marcados con un IS mostraron una abundancia más elevada en un punto de tiempo determinado, pero desaparecieron o se redujeron significativamente en puntos de tiempo posteriores (Figura 7). A partir de estos resultados, se pudo concluir que no ocurrieron eventos de dominancia clonal en estos pacientes, lo que descarta la posible aparición de leucemia.⁽⁸⁾

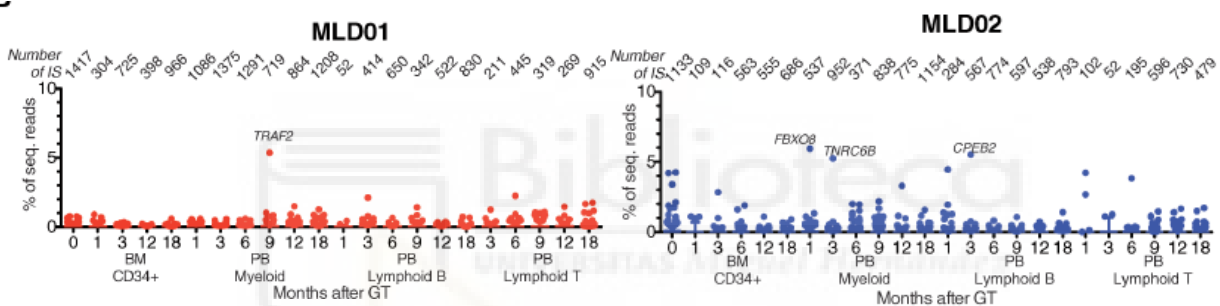


Figura 7. Diagrama del porcentaje de lecturas (eje de ordenadas) de las secuencias para las IS mapeadas de los pacientes MLD01 y MLD02 en células CD34+ (HSC), mieloides y linfoides derivadas de la médula ósea (BM) y de la sangre periférica (PB), frente a los meses transcurridos tras el trasplante (eje de abcisas). En la parte de arriba, se muestra el número total de IS para cada linaje y punto temporal. Se indican los genes portadores de las IS más representadas.⁽⁸⁾

B. AMPLIACIÓN A NUEVE PACIENTES.

Se amplió el estudio del ensayo a nueve pacientes, de los cuales siete fueron clasificados como presintomáticos, por la ausencia de manifestaciones de la enfermedad, y dos presentaron manifestaciones leves. Seis fueron clasificados como MLD infantil tardía, otros dos, MLD04 y MLD08, como MLD juvenil temprana, y otro, MLD09, no se pudo determinar sin ambigüedad si padecía MLD infantil tardía o juvenil temprana.

Los pacientes MLD04 y MLD08 mostraron progresión de la enfermedad en las fases anterior y posterior al tratamiento. En concreto, MLD04 presentó

grave desmielinización y disfunción motora y cognitiva en la inscripción, y tuvo una rápida progresión de la enfermedad entre la inscripción y el tratamiento, así como durante la fase inicial posterior al trasplante. Además, los pacientes MLD01 y MLD07 presentaron manifestaciones clínicas sutiles.

Los pacientes afectados de MLD infantil tardía fueron tratados con HSCT autólogo con las células transducidas cuando tenían una media de edad de 15'5 meses (rango 7-18), con una media de aparición de enfermedad prevista, establecida a partir de la aparición de síntomas en sus hermanos mayores afectados, de 19 meses de edad (rango 15-27). Algunos de estos pacientes recibieron el tratamiento con una edad muy cercana al inicio previsto de los síntomas. Entre los pacientes no afectados de MLD infantil tardía, MLD09 recibió el tratamiento 5 meses antes del tiempo previsto para el inicio de los síntomas, y MLD04 y MLD08 lo recibieron 6 meses antes. La duración media del seguimiento tras el tratamiento fue 36 meses (rango 18-54). En el momento de realización de los análisis, todos los niños seguían con vida.

a. Eficacia.

Los pacientes recibieron una dosis media de células HSC (CD34⁺) transducidas de $7,2 \times 10^6$ células por kg (rango 4,2-18,2), con un VCN medio de 2,5 (rango 1,7-4,4) por genoma y una eficacia de transducción del 92,8% (68-97). Tras el trasplante, se observó un injerto estable de las HSC corregidas en los pacientes, con aumento progresivo del VCN en las células mononucleares de sangre periférica (Figura 8A).

La eficacia de injerto de las células transducidas, obtenido a partir de la proporción de colonias derivadas de la médula ósea que son positivas para el vector con el transgén, tuvo una media de 60,4% (rango 14,0-95,6) en los pacientes. Este nivel de injerto se mantuvo estable durante todo el seguimiento (Figura 8B).

Se observó una reconstitución progresiva de la actividad ARSA a valores normales o por encima de ellos en las células hematopoyéticas circulantes (Figura 8C y 8D). Además, se determinó que la actividad ARSA en las células hematopoyéticas estuvo influida de modo positivo por las células transducidas del injerto (Figura 8D). De manera significativa, se observó una restauración de la actividad ARSA en el LCR a los 6 meses del trasplante, alcanzando valores normales o por encima de éstos en los últimos puntos de recogida en algunos de los pacientes (Figura 8E). No se observó una correlación significativa entre la actividad ARSA en el LCR y el injerto de células transducidas (Figura 8F).

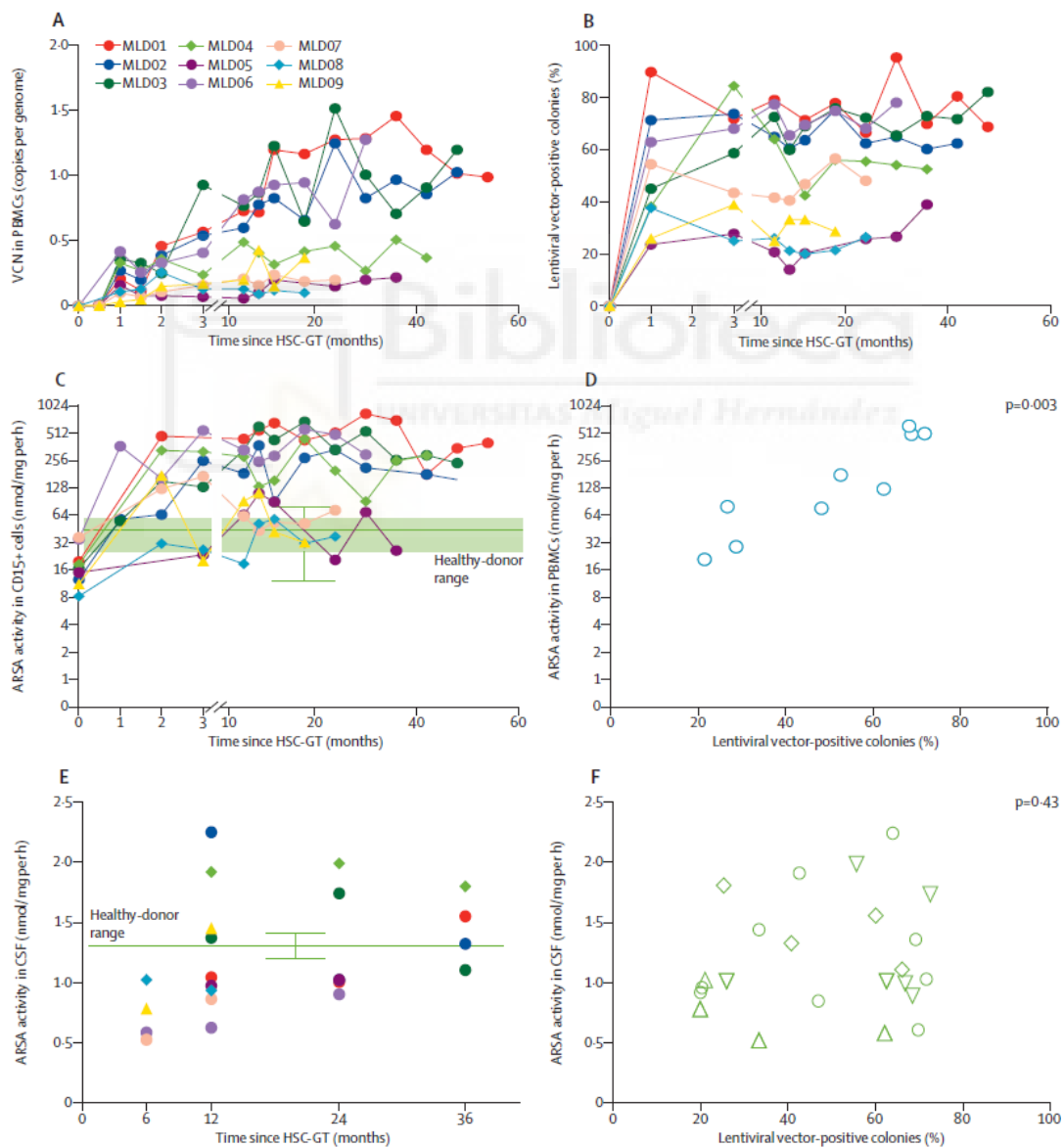


Figura 8: Características moleculares y bioquímicas. En C y E, la caja y la línea horizontal verde representan el rango de actividad en donantes sanos. A) VCN por genoma diploide en las células

mononucleares de la sangre periférica (PBMC) frente a los meses tras la transducción. B) Porcentaje de la presencia del vector lentiviral (injerto) en los clones de la médula ósea frente a los meses tras la transducción. C) Actividad ARSA en las células CD15⁺ (granulocitos) de la sangre periférica. D) Correlación positiva entre el injerto celular transducido y la actividad de la enzima en las PBMC en el último seguimiento. E) Actividad específica ARSA frente al sustrato 4-methyl-umbelliperyl-sulphate en el LCR frente a los meses tras el tratamiento. F) Comparación de la actividad ARSA en el LCR frente al injerto de las células transducidas en diferentes meses tras el tratamiento.

La comparación entre las biopsias de piel antes del trasplante y tras dos años después de la terapia, mostraron una marcada disminución de sulfátidos en el citoplasma de las células de Schwann de los pacientes en los que se pudieron recoger registros en ese rango temporal (MLD01-MLD07) (Figura 9), a excepción de MLD07, que también presentó empeoramiento del índice NCV y de la desmielinización. Como resultado, estos datos proporcionan evidencia indirecta de la entrega de enzimas funcionales a las células residentes del SNP.

Antes del tratamiento, las muestras de las biopsias de piel de los pacientes mostraron una severa neuropatía desmielinizante, incluso en los pacientes presintomáticos con MLD infantil tardía (Figura 9). A destacar, dos años después del trasplante, la mayoría de las muestras de las biopsias (5 de 7), mostraron ausencia de fibras desmielinizadas, observándose fibras rodeadas por mielina normal (Figura 9). Esto sugiere que hay remielinización, al menos en algunos de los pacientes. La mayor mielinización se dio en los pacientes con mayor injerto de células transducidas, como MLD01 y MLD02.

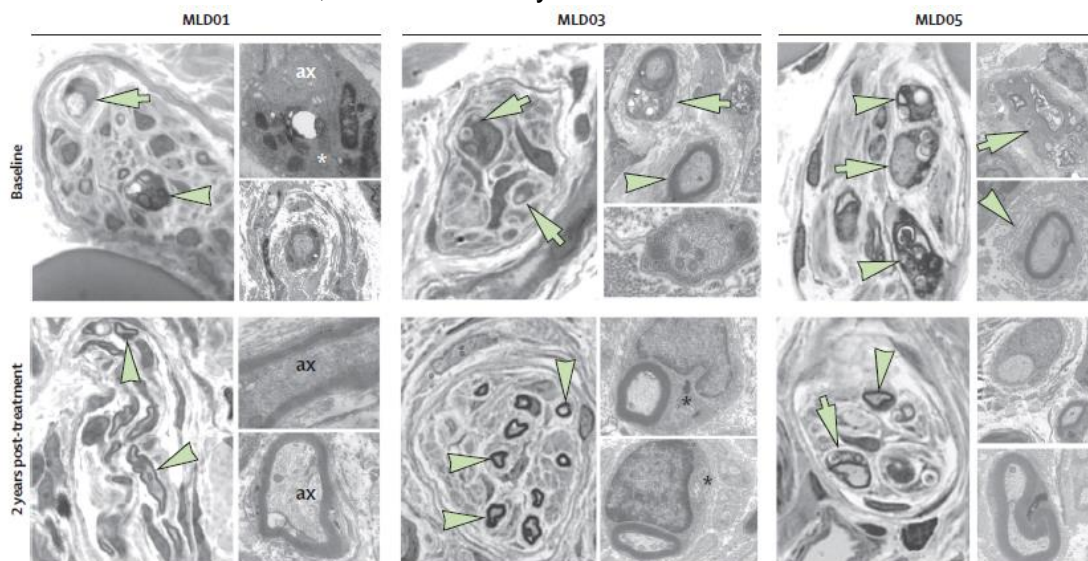
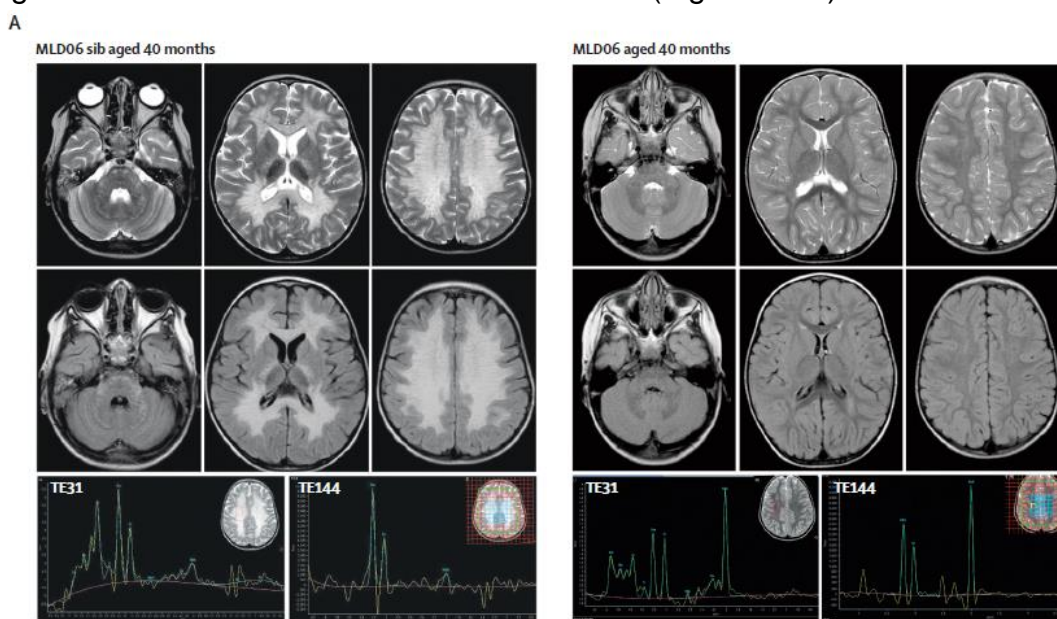


Figura 9: Efecto del tratamiento sobre las fibras nerviosas dérmicas del SNP. Las imágenes superiores son pretratamiento. En ellas, se muestran secciones con pérdida de fibras nerviosas mielinizadas, señalado mediante flechas; abundante material de almacenamiento, señalado mediante la punta de la flecha en MLD01, y material de almacenamiento dentro del citoplasma de las células de Schwann, señalado mediante asteriscos en MLD1 y flechas en MLD3 y MLD5. Las imágenes inferiores son tras 2 años después del trasplante. En ellas, se muestran secciones de fibras nerviosas mielinizadas normales longitudinales y transversales con lámina basal, señaladas mediante flechas, y fibras nerviosas normales sin material de almacenamiento en el citoplasma de células de Schwann, indicadas mediante asteriscos en MLD03. ax: axón.

Con el tratamiento, el índice NCV incrementó en tres de los pacientes (MLD01, MLD04 y MLD09), permaneció estable en cuatro de ellos (MLD02, MLD03, MLD06 y MLD08) y disminuyó en dos (MLD05 y MLD07). En todo caso, la mayoría de los pacientes con MLD infantiles tardías presentaron un índice NCV más alto que el de sus hermanos mayores afectados y el de pacientes no tratados (LI). Además, se observó que la meseta alcanzada por el índice NCV estuvo afectada positivamente por el injerto de células transducidas.

Se realizaron resonancias magnéticas nucleares de los cerebros de los pacientes trasplantados, en las que no se observó la desmielinización masiva y la atrofia severa característica de los LI. (Figura 10A). Además, la intensidad y extensión de la alteración en la sustancia blanca, que mostraron algunos pacientes en la resonancia magnética, disminuyó durante el seguimiento, lo que sugiere una remielinización también en el SNC (Figura 10 B).



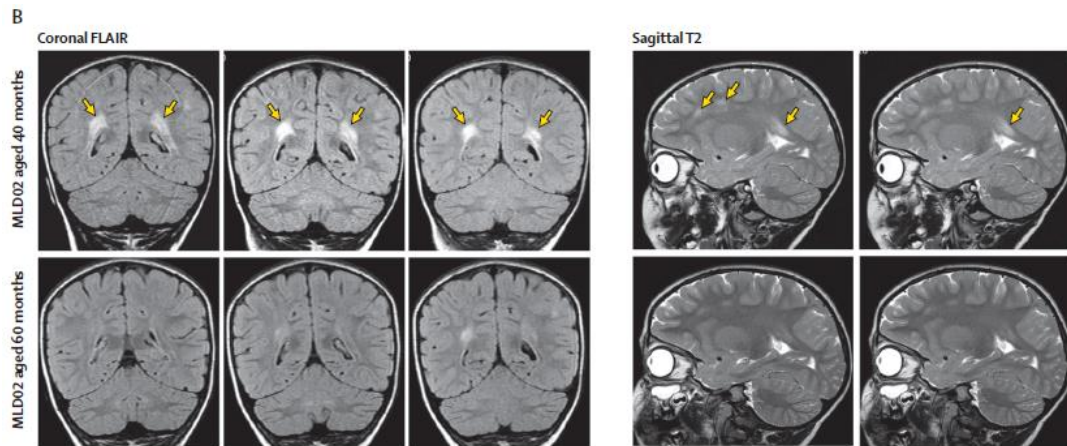


Figura 10: Efectos del tratamiento en el SNC. A) Comparación de las resonancias magnéticas del hermano no tratado de MLD06 y MLD06 tratado con las mismas edades. B) Comparación de resonancia magnética coronal y sagital del paciente MLD02 después de 2,5 años (40 meses) de la transducción, y tras 4 años (60 meses). Las flechas señalan las anomalías de la señal, que se han visto reducidas en tamaño e hiperintensidad con el paso del tiempo.

Por otra parte, al estudiar las puntuaciones GMFM se observó que la motricidad gruesa, para la mayoría de los pacientes, fue similar a la de un niño sano hasta el último seguimiento. Con la excepción de MLD04, que sufría un deterioro motor y cognitivo consistente con su MLD juvenil temprana no tratada a tiempo. Todos los demás pacientes tratados mostraron un aumento progresivo de las puntuaciones GMFM, de acuerdo con la adquisición de nuevas habilidades motoras. Como resultado, se observó una diferencia significativa con los niños no tratados a las mismas edades, pues éstos presentaron graves discapacidades motoras, siendo incapaces de realizar movimientos voluntarios y permaneciendo postrados en una cama (Figura 11).

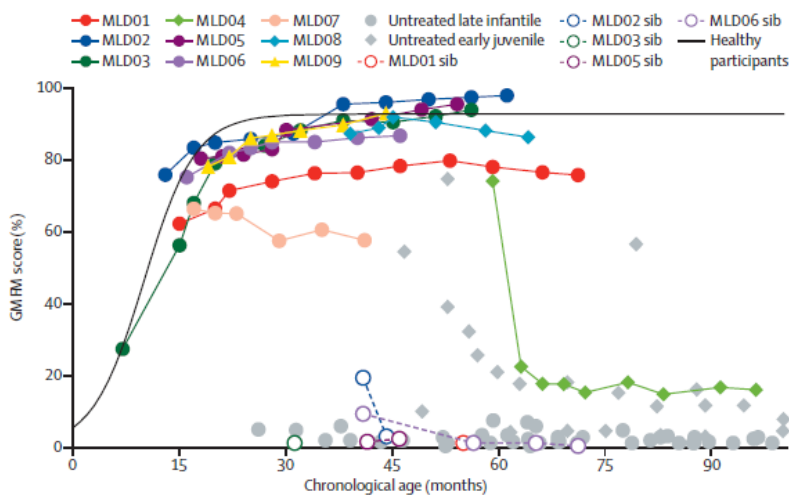


Figura 11: Efectos del tratamiento en la puntuación GMFM con el tiempo. Relaciona el porcentaje de la puntuación de GMFM con la edad cronológica en meses. La línea negra representa la curva estimada a partir de pacientes sanos. Los símbolos grises representan los pacientes no tratados.

Además, con la excepción de MLD04, los pacientes trasplantados presentaron un coeficiente intelectual dentro del rango normal para la edad, a diferencia de los pacientes no tratados, cuyos coeficientes intelectuales cayeron por debajo de 40. Es importante destacar que, en el último seguimiento disponible, varios de los pacientes tratados superaron la edad en la que fallecieron sus hermanos mayores no tratados.⁽¹⁰⁾

b. Seguridad.

Todos los pacientes presentaron una buena recuperación hematológica después del trasplante. Los eventos adversos más frecuentes fueron la citopenia, presente en todos los pacientes, y la mucositis con diferentes grados de severidad entre los pacientes, siendo de grado 3 en cinco pacientes, y de grado 5 en cuatro, según los Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos.

La neutropenia severa tuvo una duración media de 24 días. Además, no hubo variaciones importantes de los valores normales en el recuento de linfocitos. Por otro lado, la duración media de la trombocitopenia y de la anemia dependientes de la transfusión fueron de 36 y 38 días, respectivamente.

En los análisis, no se detectaron neoplasias hematopoyéticas, y no hubo presencia de anticuerpos contra ARSA, ni contra antígeno p24 del VIH. Además, no hubo presencia de lentivirus con capacidad de replicación.⁽¹⁰⁾

C. AMPLIACIÓN A 29 PACIENTES.

Los pacientes se clasificaron en función de la edad de inicio de los síntomas, ya fuera por la edad de aparición de síntomas en los hermanos mayores afectados o por el inicio de síntomas en el propio paciente tratado. El estudio incluyó 29 pacientes que recibieron trasplante entre mayo de 2010 y octubre de 2017, 20 de ellos pertenecientes al ensayo clínico NCT01560182 y nueve adicionales que estaban siendo tratados a través de tres programas distintos de uso compasivo. De ellos, 19 presentaban MLD infantil tardía y 13 MLD juvenil temprana, con un seguimiento medio de 3,16 años (máximo de 7,5 años).

Éstos se compararon con 31 pacientes con MLD de inicio temprano de una cohorte de historia natural, es decir, no tratados, emparejados por edad y subtipo de enfermedad. Todos los afectados de MLD infantil tardía comenzaron siendo asintomáticos a la inscripción, aunque uno de ellos mostró síntomas en el momento del tratamiento. Ocho de los pacientes con MLD juvenil temprana presentaron síntomas tempranos en el momento del tratamiento.

El tratamiento con HSCT autólogo con las células transducidas se considera medicamento de terapia génica, recibiendo el nombre de Atidarsagene autotemcel (arsa-cel). Todos los pacientes recibieron HSC derivadas exclusivamente de la médula ósea, con la excepción de dos, que recibieron adicionalmente HSC derivadas de PB, y la de otro paciente que solo recibió infusión de HSC derivadas de PB. La eficiencia de la transducción obtenida con células de PB y el injerto conseguido tras el trasplante con estas células estuvieron dentro del rango observado en los pacientes que tuvieron la médula ósea como fuente de HSC.

a. Eficacia.

Transcurrido 1 año del tratamiento, el porcentaje medio de las células de la médula ósea positivas para el vector lentiviral fue del 55%. Éste se mantuvo estable durante todo el seguimiento (Figura 12A). Además, los pacientes presentaron valores de VCN elevados y estables en las PBMC (Figura 12B), en las células CD34⁺ (HSC) de la médula ósea (Figura 12C) y en subpoblaciones de los linajes mieloide y linfoide.

Transcurridos tres meses del inicio del tratamiento, todos los pacientes mostraron una actividad ARSA reconstituida en las PBMC dentro o por encima del rango normal (Figura 12D). Como resultado, en el punto de valoración coprimario, dos años después del tratamiento, la actividad ARSA aumentó significativamente respecto al valor inicial, con un aumento promedio de 18,7 veces (rango 8,3-42,2) en los pacientes con MLD infantil tardía y de 5,7 veces (rango 2,6-12,4) en los pacientes con MLD juvenil temprana. Estos aumentos se mantuvieron a lo largo del seguimiento (Figura 12D).

La actividad ARSA en el LCR, inicialmente indetectable en los pacientes, estuvo por encima del límite inferior de cuantificación (LLQ= 0,0032 nmol/mg/h) a los tres meses del trasplante. Posteriormente, entre los 6 y 12 meses después del inicio del tratamiento, se alcanzaron niveles normales de actividad respecto a pacientes pediátricos sanos y se mantuvieron dentro del rango normal durante todo el seguimiento. (Figura 12E)

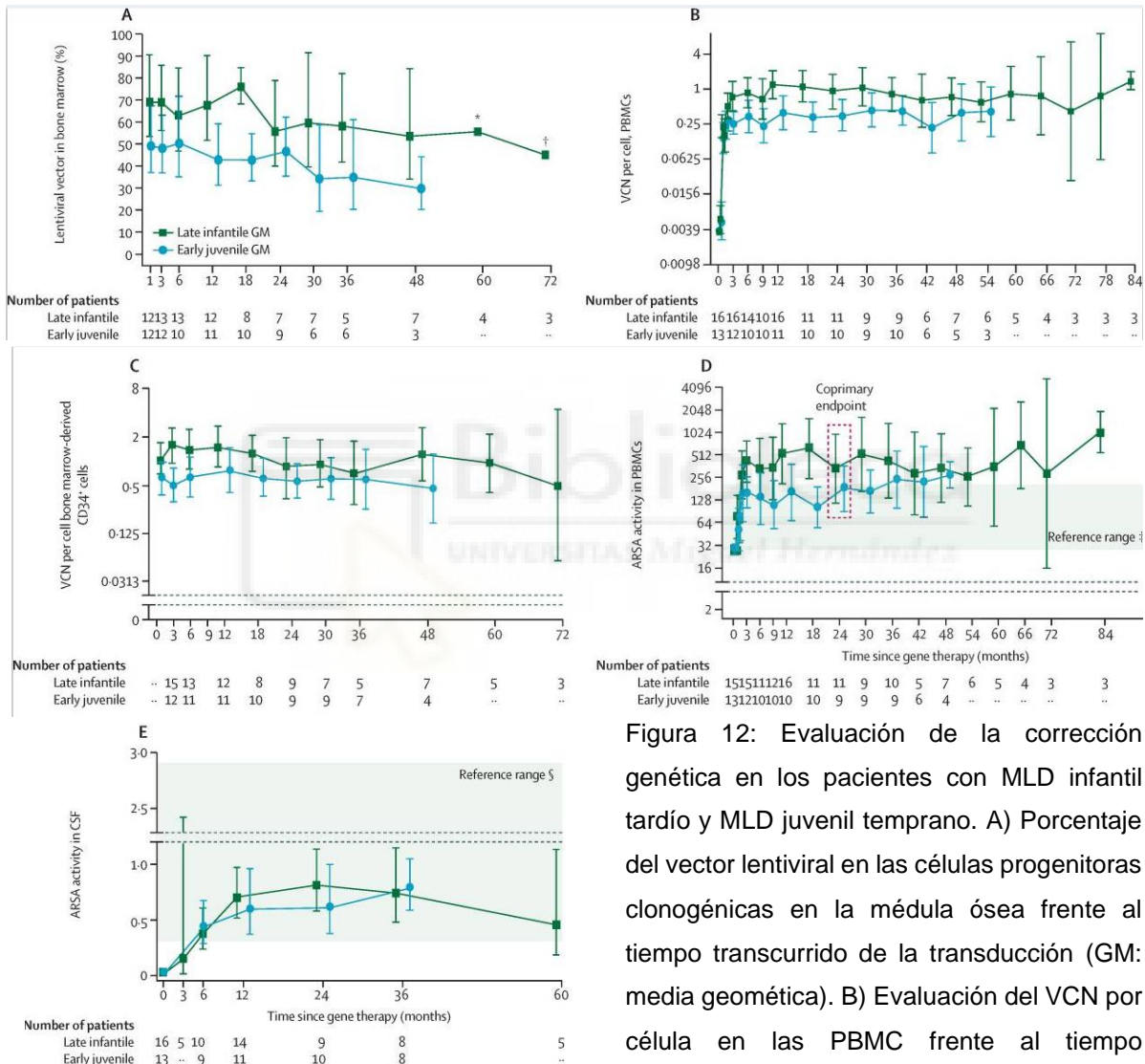


Figura 12: Evaluación de la corrección genética en los pacientes con MLD infantil tardío y MLD juvenil temprano. A) Porcentaje del vector lentiviral en las células progenitoras clonogénicas en la médula ósea frente al tiempo transcurrido de la transducción (GM: media geométrica). B) Evaluación del VCN por célula en las PBMC frente al tiempo transcurrido de la transducción. C) Evaluación del VCN por célula en las HSC (CD34⁺) derivadas de la médula ósea frente al tiempo transcurrido de la transducción. D) Evaluación de la actividad ARSA en las PBMC frente al tiempo transcurrido desde la transducción, y frente al rango de referencia de donantes adultos sanos (reference range) (coprimary endpoint: punto de valoración coprimario). E) Evaluación de la actividad de ARSA en el LCR frente al tiempo transcurrido desde la transducción, y frente al rango de referencia de donantes pediátricos sanos (reference range).

Transcurridos dos años del tratamiento, se observaron diferencias en la función motora gruesa entre los pacientes tratados y no tratados a la misma edad. Los pacientes con MLD infantil tardía tratados presentaron un 66% (48,9-82,3) más de función motora gruesa que los no tratados, y los pacientes con MLD juvenil temprana tratados presentaron un 42% (12,3-71,8) más que los no tratados. La diferencia fue mayor a los tres años de seguimiento, tanto de los pacientes con MLD infantil tardía como de los pacientes con MLD juvenil temprana con respecto a los afectados no tratados (Figura 13).

Por otro lado, la mayoría de los pacientes tratados mantuvieron la supervivencia libre de deterioro motor severo, independientemente del subtipo de enfermedad y el estado sintomático, en el momento del tratamiento. De manera que, a los 4,5 años de edad, 92% de los pacientes con MLD infantil tardía permanecieron libres de eventos frente al 0% de los pacientes no tratados. A los 8 años de edad, 80% de los pacientes con MLD juvenil temprana presintomáticos y 63% de los pacientes con MLD juvenil temprana con síntomas tempranos permanecieron libres de eventos, frente al 36% de los pacientes no tratados.

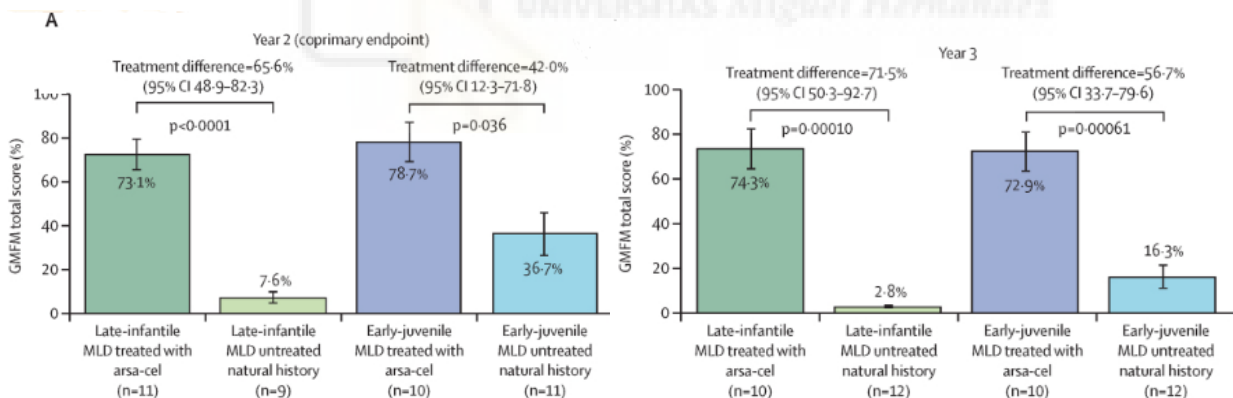


Figura 13: Puntuación GMFM y edad de deterioro motor grave o muerte. Comparación del porcentaje de puntuación de GMFM entre pacientes tratados y no tratados (Historia natural) con MLD infantil tardía y juvenil temprana, a los 2 y 3 años desde la transducción.

Durante el seguimiento, la mayoría de los pacientes tratados presentaron un rendimiento y un coeficiente intelectual verbal dentro del rango normal, respecto a pacientes pediátricos sanos, a diferencia de los pacientes no tratados, que a la misma edad presentaron un deterioro cognitivo grave. Además, 80% de

los pacientes tratados presentaron una adquisición normal de habilidades cognitivas con respecto a los pacientes sanos.

Las resonancias magnéticas cerebrales de los pacientes con MLD infantil tardía y MLD juvenil temprana, transcurridos 2 y 3 años del tratamiento, mostraron una disminución significativa de la desmielinización o de la atrofia, o de ambas, con respecto a los pacientes no tratados a la misma edad y con el mismo subtipo de enfermedad.

Los pacientes con MLD infantil tardía y MLD juvenil temprana presintomática presentaron una estabilización de la puntuación de la imagen de resonancia magnética nuclear en niveles significativamente más bajos que los pacientes no tratados, quienes presentaron un brusco aumento indicativo de una desmielinización y una atrofia grave (Figura 14A-E). Por otra parte, los pacientes con MLD juvenil temprana con síntomas tempranos se estabilizaron en puntuaciones más altas, si bien siguieron siendo significativamente más bajas que las de los pacientes no tratados (Figura 14E).

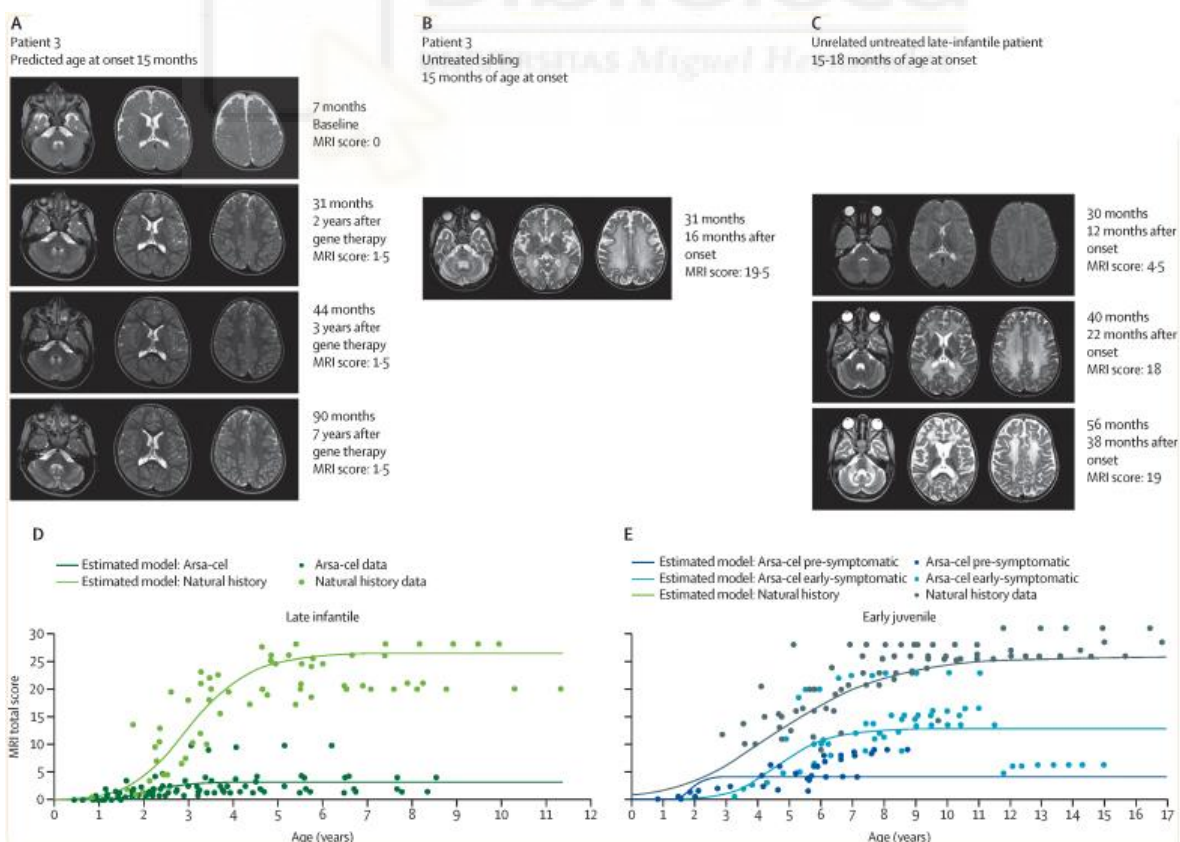


Figura 14: Evaluación de la resonancia magnética nuclear de cerebros de los pacientes tratados con arsa-cel *versus* los pacientes no tratados (historia clínica). A) Resonancia magnética axial

del paciente MLD3, con MLD infantil tardía, en la que se observan sutiles hiperintensidades al inicio del estudio que se estabilizaron con el tiempo, y una maduración normal del resto de regiones. B) Imágenes de resonancia magnética obtenida del hermano no tratado de MLD03 a la misma edad. C) Imágenes de resonancia magnética obtenidas de un paciente no tratado con MLD infantil tardía con edad de inicio similar en las que se observa un aumento progresivo de las lesiones, de la desmielinización y de la atrofia cerebral. D y E) Comparación de las puntuaciones totales de la imagen de resonancia magnética nuclear en pacientes con MLD infantil tardía (D), y con MLD juvenil temprana (E) tratados con arsa-cel frente a los pacientes no tratados (Historia natural).

El estudio del índice NCV mostró diferencias significativas entre los pacientes con MLD infantil tardía y los pacientes no tratados, a la misma edad y subtipo de enfermedad, transcurridos 2 y 3 años del trasplante. Sin embargo, se observó un resultado más heterogéneo en los pacientes con MLD juvenil temprana.⁽¹¹⁾

b. Seguridad.

Tras el último seguimiento, 26 de los 29 pacientes seguían vivos. Dos de las muertes se debieron a la rápida progresión de la enfermedad en estos pacientes con MLD juvenil temprana con síntomas tempranos, una a los 8 meses y otra a los 15 meses de iniciarse el tratamiento, por lo que se consideraron no relacionadas con arsa-cel. El tercero, que presentaba MLD juvenil temprana presintomática, murió debido a un accidente cerebrovascular isquémico tras una infección a los 13,6 meses después del trasplante. Se consideró que no había relación con el tratamiento, ya que, al año de la transducción, presentó examen neurológico y neuroimagen normales, y un desarrollo motor y cognitivo normal.

Los pacientes presentaron neutropenia, con una duración media de 28 días (rango 13-39). Los efectos adversos de mayor frecuencia de grado 3 o superiores fueron la neutropenia febril con 23 pacientes, alteraciones de la marcha con 15 pacientes y estomatitis con 12 pacientes.

La mayoría de los eventos adversos se asociaron con el acondicionamiento con busulfán o la progresión de la propia enfermedad. Por un lado, los eventos adversos asociados al acondicionamiento se dieron en tres pacientes, que presentaron eventos de enfermedad venooclusiva, y en dos, que

presentaron eventos de microangiopatía trombótica. Por otro lado, los eventos adversos relacionados con la enfermedad base se dieron en dos pacientes, los cuales presentaron acidosis metabólica, que se resolvió, y en dos que presentaron pólipos vesiculares, que requirieron colecistectomía, todos considerados relacionados con la enfermedad base.

Cuatro pacientes presentaron anticuerpo anti-ARSA, que se resolvió espontáneamente o con terapia de depleción de linfocitos B. Estos eventos no tuvieron efecto evidente sobre el resultado clínico o el perfil de seguridad. La cantidad observada de anticuerpos anti-ARSA fue baja, y en tres pacientes se asociaron con la presencia de otros anticuerpos o manifestaciones clínicas de enfermedad venooclusiva o microangiopatía trombótica.

Durante el seguimiento, no hubo evidencia de expansión clonal maligna, lentivirus con capacidad de replicación o eventos adversos indicativos de transformación oncogénica con arsa-cel. Los análisis de los IS indicaron un patrón de reconstitución policlonal general, sin evidencia de dominancia o proliferación clonal.⁽¹¹⁾

D. LIMITACIONES Y COMERCIALIZACIÓN.

Los resultados de este estudio son prometedores, siendo la primera demostración de la detención o ralentización de la progresión de la MLD en el SNC y en el SNP. No obstante, a pesar de que el tratamiento ha mostrado beneficios, viabilidad y seguridad en los pacientes, presenta limitaciones.

Se observó que la terapia es activa en las primeras fases de la enfermedad, de manera que los pacientes sintomáticos, que entran en una fase rápida de progresión de la enfermedad durante el tratamiento, podrían no obtener beneficios de esta terapia. Debido al tiempo requerido para el injerto de las HSC modificadas genéticamente y la reconstitución de la actividad ARSA en las PBMC y el LCR, y la variabilidad entre el tiempo de inicio de los síntomas y la progresión rápida de la enfermedad, los pacientes deberían ser diagnosticados de forma temprana para que la terapia tuviera la mayor eficacia. Sin embargo, mientras no haya programas de escrutinio de la MLD en recién

nacidos, esto no será posible en muchos casos y no podrían ser tratados a tiempo. Otras terapias génicas, como las estrategias *in vivo* con vectores AAV con el gen *ARSA*, podrían permitir un rápido suplemento de la enzima en los pacientes que ya han entrado en fase de deterioro.

Otra de las limitaciones es el tiempo de seguimiento, ya que, para poder conocer y comprender el efecto de esta terapia génica, sería necesario un seguimiento más prolongado, de 10 a 20 años para determinar la supervivencia de las células transducidas y la durabilidad de las respuestas clínicas, especialmente en el sistema nervioso periférico. Además, el ensayo se realizó con un número pequeño de pacientes en cada subgrupo. Para una mejor evaluación de la terapia, haría falta un número mayor de pacientes, lo que es complicado, al tratarse de una enfermedad rara.

Por otro lado, el pretratamiento mieloablativo con busulfán fue de utilidad para lograr el injerto. Sin embargo, produjo toxicidad. Se podrían reducir los riesgos, como el de las enfermedades venooclusivas, con el uso de mejores métodos profilácticos, como la defibrotida, por ejemplo.

Además, cuatro de los pacientes desarrollaron anticuerpos anti-*ARSA*. Aunque no se observó interferencia con la eficacia, sería conveniente seguir este suceso en el tiempo, pues se podría plantear la adición de terapias inmunodepresoras en los futuros pacientes.

Arsa-cel está aprobado como medicamento basado en terapia génica para su uso por la compañía biotecnológica Orchard Therapeutics en la UE y el Reino Unido, con el nombre de Libmeldy. Además, está bajo investigación por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para permitir su uso en los EE.UU. ⁽¹²⁾

8. CONCLUSIÓN.

La terapia génica para la MLD se basa en el HSCT autólogas modificadas *ex vivo* con un vector lentiviral para conseguir la sobreexpresión del gen *ARSA* en las células mieloides derivadas de éstas, con el fin de aumentar la actividad *ARSA* en el SNC y el SNP.

A lo largo del ensayo clínico se ha demostrado la eficacia del tratamiento, al observar:

- Presencia de un injerto estable, con un VCN elevado y estable en las PBMC y HSC de la médula ósea.
- Aumento de la actividad ARSA hasta valores normales o por encima en PBMC y normales en el LCR.
- Mejoría de la función motora gruesa y un coeficiente intelectual dentro del rango normal.
- Disminución de la desmielinización y de la atrofia cerebral en las resonancias magnéticas de los pacientes tratados.

La eficacia ha sido mayor en los pacientes presintomáticos. Por lo tanto, para obtener la mayor eficacia, los pacientes deberían ser diagnosticados de forma temprana.

Esta terapia demostró ser segura al no mostrar expansión clonal maligna, lentivirus con capacidad de replicación o eventos adversos indicativos de activación oncogénica.

Este nuevo tratamiento supuso una gran oportunidad de mejora para el tratamiento de los pacientes con MLD con respecto a los tratamientos convencionales, aunque aún es necesario realizar estudios a más largo plazo y con más pacientes.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Shaimardanova AA, Chulpanova DS, Solovyeva VV, Mullagulova AI, Kitaeva KV, Allegrucci C, et al. Metachromatic Leukodystrophy: Diagnosis, Modeling, and Treatment Approaches. *Front Med.* 2020;7:576221.
2. Gomez-Ospina N. Arylsulfatase A Deficiency. En: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., editores. *GeneReviews(®)*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
3. Kumar SR, Markusic DM, Biswas M, High KA, Herzog RW. Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;3:16034.

4. Strachan T, Chinnery P y Goodship J. *Genetics and Genomics in Medicine*. Nueva York, USA: Editorial Garland Science; 2015.
5. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttua S. History of gene therapy. *Gene*. 10 de agosto de 2013;525(2):162-9.
6. Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. *Science*. 12 de enero de 2018;359(6372):eaan4672.
7. Collins M, Thrasher A. Gene therapy: progress and predictions. *Proc Biol Sci*. 22 de diciembre de 2015;282(1821):20143003.
8. Biffi A, Montini E, Lorioli L, Cesani M, Fumagalli F, Plati T, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science*. 23 de agosto de 2013;341(6148):1233158.
9. Morena F, Argentati C, Acquati S, DeWall S, Kelly F, Calbi V, et al. Toward Reference Intervals of ARSA Activity in the Cerebrospinal Fluid: Implication for the Clinical Practice of Metachromatic Leukodystrophy. *J Appl Lab Med*. 1 de marzo de 2021;6(2):354-66.
10. Sessa M, Lorioli L, Fumagalli F, Acquati S, Redaelli D, Baldoli C, et al. Lentiviral haemopoietic stem-cell gene therapy in early-onset metachromatic leukodystrophy: an ad-hoc analysis of a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Lond Engl*. 30 de julio de 2016;388(10043):476-87.
11. Fumagalli F, Calbi V, Natali Sora MG, Sessa M, Baldoli C, Rancoita PMV, et al. Lentiviral haematopoietic stem-cell gene therapy for early-onset metachromatic leukodystrophy: long-term results from a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial and expanded access. *Lancet Lond Engl*. 22 de enero de 2022;399(10322):372-83.
12. Kurtzberg J. Gene therapy offers new hope for children with metachromatic leukodystrophy. *Lancet Lond Engl*. 22 de enero de 2022;399(10322):338-9.