



# FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

**Terapia génica para enfermedades hereditarias debidas a mutaciones en el gen de la  $\beta$ -globina.**

Memoria de Trabajo de Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

2024

Autor: Aziza El Alj.

Modalidad: Revisión bibliográfica.

Tutor: Antonio Martínez Laborda.

## ÍNDICE:

1. RESUMEN. ....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
1. Hemoglobina.....	4
2. Mutaciones en el gen de la $\beta$ -Globina.....	6
3. Hemoglobina fetal persistente.....	8
4. Tratamientos convencionales para las dos enfermedades..	10
5. Terapia génica.....	12
6. Mutagénesis mediante CRISPR/Cas9.....	13
3. OBJETIVOS. ....	14
4. METODOLOGIA. ....	16
1. Diseño y obtención de los datos.....	17
2. Selección de los artículos .....	18
5. RESULTADOS.....	19
1. Casgevy.....	19
2. Estudios preclínicos.....	20
3. Producción e infusión de CTX001.....	20
4. Los dos primeros pacientes.....	22
1. Eficacia.....	22
2. Seguridad.....	23
5. Ampliación a 44 pacientes del ensayo para la ECF.....	25
1. Eficacia .....	26
2. Seguridad .....	26
6. Ampliación a 52 pacientes del ensayo para la TDT.....	28
1. Eficacia .....	28
2. seguridad.....	30
7. Limitaciones y Aprobación de casgevy.....	32
6. DISCUSIÓN.....	34
7. CONCLUSIONES. ....	36
8. BIBLIOGRAFÍA. ....	37

## 1. RESUMEN

**Antecedentes:** Las enfermedades hereditarias resultantes de mutaciones en el gen de la  $\beta$ -globina, como la anemia falciforme (enfermedad de células falciformes) y la  $\beta$ -talasemia, se clasifican como afecciones graves y poco comunes que impactan significativamente en la calidad de vida de los pacientes. Los tratamientos disponibles hasta ahora son complejos y, con la excepción del trasplante alogénico de médula ósea, no logran proporcionar una cura definitiva. En este contexto, la terapia génica es capaz de no solo ofrecer mejoras sustanciales en la calidad de vida, sino también de proporcionar una curación efectiva para estas enfermedades.

**Objetivos:** Evaluar el uso de la terapia génica en el tratamiento de la anemia falciforme y la  $\beta$ -talasemia, valorando su eficacia y seguridad.

**Resultados:** Se modificaron células madre y progenitoras de los pacientes de anemia falciforme o de  $\beta$ -talasemia con el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 para eliminar la expresión del gen *BCL11A*, un represor de la  $\gamma$ -globina en el linaje celular eritropoyético, lo que favoreció la reactivación de la hemoglobina fetal y el restablecimiento de la síntesis de  $\gamma$ -globina una vez introducidas las células modificadas en los pacientes.

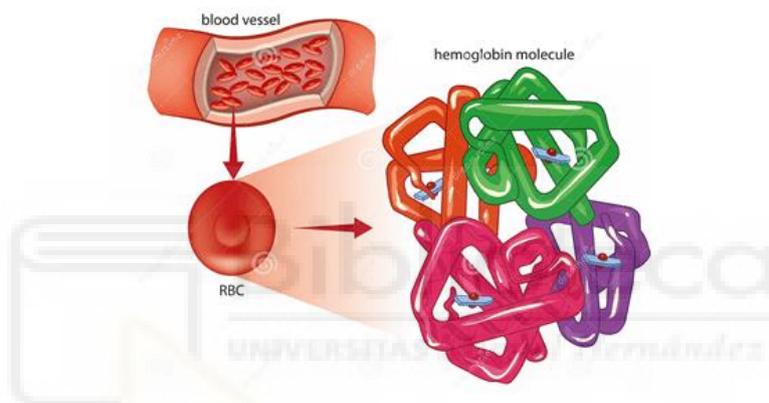
**Conclusión:** El tratamiento aumentó la cantidad de hemoglobina total y de células sanguíneas sanas, y eliminó o redujo drásticamente la necesidad de transfusiones a largo plazo. Esta terapia, comercializada con el nombre de casgevy, ofrece un impacto positivo en la calidad de vida de los pacientes, representando un avance importante en medicina genética y hematología.

**Palabras claves:** Anemia falciforme (Enfermedad de células falciformes, ECF),  $\beta$ -talasemia dependiente de transfusión (TDT), CRISPR/Cas9, Casgevy (CTX001).

## 2. ANTECEDENTES.

### 1. Hemoglobina

La hemoglobina es una proteína localizada en el interior de los glóbulos rojos que tiene como función el transporte de oxígeno a todas las células del organismo. La hemoglobina humana consiste en un tetrámero compuesto por 2 cadenas de globina de tipo  $\alpha$  y 2 cadenas de globina de tipo  $\beta$  unidas cada una de ellas a un grupo hemo asociado a una molécula de hierro que se une de forma reversible a una sola molécula de oxígeno (Figura 1) <sup>(1)</sup>.



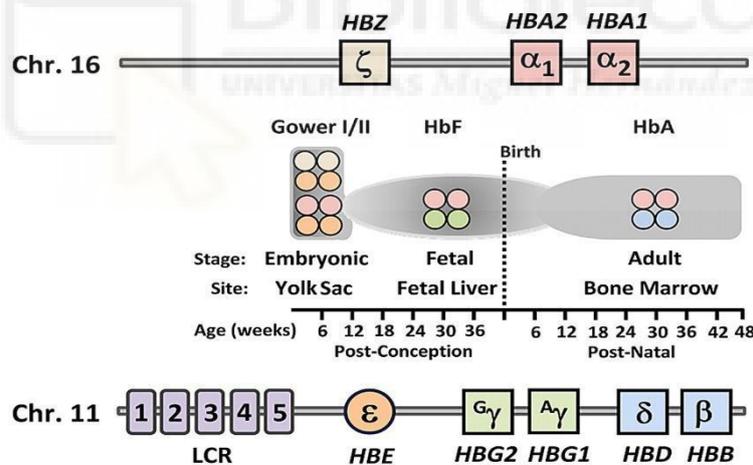
**Figura 1.** Cada glóbulo rojo contiene moléculas de hemoglobina compuesta de 2 cadenas de globina de tipo  $\alpha$  y 2 cadenas de globina de tipo  $\beta$ , junto con grupos hemo unidos a cada subunidad donde se fija el oxígeno <sup>(2)</sup>.

Los genes de las globinas que forman la hemoglobina están dispuestos en dos complejos de genes, uno para las globinas de tipo  $\alpha$  en el cromosoma 16 y otro para las globinas de tipo  $\beta$  en el cromosoma 11. La composición de subunidades de globina en la hemoglobina cambia a lo largo del desarrollo para satisfacer las necesidades de oxígeno del organismo durante los diferentes estadios, siempre con una proporción 1:1 de cadenas de tipo  $\alpha$  y de tipo  $\beta$  <sup>(1)</sup>.

La hemoglobina embrionaria se produce en los eritroblastos primitivos que se desarrollan en el saco vitelino durante las primeras semanas después de la concepción. Esta hemoglobina está compuesta por una cadena de tipo  $\beta$ , la  $\epsilon$ -globina, y una cadena de tipo  $\alpha$ , la  $\zeta$ -globina en la hemoglobina Gower-1 ( $\zeta 2\epsilon 2$ ) o la  $\alpha$ -globina en la hemoglobina Gower-2 ( $\alpha 2\epsilon 2$ ) (Figura 2) <sup>(1) (3)</sup>.

El primer cambio importante en la hemoglobina ocurre cuando cesa la expresión de las globinas  $\zeta$  y  $\epsilon$ , y comienza la síntesis de la  $\gamma$ -globina, otra globina de tipo  $\beta$ , dando lugar a la producción de la hemoglobina fetal o HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) (Figura 2). Estos eventos coinciden con la transición del sitio de eritropoyesis desde el saco vitelino al hígado fetal y más tarde también en el bazo. En los seres humanos, los genes de la  $\gamma$ -globina están duplicados y sus productos proteicos difieren en un aminoácido, lo que lleva a su designación como genes  $G\gamma$  y  $A\gamma$ .

El segundo cambio implica la disminución perinatal de la síntesis de HbF, debido al silenciamiento de los dos genes de  $\gamma$ -globina, y la síntesis de las formas adultas de hemoglobina en la médula ósea, principalmente la hemoglobina A1 (HbA1,  $\alpha_2\beta_2$ ) y en menor medida la hemoglobina A2 (HbA2,  $\alpha_2\delta_2$ ), con la expresión de los genes de  $\beta$ -globina y  $\delta$ -globina, ambos de globina de tipo  $\beta$  (Figura 2). Después de los 2 años de edad, la presencia de HbF es mínima en la hemoglobina total, limitándose a un pequeño porcentaje de glóbulos rojos maduros en los individuos sanos <sup>(3) (4)</sup>.



**Figura 2.** Esquema de la organización estructural genómica de los loci de globinas de tipo  $\alpha$  y globinas de tipo  $\beta$  humanas, y expresión temporal de los distintos tipos de hemoglobina. Tipos de globinas: tipo  $\alpha$  ( $\zeta$ ,  $\alpha$ ) y tipo  $\beta$  ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\beta$ ). LCR indica región de control del locus <sup>(3)</sup>.

La regulación de la expresión de los genes del complejo de globinas de tipo  $\beta$  muestra un alto grado de coordinación a lo largo del desarrollo, que da lugar a la producción de la  $\epsilon$ -globina en el embrión, la  $\gamma$ -globina en el feto y las globinas  $\beta$  y  $\delta$  tras el nacimiento, con la consecuente presencia de las hemoglobinas

embrionarias (Gower-1 y Gower-2), fetal (HbF) y adultas (HBA1 y HBA2). Este control de la expresión génica se debe, en gran parte, a la presencia de una región reguladora, denominada región de control del locus (LCR) a la que se unen factores de transcripción para que se transcriban unos genes del complejo de globinas de tipo  $\beta$  y se silencien otros (Figura 2) <sup>(3) (4)</sup>.

Defectos cualitativos o cuantitativos en la producción de  $\beta$ -globina son responsables de dos trastornos hereditarios monogénicos prevalentes: la  $\beta$ -talasemia y la anemia falciforme o enfermedad de células falciformes (ECF) <sup>(1)</sup>.

## **2. Mutaciones en el gen de la $\beta$ -Globina.**

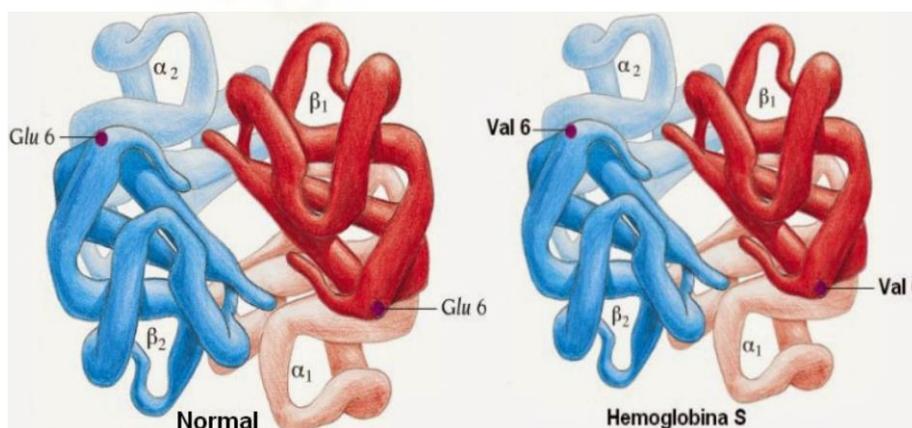
La  $\beta$ -talasemia se caracteriza por una reducción en la producción de hemoglobina adulta HbA1. Esta disminución de hemoglobina HbA1 se ve compensada, aunque de manera parcial e insuficiente, por un incremento de la producción de hemoglobina HbA2. En los individuos afectados por la  $\beta$ -talasemia, los bajos niveles de hemoglobina resultan en una disminución de los niveles de oxígeno en el cuerpo y una consecuente oxigenación deficiente de los tejidos <sup>(1) (5)</sup>.

La enfermedad se debe a mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica la  $\beta$ -globina que resultan en una síntesis reducida de su producto proteico. Estas mutaciones afectan mayoritariamente a la transcripción, la maduración del ARNm o la traducción, y varían en su gravedad desde una ausencia total de  $\beta$ -globina (mutaciones nulas o  $\beta^0$ ) a una reducción parcial (mutaciones hipomorfas o  $\beta^+$ ). Las manifestaciones clínicas oscilan desde leves o nulas en individuos portadores heterocigotos a los casos de  $\beta$ -talasemia intermedia, que da lugar a anemia leve o moderada, y de  $\beta$ -talasemia mayor o grave (anemia de Cooley), que en ausencia de tratamiento es letal durante la primera década de vida.

La gravedad de la enfermedad se ve incrementada por el desequilibrio entre el número de cadenas de  $\alpha$ -globina y de globinas de tipo  $\beta$ . En ausencia o reducción de las cadenas de  $\beta$ -globina, el exceso de cadenas de  $\alpha$ -globina no

ensambladas precipita produciendo agregados insolubles y daños oxidativos que deterioran la membrana de los eritrocitos y dan lugar a hemólisis <sup>(1)</sup>.

La ECF y sus variantes representan los trastornos hematológicos hereditarios más prevalentes, afectando a millones de individuos en todo el mundo. Diversas mutaciones en el gen de la  $\beta$ -globina generan distintas variantes de la hemoglobina, siendo una de ellas la hemoglobina S (HbS), que se caracteriza por la homocigosis de una mutación de cambio de sentido (mutación  $\beta^S$ ), en la que una valina reemplaza al ácido glutámico en el aminoácido seis de la cadena proteica de la  $\beta$ -globina [Glu6Val, rs334] (Figura 3). En el estado desoxigenado, este cambio genético provoca la formación de polímeros filamentosos de hemoglobina S, dando lugar a la deformación de los eritrocitos, que adoptan la forma de hoz característica responsable de la denominación de esta anemia como anemia falciforme o enfermedad de células falciformes (ECF). Los eritrocitos deformados obstruyen los vasos sanguíneos pequeños, dando lugar a crisis vasooclusiva, lo que compromete el suministro de oxígeno a los tejidos y provoca microinfartos en los órganos, y sufren hemólisis causante de anemia crónica severa. La gravedad de los síntomas suele dar lugar a mortalidad temprana.



**Figura 3.** Transformación de la hemoglobina normal, llamada hemoglobina A (HbA) por una hemoglobina anormal llamada hemoglobina S (HbS) por sustitución del ácido glutámico por una valina en la posición 6 de la cadena de  $\beta$ -globina.<sup>(6)</sup>

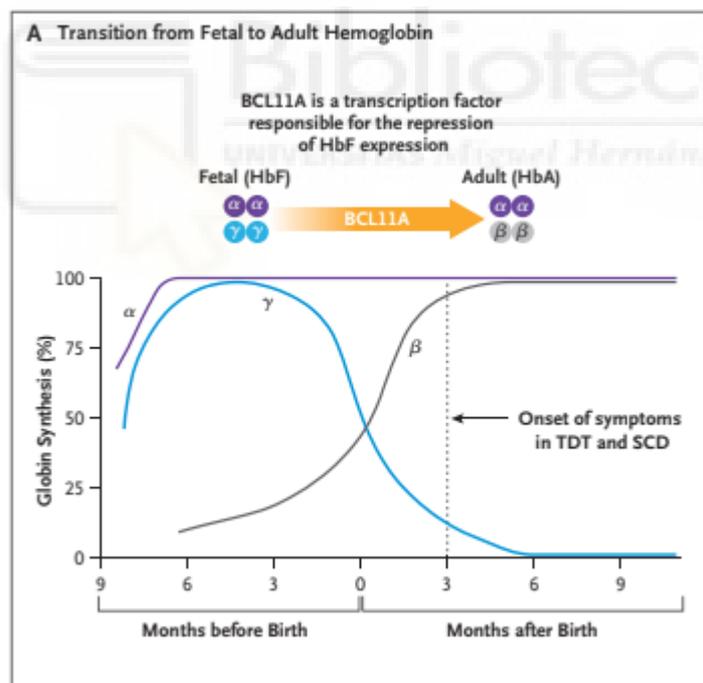
Existen otras mutaciones en el gen de la  $\beta$ -globina que provocan en homocigosis la aparición de variantes anómalas adicionales de hemoglobina, como la hemoglobina C (HbC) y la hemoglobina E (HbE) que dan lugar a anemias leves. Heterocigotos de uno u otro de estos alelos mutantes de la  $\beta$ -globina con el que provoca la ECF ( $\beta^S$ ) dan formas menos graves de esta enfermedad. Por otro lado, heterocigotos con el alelo  $\beta^S$  y un alelo de  $\beta$ -talasemia ( $\beta^0$  o  $\beta^+$ ) presentan formas de ECF cuya gravedad va a depender del grado de pérdida de función del alelo para la  $\beta$ -talasemia. Las variaciones genéticas descritas anteriormente, responsables de las diferentes formas en que se manifiesta clínicamente la enfermedad, destacan su complejidad genética. Incluso en el caso de los homocigotos para el alelo  $\beta^S$ , la forma más grave de la ECF, se observa una marcada diversidad en la manifestación de los síntomas, debido a otros genes modificadores y a factores ambientales, que complica la comprensión y el manejo de la enfermedad en la práctica clínica. Los niveles elevados de hemoglobina fetal, la coexistencia con  $\alpha$ -talasemia y la influencia de determinados factores genéticos pueden reducir la gravedad de la enfermedad en los pacientes.

### **3. Hemoglobina fetal persistente**

La persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal (PHHF) hace referencia al efecto de una serie de mutaciones espontáneas que resultan en la continuación de la síntesis de  $\gamma$ -globina, característica del feto, en etapas adultas. Durante el desarrollo, algunos genes se activan mientras que otros se silencian. El cambio de hemoglobina fetal a hemoglobina adulta implica el silenciamiento de los dos genes de  $\gamma$ -globina, que dejan de expresarse. En el caso de la PHHF, no se produce este silenciamiento genético, por lo que los individuos con esta condición no experimentan el cese de la expresión de los genes de  $\gamma$ -globina durante la transición de hemoglobina fetal a hemoglobina adulta, manteniendo la producción de hemoglobina fetal. Esta se distingue de la hemoglobina adulta por

su resistencia a la desnaturalización alcalina y ser más eficaz para el transporte de oxígeno <sup>(1)</sup>.

Las mutaciones implicadas en la PHHF pueden clasificarse en tres categorías: grandes deleciones que afectan a la estructura del complejo génico de las globinas de tipo  $\beta$ , mutaciones puntuales dentro de los promotores de los genes de la  $\gamma$ -globina y mutaciones no ligadas al complejo génico de las globinas de tipo  $\beta$ . Dentro de estas últimas están las que eliminan la función del gen *Linfoma/Leucemia de linfocitos B 11A (BCL11A)*, que es un factor de transcripción con dominios de zinc que suprime la expresión de  $\gamma$ -globina y hemoglobina fetal en las células eritroides <sup>(1)</sup>. Se trata del represor más importante de los genes de la  $\gamma$ -globina, que básicamente le indica al organismo que reduzca la producción de hemoglobina fetal para elaborar la del tipo adulto (Figura 4).



**Figura 4.** Transición de la hemoglobina fetal (HbF) a la hemoglobina adulta (HbA) poco después del nacimiento, junto con el papel del factor de transcripción BCL11A en la mediación de la represión de los genes de  $\gamma$ -globina, un componente de la hemoglobina fetal. TDT,  $\beta$ -talasemia dependiente de transfusión; SCD, enfermedad de células falciformes (del inglés, *Sickle Cell Disease*).

Individuos con homocigosis para la mutación de la  $\beta$ -globina causante de ECF o con homocigosis para mutaciones que resultan en una síntesis deficiente de  $\beta$ -globina que da lugar a  $\beta$ -talasemia grave y que, además, manifiestan PHHF presentan un fenotipo clínico más atenuado de las dos enfermedades. En este contexto, la síntesis de  $\gamma$ -globina y la reactivación de la producción de hemoglobina fetal en la etapa adulta con el objetivo de recrear el efecto de la PHHF se ha identificado como una estrategia potencialmente válida para el tratamiento de la ECF y la  $\beta$ -talasemia. Se considera que alcanzar un 30% de producción de hemoglobina fetal es un umbral curativo significativo, capaz de impedir la polimerización de las cadenas libres de  $\alpha$ -globina en la  $\beta$ -talasemia y la precipitación de hemoglobina HbS en la ECF.

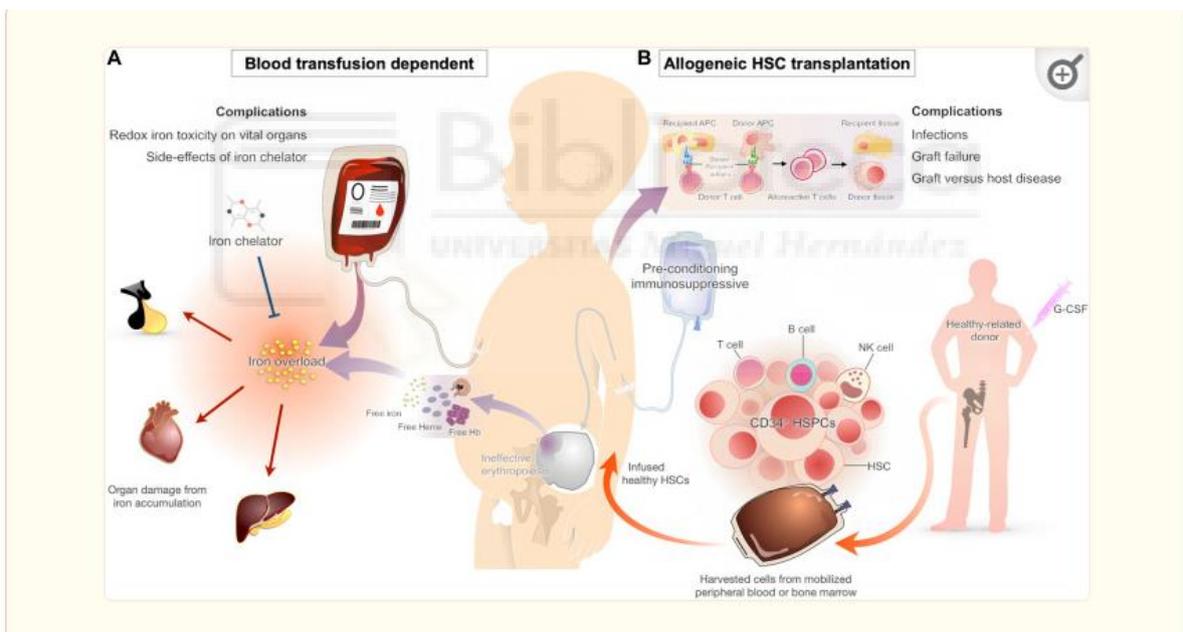
#### **4. Tratamientos convencionales para las dos enfermedades**

Los tratamientos convencionales para abordar la  $\beta$ -talasemia y la ECF incluyen la administración de transfusiones sanguíneas regulares complementada con terapia de quelación del hierro, el trasplante alogénico de médula ósea y el empleo de hidroxiurea. Estas intervenciones se seleccionan y ajustan de acuerdo con la gravedad de la enfermedad y las necesidades específicas de cada paciente.

En el tratamiento habitual para la  $\beta$ -talasemia y la ECF, la transfusión sanguínea crónica es la estrategia estándar para mantener niveles adecuados de hemoglobina y garantizar un funcionamiento cardiovascular apropiado en los pacientes (Figura 5A). Sin embargo, una consecuencia notable de estas transfusiones es la acumulación de hierro en el organismo. Dado que la sangre transfundida contiene hierro y el cuerpo humano carece de un mecanismo funcional para su excreción, todos los individuos tratados con transfusión crónica desarrollan una sobrecarga de hierro que conduce a un daño orgánico por lesión

oxidativa. Para contrarrestar estas complicaciones relacionadas con la sobrecarga de hierro, se inicia el uso de quelantes en las fases tempranas de los enfermos dependientes de transfusiones <sup>(7)</sup>.

Adicionalmente, el trasplante alogénico de médula ósea (Figura 5B) se ha posicionado como un enfoque terapéutico curativo a largo plazo para los afectados de  $\beta$ -talasemia y ECF, ofreciendo la esperanza de una cura definitiva para los pacientes dependientes de transfusiones <sup>(7)</sup>. Este procedimiento implica la sustitución de las células madre eritropoyéticas de los pacientes con las células progenitoras que se encuentran en la médula ósea y dan origen a todos los tipos de células sanguíneas. Estas células se obtienen de un donante sano y compatible desde el punto de vista inmunológico (Figura 5B).



**Figura 5.** Enfoques terapéuticos convencionales y sus complicaciones en la curación de las dos enfermedades. Transfusión de sangre crónica (A). Trasplante de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) de un donante sano (B) <sup>(7)</sup>.

La hidroxiurea, originalmente desarrollada como una forma de quimioterapia, incrementa los niveles de hemoglobina fetal, mejorando las cantidades de hemoglobina total en los pacientes. Además, respecto a la ECF, hace que los glóbulos rojos sean más grandes y ayuda a que mantengan su forma redonda

durante más tiempo, razón por la cual el medicamento es efectivo para combatir la enfermedad.

Otros medicamentos diseñados para combatir la ECF son crizanlizumab, un anticuerpo contra la P-selectina implicada en la vasooclusión y en los procesos de dolor en los pacientes; voxelotor, un inhibidor de la polimerización de la HbS que se une de forma reversible a la hemoglobina para estabilizar el estado oxigenado de ésta, y la L-glutamina, que reduce el estrés oxidativo.

## **5. Terapia génica**

La historia de la ingeniería genética se remonta a la década de 1930, cuando se acuñó el término por primera vez. Desde entonces, se han llevado a cabo numerosos esfuerzos en este campo. Los principios básicos de la transferencia de genes en bacterias fueron establecidos en la década de 1960 y posteriormente adaptados para el desarrollo de técnicas de transfección en eucariotas. Con el descubrimiento de la capacidad de los virus para transferir material genético, los vectores virales han surgido como una herramienta prometedora y eficaz para la transferencia de genes. Estos avances tecnológicos han permitido a los científicos crear vectores de terapia génica capaces de transferir materiales genéticos específicos a las células de mamíferos.

El trasplante de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) es la única estrategia curativa para la  $\beta$ -talasemia y la ECF de entre los tratamientos convencionales actualmente disponibles. No obstante, esta intervención presenta como obstáculo principal la dificultad para encontrar donantes compatibles. La terapia génica resuelve este problema al permitir el trasplante autólogo de HSPC modificadas, convirtiendo a cada paciente en su propio donante. La terapia génica consiste en la utilización de ácidos nucleicos como agentes terapéuticos que actúan modificando la expresión génica en células del paciente, ya sea para complementar la falta de función de un gen endógeno mediante la introducción y expresión del gen en las células del paciente, para la

eliminación de la expresión de un gen endógeno con efecto patológico o un gen importante para la viabilidad de un patógeno, para la eliminación de células enfermas como, por ejemplo, las cancerosas o con fines profilácticos como ocurre con las nuevas vacunas <sup>(7)</sup>.

Existen dos enfoques principales para introducir material genético en las células como parte de la terapia génica. El primero es la terapia génica *ex vivo*, que implica la modificación de las células en un entorno de laboratorio. En este proceso, se recolectan células específicas del paciente (autólogas) o de un donante (alógenas) y se modifican utilizando un vector que transporta el gen terapéutico al interior de la célula. Una vez que las células han sido transducidas y, en algunos casos, activadas o expandidas, se reintroducen en el paciente. Por otro lado, la terapia génica *in vivo* consiste en la administración directa del ácido nucleico terapéutico al paciente, ya sea con la ayuda o no de un vector. Esto permite que el proceso de transferencia genética se lleve a cabo dentro del organismo, sin la necesidad de manipulación celular en el laboratorio. En los ensayos clínicos de terapia génica *ex vivo*, las células T modificadas son las más utilizadas, seguidas por las células madre hematopoyéticas, las células dendríticas y las células asesinas naturales (NK). Por otro lado, en los ensayos clínicos de terapia génica *in vivo*, los tejidos comunes a los que se dirige el tratamiento incluyen tumores, hígado, ojos, músculo esquelético, sistema nervioso central y corazón <sup>(7)</sup>.

## **6. Mutagénesis mediante CRISPR/Cas9**

El sistema CRISPR/Cas9 es una poderosa herramienta de edición genómica que se ha utilizado en una amplia variedad de organismos para editar genomas en células vivas, desde bacterias hasta humanos. Ha sido aplicado en la creación de modelos de enfermedades hereditarias, la identificación de genes en células humanas, la modificación genética de plantas y más. Su potencial para la edición de la línea germinal humana ha generado un intenso debate a nivel internacional. Este sistema se basa en pequeñas moléculas de ARN y proteínas Cas para

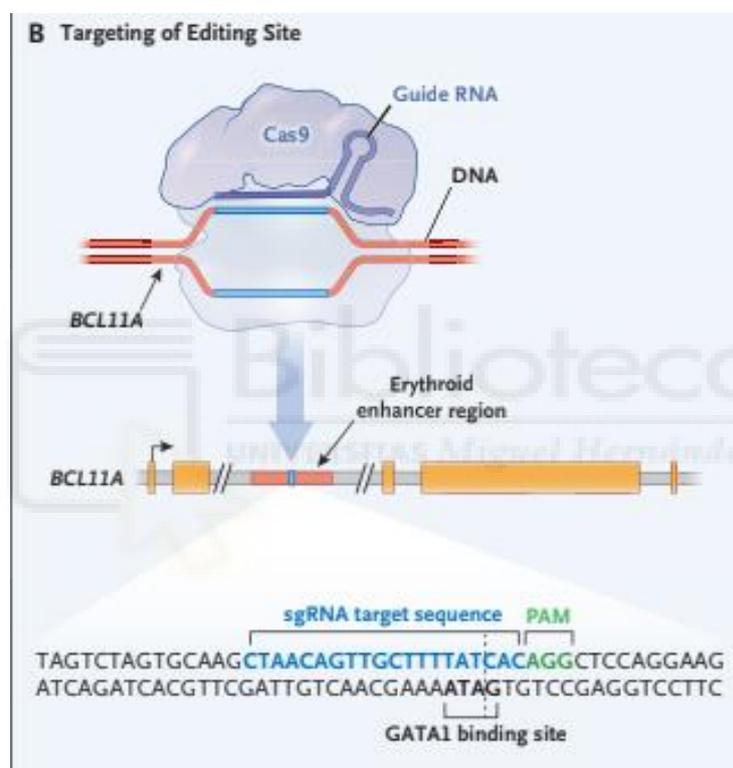
cortar el ADN, y puede ser utilizado para editar específicamente secuencias de ADN en células vivas. Los sistemas CRISPR/Cas9 se descubrieron en bacterias y arqueas, como uno de los mecanismos de estos microorganismos para defenderse contra virus. Estos sistemas se han comparado con el sistema inmunológico de los vertebrados en el sentido de que reconocen y recuerdan el ADN de patógenos específicos. Cuando el ADN extraño entra en una célula, las proteínas Cas cortan el ADN invasor que es finalmente degradado.

En la edición del genoma con CRISPR/Cas9, se diseña una secuencia de ARN guía (sgRNA) que tiene una complementariedad de 20 nucleótidos con el ADN genómico diana. El sgRNA dirige a la proteína Cas9, que tiene actividad nucleasa, hacia la ubicación específica del genoma donde se produce el corte en el ADN. Una característica importante del sistema es el requerimiento de una secuencia de 4 pares de bases, muy abundante en el genoma, adyacente al ADN diana conocida como motivo adyacente al espaciador (PAM). El complejo efector CRISPR/Cas9 reconoce primero la secuencia PAM y, a continuación, Cas9 desenrolla el ADN en esa región, permitiendo que el sgRNA empareje por complementariedad con el ADN diana. Una vez producido este emparejamiento, Cas9 corta el ADN en ambas cadenas (Figura 6).

Posteriormente, la célula utiliza mecanismos de reparación para reparar la rotura generada en el ADN. Hay dos vías principales mediante las cuales se reparan las roturas de doble hebra dentro de las células. Una de ellas, la unión de extremos no homólogos (NHEJ), une los dos extremos del ADN sin utilizar ningún molde. Este método de reparación produce lo que se conoce como indels, es decir, pequeñas inserciones o deleciones en el ADN, que normalmente resultan en la introducción de mutaciones de desplazamiento del marco de lectura de codones en la región codificante de los genes, lo que resulta en su inactivación. De manera similar, la introducción de este tipo de mutaciones en elementos reguladores críticos puede modificar significativamente el nivel de expresión de los genes diana.

El otro mecanismo utilizado por las células para reparar las roturas de doble hebra es la reparación dirigida por homología (HDR). Este mecanismo funciona

cuando se proporciona un trozo de ADN donante de doble cadena con regiones homólogas a los extremos rotos, permitiendo que la célula inserte la secuencia deseada en el lugar del corte por recombinación homóloga. De esta manera, los investigadores pueden modificar selectivamente secuencias específicas del genoma de una célula. Desafortunadamente, la eficiencia de esta última vía es baja y, con frecuencia, se unen ambos extremos mediante unión de extremos no homólogos sin la inserción del ADN donante, produciendo indels <sup>(8)</sup>.



**Figura 6.** Esquema del sistema de edición del genoma CRISPR/CAS9 para generar mutaciones de pérdida de función en la región intensificadora (*enhancer*) que regula la expresión del gen *BCL11A* en el linaje eritroide.

### 3. OBJETIVOS

Esta revisión bibliográfica tiene como objetivo principal evaluar la eficacia y la seguridad de la terapia génica en el tratamiento de la anemia falciforme (ECF) y la  $\beta$ -talasemia.

Esta tarea es crucial debido a las limitaciones de los tratamientos convencionales, que hasta ahora, con la excepción del trasplante de células madre hematopoyéticas, no han logrado curar estas enfermedades ni ofrecer una reducción completa y sostenida de sus síntomas. Ya sea por su falta de eficacia o por ofrecer solo mejoras temporales, es imperativo explorar y entender a fondo las opciones terapéuticas más avanzadas disponibles.



## 4. METODOLOGÍA

### 1. Diseño y obtención de los datos

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 de las dos enfermedades y de la intervención terapia génica en los Descriptores de Ciencias de la Salud (DeCS), obteniendo como resultado:

Términos	Descriptores DeCs
Beta-talasemia	Beta-thalassemia
Anemia falciforme	Sickle cell disease
Terapia génica	Gene therapy

**Tabla 1.** Descriptores utilizados para la obtención de resultados en las diferentes bases de datos.

A continuación, se procedió a la búsqueda Medline con las ecuaciones de búsqueda y filtros mostradas. Se buscó tanto información por separado de la anemia falciforme; beta-talasemia y de la terapia génica, como de manera conjunta, obteniendo los siguientes resultados:

```
((((beta Thalassemias[Title/Abstract]) OR (Thalassemia, beta[Title/Abstract]) AND  
(y_10[Filter]) AND (review[Filter]) AND (fft[Filter]) AND (humans[Filter]))) OR  
(Anemias, Sickle Cell[Title/Abstract])) OR (Sickle Cell  
Anemias[Title/Abstract]) Filters: Full text, Review, in the last 10 years, Humans
```

- Artículos: 55

```
((((((("beta-Thalassemia"[Mesh]) OR (beta Thalassemias[Title/Abstract])) OR  
(Thalassemia, beta Type[Title/Abstract])) AND ("Anemia, Sickle Cell"[Mesh])) OR  
(Anemias, Sickle Cell[Title/Abstract])) OR (Sickle Cell Anemias[Title/Abstract]))  
AND ("Genetic Therapy"[Mesh])) OR (Genetic Therapies[Title/Abstract])) OR  
(Therapies, Genetic[Title/Abstract]) Filters: Full text, Review, in the last 10 years,  
Humans
```

- Artículos : 160

Para realizar dicha búsqueda se añadieron los filtros:

1. Últimos diez años, marcando fecha de publicación el filtro de “10 years”.
2. Revisiones y texto completo, se filtran revisiones como tipo de artículo, con el filtro de “Review” y “Full text”.
3. Humanos, se marca como filtro “Humans”

## 2. Selección de los artículos

En la presente revisión sistemática, se seleccionaron los artículos de interés siguiendo los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Como criterios de inclusión, se tuvieron en cuenta los artículos que eran revisiones y texto completo, que incluían a sujetos que sufren de anemia falciforme y beta-talasemia, considerando terapia génica como intervención en humanos sin restricción de dosis, frecuencia y duración de la intervención y estar redactados en inglés o en español.

Por otro lado, para los criterios de exclusión, se descartaron los artículos que cumplían las siguientes características: estudios observacionales, estudios en animales o en sujetos con otras patologías y artículos inaccesibles.

Se eliminaron los artículos que no cumplían con los criterios de inclusión y exclusión establecidos previamente y se eliminaron de la misma manera los artículos duplicados, lo que resultó en un total de 160 artículos únicos. Posteriormente, se realizó una segunda selección, mediante lectura de los resúmenes, en la cual se descartaron otros 146 para obtener al final un total de 14 artículos que cumplían con los criterios establecidos para la terapia génica con casgevy en la anemia de células falciformes (ECF) y  $\beta$ -talasemia dependiente de transfusión (TDT).

## 1. RESULTADOS

### 1. Casgevy

La terapia génica casgevy, administrada mediante infusión intravenosa, fue desarrollada por CRISPR Therapeutics y Vertex Pharmaceuticals <sup>(9)</sup>. Estas dos empresas comenzaron una colaboración de investigación en 2015, enfocada en el uso de CRISPR/Cas9 para encontrar nuevos tratamientos para enfermedades genéticas. Casgevy (exagamglogene autotemcel), anteriormente conocido como CTX001 o exa-cel, es una terapia génica de estrategia *ex vivo*, basada en el sistema de edición genética CRISPR/Cas9, que se está estudiando para tratar a pacientes con  $\beta$ -talasemia dependiente de transfusión (TDT) o con anemia de células falciformes (ECF) grave.

Los estudios de asociación del genoma han descubierto polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) vinculados a una mayor producción de hemoglobina fetal en adultos. Algunos de estos SNP se encuentran en el gen *BCL11A* del cromosoma 2, que codifica un represor del gen de la  $\gamma$ -globina. Casgevy utiliza la tecnología CRISPR/Cas9 para eliminar, mediante la generación de inserciones o deleciones en células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC), la función de una región estimuladora (*enhancer*) del gen *BCL11A* responsable de su transcripción en el linaje eritroide (Figura 6). Al reducir la expresión de *BCL11A* en el linaje eritroide, se restablece la síntesis de  $\gamma$ -globina y se reactiva la producción de hemoglobina fetal, imitando el fenotipo causado por la persistencia de la hemoglobina fetal hereditaria (PHHF). La elevación de la hemoglobina fetal por casgevy tiene el potencial de aliviar las necesidades de transfusión de los pacientes con TDT y reducir las crisis falciformes dolorosas y debilitantes de los pacientes con ECF <sup>(10)(11)</sup>.

## **2. Estudios preclínicos**

Los estudios preclínicos analizaron la frecuencia de edición de *BCL11A* con CTX001 en HSPC (CD34+) de 10 donantes sanos. Se observaron altas frecuencias de edición alélica, con un promedio de  $80\pm 6\%$ , en todas las subpoblaciones de células CD34+, incluyendo las células madre hematopoyéticas a largo plazo. En las HSPC aisladas, editadas a una escala clínica y luego diferenciadas hacia el linaje eritroide, los niveles de hemoglobina fetal aumentaron a un promedio del  $29,0\pm 10,8\%$ , en comparación con el  $10,5\pm 5,2\%$  en las células control no editadas.

En ratones inmunocomprometidos, se observó un injerto equivalente para las células control y las editadas con CRISPR/Cas9. La persistencia y el patrón de las ediciones fueron estables a las 16 semanas después del trasplante, con una frecuencia media de alelos editados en las muestras de médula ósea de  $91\pm 15\%$ . Además, las células injertadas mantuvieron su potencial multilínea (<sup>11</sup>).

## **3. Producción e infusión de CTX001**

Hay varios pasos involucrados en el proceso de fabricación de la formulación casgevy específica de cada paciente, la preparación del paciente para el tratamiento y la administración de la terapia. La duración de todo el proceso variará de un paciente a otro, pero puede tardar hasta un año.

Inicialmente, los pacientes con ECF son tratados solo con plerixafor, que estimula la liberación de HSPC desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo, lo que se conoce como movilización de células madre (<sup>9</sup>), y con filgrastim y plerixafor los pacientes con TDT (<sup>11</sup>). A continuación, las células se recolectan mediante un proceso llamado aféresis y se utilizan para fabricar casgevy. Tras la recolección inicial de células, este proceso se repite durante dos o posiblemente tres días seguidos, recomendándose un objetivo de recogida total de al menos  $20\times 10^6$  células CD34+/kg para la elaboración del medicamento. Si no se obtiene suficiente cantidad de células, se requiere una recolección adicional al menos dos semanas después (<sup>12</sup>).

Para la  $\beta$ -talasemia, antes del procedimiento de aféresis, se recomienda que los pacientes reciban transfusiones de glóbulos rojos con objeto de mantener una concentración de hemoglobina (Hb) total  $\geq 11$  g/dL, y para ECF, se recomienda que los pacientes reciban intercambio de glóbulos rojos o transfusiones simples con objeto de mantener los niveles de hemoglobina S (HbS)  $< 30\%$  de la Hb total mientras se mantiene una concentración de Hb total  $\leq 11$  g/dL. Las terapias modificadoras de la enfermedad (p. ej., hidroxiurea/hidroxycarbamida, crizanlizumab, voxelotor) se deben interrumpir 8 semanas antes del inicio previsto de la movilización y el acondicionamiento <sup>(12)</sup>.

Las células recolectadas se envían a un laboratorio donde se editan genéticamente, se congelan y se devuelven una vez modificadas al proveedor de atención médica del paciente en forma de suspensión celular. Este proceso puede tardar hasta seis meses. Algunas de las células recolectadas se mantienen sin editar y se almacenan, en caso de que sea necesario un trasplante de células madre de rescate si casgevy no es viable o no surte efecto <sup>(9)</sup>. Los pacientes reciben mieloablación de la médula ósea con busulfano como agente único antes de la infusión de CTX001 para eliminar las células madre sanguíneas no editadas y hacer espacio para las nuevas <sup>(11)</sup>.

Tras la preparación previa con el acondicionamiento mieloablativo, el paciente recibe casgevy en el centro de tratamiento mediante un trasplante de células madre, que consiste en una sola infusión intravenosa cuya dosis se adapta al peso del paciente, siendo la dosis mínima recomendada de  $3 \times 10^6$  células CD34+/kg de peso corporal <sup>(12)</sup>. Cada vial de casgevy es específico para cada paciente, por lo que la cantidad de viales utilizados durante el tratamiento puede variar <sup>(9)</sup>.

La evaluación de los resultados clínicos tiene como objetivo la detección de injertos (se controla a los pacientes para determinar cuándo las células editadas comienzan a producir células sanguíneas maduras), efectos adversos, hemoglobina total, fracciones de hemoglobina en cromatografía líquida de alta resolución, expresión de células F (definida como el porcentaje de eritrocitos circulantes con niveles detectables de hemoglobina fetal), índices de hemólisis

de laboratorio, requisitos de transfusión de concentrado de glóbulos rojos y la aparición de episodios vasooclusivos en pacientes con ECF <sup>(11)</sup>.

#### **4. Los dos primeros pacientes.**

El objetivo principal de los estudios en los ensayos clínicos fue llevar a cabo un seguimiento a largo plazo durante 13 años para evaluar tanto la eficacia como la seguridad del tratamiento con CTX001. Los ensayos empezaron con dos pacientes a los que se les hizo un seguimiento de 21,5 meses para el ensayo CLIMB THAL-111 (pacientes con TDT) y de 16,6 meses para CLIMB SCD-121 (pacientes con ECF) después de la infusión de CTX001. CRISPR Therapeutics y Vertex anunciaron los datos iniciales de estos dos primeros pacientes en noviembre de 2019 <sup>(11)</sup>.

Fueron elegibles para participar en el ensayo CLIMB THAL-111 los pacientes diagnosticados con  $\beta$ -talasemia con mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas y que habían recibido transfusiones concentradas de glóbulos rojos de al menos 100 mL por kilogramo de peso corporal (o 10 unidades) por año durante los 2 años anteriores. Estos pacientes recibieron una única infusión intravenosa de CTX001. En el ensayo CLIMB SCD-121, los pacientes que cumplían con los criterios de participación incluían aquellos con un genotipo documentado de  $\beta^S/\beta^S$  o  $\beta^S/\beta^0$ , y que habían experimentado dos o más episodios vasooclusivos graves por año en los últimos 2 años. La edad de los participantes en ambos ensayos estuvo limitada a pacientes de entre 12 y 35 años <sup>(11)</sup>. Todos tuvieron un seguimiento de dos años y se les ofreció un seguimiento adicional de 13 años. Los pacientes también fueron examinados para detectar agentes infecciosos, incluidos el VIH y las hepatitis B y C, antes de iniciar el proceso <sup>(9)</sup>.

La paciente 1 era una mujer joven, de 19 años, con el genotipo  $\beta^0/\beta^+$  causante de TDT. Después de la administración de un régimen de acondicionamiento mieloablativo, se le infundió CTX001 a una dosis de  $16,6 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo. El producto CTX001 utilizado tenía una frecuencia de edición alélica de 68,9%. Tras su administración a la paciente, se mantuvieron niveles

elevados de alelos editados en las células madre de la médula ósea y en las células nucleadas de sangre periférica.

La paciente 2 era una mujer de 33 años afectada de ECF. Después del acondicionamiento mieloablativo, se le infundió CTX001 a dosis  $3,1 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo. Se utilizaron dos lotes de CTX001, uno con una frecuencia de edición alélica de 82,6% y otro de 78,7%. Después de la administración del producto, se mantuvieron altos niveles de alelos editados en células CD34+ de médula ósea y en células nucleadas de sangre periférica <sup>(11)</sup>.

### **1. Eficacia**

Los datos presentados muestran que, 18 meses después de la infusión de CTX001, la paciente con TDT era independiente de las transfusiones y tenía niveles de hemoglobina total de 14,1 g/dL, hemoglobina fetal de 13,1 g/dL y células F (eritrocitos que expresan hemoglobina fetal) del 100,0%. La edición alélica en la médula ósea fue del 78,1% a los 6 meses y del 76,1% al año (Figura 7) <sup>(11)</sup>.

Respecto a los datos de la paciente con ECF, éstos indican que nueve meses después de recibir la infusión de CTX001, la paciente estaba libre de crisis vasooclusivas, no requería transfusiones y presentaba niveles de hemoglobina total de 11,8 g/dL, con un 46,1 % de hemoglobina fetal y un 99,7 % de células F. Además, se observó una frecuencia de edición alélica del 81,4 % en la médula ósea a los seis meses <sup>(10)</sup>.

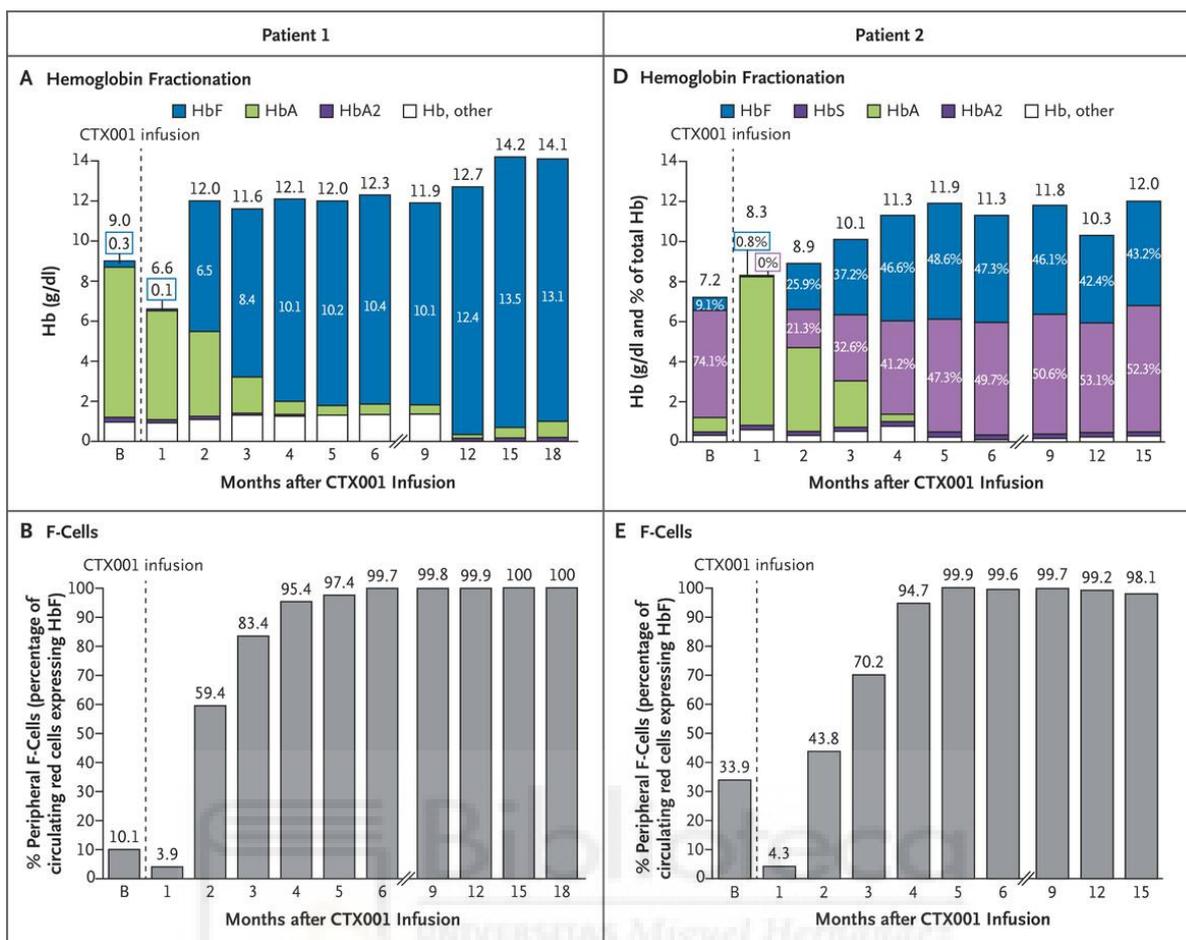
### **2. Seguridad**

Durante los 21,5 meses posteriores a la administración de CTX001, la paciente con TDT experimentó dos eventos adversos graves que comenzaron el día 13 de estudio: neumonía en presencia de neutropenia, que se resolvió el día 28, y enfermedad venooclusiva hepática con síndrome de obstrucción sinusoidal, resuelta el día 39. En el momento de la incorporación al ensayo, la paciente presentaba un bajo contenido de hierro en el corazón y el hígado, así como antecedentes de hepatitis C (inactiva al inicio del ensayo). La hepatitis viral se asocia con riesgo de enfermedad venooclusiva hepática en pacientes con  $\beta$ -

talasemia que son sometidos a trasplante de células madre hematopoyéticas y acondicionamiento con busulfano.

Tras la infusión de CTX001, la paciente con ECF sufrió tres eventos adversos graves, ninguno de los cuales se consideró relacionado con el tratamiento: sepsis en presencia de neutropenia el día 16, colelitiasis el día 49 y dolor abdominal el día 56. Afortunadamente, los tres eventos se resolvieron con el tratamiento correspondiente. Además, se observó linfopenia intermitente, con nivel bajo de gravedad, que los investigadores consideraron se debió probablemente a la recuperación tardía de los linfocitos T después de la infusión de CTX001 y que se resolvió en el día 351 del estudio. Durante los 16,6 meses de estudio, la paciente no experimentó episodios vasooclusivos, y su última transfusión de concentrados de glóbulos rojos tuvo lugar 19 días después de la infusión. Además, los índices de hemólisis, incluidos los niveles de haptoglobina, lactato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa y bilirrubina total, volvieron a la normalidad durante el seguimiento posterior a la infusión <sup>(11)</sup>.





**Figura 7.** Niveles de fraccionamiento de la hemoglobina a lo largo del tiempo para la Paciente 1 (panel A), que fue tratada para TDT, y para la Paciente 2 (panel D), que fue tratada para ECF, incluyendo representación de aductos de hemoglobina y otras variantes. Se muestran los cambios en los porcentajes de células F a lo largo del tiempo en la Paciente 1 (Panel B) y en la Paciente 2 (Panel E).

## 5. Ampliación a 44 pacientes del ensayo para la ECF

Este estudio de fase 3, en curso, tuvo como objetivo evaluar el uso de CTX001 en pacientes de 12 a 35 años con ECF grave. El punto final primario fue la ausencia de crisis vasooclusivas durante al menos 12 meses consecutivos. Para ser elegibles, los pacientes debían haber experimentado al menos dos episodios vasooclusivos por año en los dos años previos al estudio. Un total de 63 pacientes fueron inscritos, de los cuales 44 pacientes recibieron CTX001 después de acondicionamiento mieloablatoivo con busulfano. Un total de 40 pacientes (91%) tenían el genotipo  $\beta^S/\beta^S$ , 3 (7%) tenían el genotipo  $\beta^S/\beta^0$ , y 1

(2%) tenía el genotipo  $\beta^S/\beta^+$ . La mayoría de estos pacientes tenían entre 12 y 17 años y el número promedio anualizado de crisis vasooclusivas fue de 4,1, con 26 pacientes habiendo experimentado 3 o más crisis vasooclusivas por año en los 2 años previos. La tasa de hospitalización por crisis vasooclusivas graves fue de 2,7 por año, con una duración anualizada de las hospitalizaciones de 19,7 días. La dosis media de CTX001 suministrada a los pacientes fue de  $4,0 \times 10^6$  células CD34+ por kilogramo.

De los 30 pacientes tratados con CTX001 que pudieron ser evaluados para el punto final primario, 29 permanecieron libres de crisis vasooclusivas durante al menos 12 meses consecutivos. La duración media de ausencia de crisis vasooclusivas fue de 22,4 meses, y hasta la fecha de corte de los datos, 28 pacientes continuaban sin experimentar crisis vasooclusivas <sup>(13)</sup>.

### **1. Eficacia**

Después de la infusión de CTX001, se observaron incrementos tempranos y sostenidos en los niveles de hemoglobina total y fetal, y los pacientes dejaron de necesitar transfusiones de glóbulos rojos en un promedio de 20 días después de recibir la infusión. En general, el nivel promedio de hemoglobina total fue de  $11,9 \pm 1,5$  g/dL en el tercer mes y de  $12,5 \pm 1,8$  g/dL en el sexto mes (Figura 8). Posteriormente, estos valores se mantuvieron dentro de los rangos normales o cercanos a ellos (12,1 a 17,2 g/dL). Se observó estabilidad en los niveles individuales de hemoglobina en los pacientes durante todo el período de seguimiento, que se extendió hasta los 48,1 meses. Además, el porcentaje medio de hemoglobina fetal fue del  $36,9 \pm 9,0\%$  en el tercer mes, aumentó al  $43,9 \pm 8,6\%$  en el sexto mes, y se mantuvo por encima del 40% durante todo el seguimiento (Figura 8).

### **2. Seguridad**

Todos los 44 pacientes experimentaron al menos un evento adverso tras la infusión de CTX001, siendo la mayoría de grado 1 o 2 en severidad. Además, 42 pacientes experimentaron eventos adversos de grado 3 o 4, siendo los más comunes estomatitis (en el 55% de los pacientes), neutropenia febril (en el 48%), disminución del recuento plaquetario (en el 48%) y pérdida de apetito (en el

41%). La mayoría de estos eventos ocurrieron dentro de los primeros 6 meses posteriores a la infusión, sin que se observara fallo del injerto ni desarrollo de cáncer en ningún paciente. Entre los eventos clasificados como no graves, destacó un caso de enfermedad venooclusiva hepática, que no se consideró por los investigadores relacionado con la terapia con CTX001. El evento se resolvió en 12 días, sin el uso de soporte ventilatorio, diálisis o paracentesis.

Un total de 20 pacientes (45%) experimentaron eventos adversos graves, aunque ninguno estuvo relacionado con la terapia con CTX001. Además, se registró una muerte debido a insuficiencia respiratoria provocada por una infección grave de SARS-CoV-2 en un paciente que también presentaba lesiones pulmonares asociadas al busulfano y una enfermedad pulmonar preexistente. El paciente fue diagnosticado con la infección por SARS-CoV-2 en el día 71 y hospitalizado posteriormente, presentando eventos adversos graves durante su internación, considerados no relacionados con la terapia con CTX001, sino con la infección y el tratamiento con busulfano <sup>(13)</sup>.

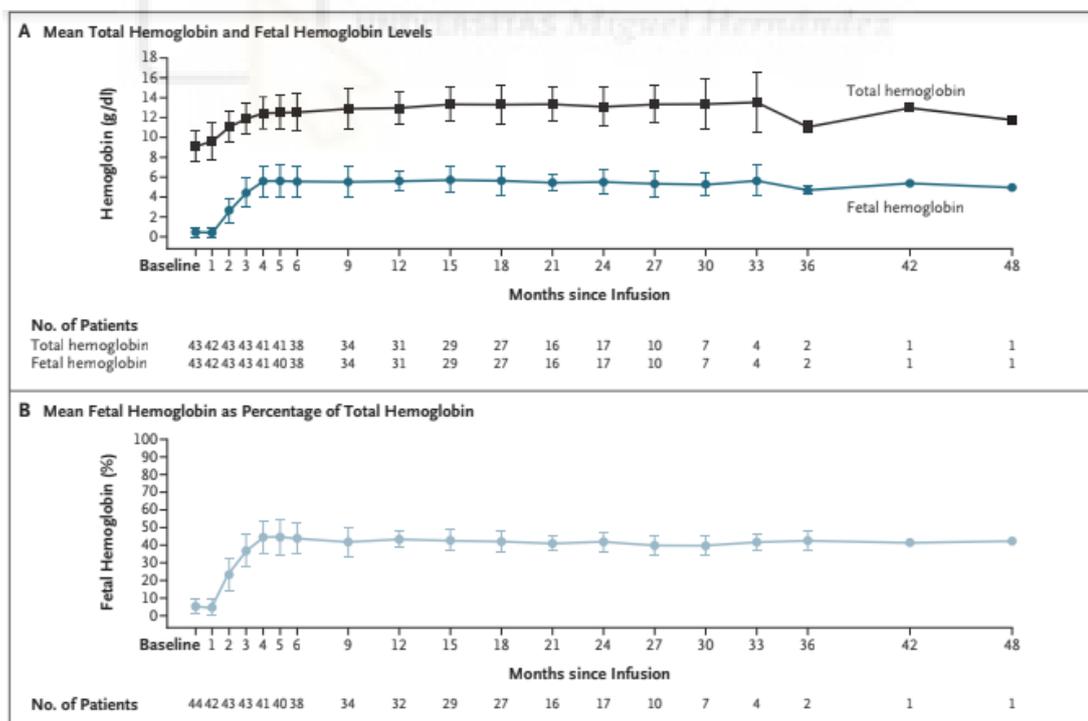


Figura 8: (A) Niveles de hemoglobina total y hemoglobina fetal a lo largo de seguimiento desde el día 1 de la infusión de CTX001. (B) Porcentaje de hemoglobina fetal respecto a hemoglobina total <sup>(13)</sup>

## **6. Ampliación a 52 pacientes del ensayo para la TDT**

El ensayo comenzó con 59 pacientes con TDT que habían iniciado la movilización de HSPC (CD34+), de los cuales 53 fueron sometidos a acondicionamiento mieloablatoivo con busulfano, recibiendo 52 de éstos infusión de CTX001. Del total, el 35% eran pacientes de entre 12 y menos de 18 años. En cuanto a los genotipos, el 60% presentó genotipos  $\beta^0/\beta^0$  o similares a éste, mientras que el 40% presentó genotipos no similares a  $\beta^0/\beta^0$ .

Todos los pacientes mostraban afección grave, como se evidenciaba por su dependencia de transfusiones de glóbulos rojos. Antes del cribado, el número anualizado medio de unidades de glóbulos rojos transfundidos fue de 35,0 unidades, con un volumen medio anualizado de 201,0 mL/kg durante un período de 2 años. La mayoría de los pacientes (81%) recibieron un ciclo de movilización con G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) y plerixafor. La dosis media de CTX001 suministrada a los pacientes fue de  $7,5 \times 10^6$  células CD34+ por kg<sup>(14)</sup>.

### **1. Eficacia**

En el momento de análisis provisional preespecificado, la media de seguimiento después de la infusión de CTX001 fue de 20,4 meses, con 14 de los pacientes completando el período de estudio de 2 años e inscribiéndose en el estudio de seguimiento a largo plazo, CLIMB-131. Los 52 pacientes en la población de análisis lograron el injerto de neutrófilos y plaquetas, con una media de tiempo hasta el injerto de 29 y 44 días, respectivamente. Los pacientes con antecedentes de esplenectomía mostraron una recuperación más rápida de neutrófilos y plaquetas que aquellos con el bazo intacto.

Después de la infusión de CTX001, 32 de 35 pacientes con al menos 16 meses de seguimiento alcanzaron el objetivo primario de independencia de transfusión durante al menos 12 meses continuados, así como el objetivo secundario de tener un nivel medio de hemoglobina ponderado de al menos 9 g/dL sin transfusión de glóbulos rojos durante al menos 6 meses. Estos pacientes dejaron de necesitar transfusiones de glóbulos rojos en un promedio de 35,2 días

después de la infusión de CTX001 y mantuvieron la independencia de transfusiones durante un promedio de 22,5 meses de seguimiento<sup>(14)</sup>.

Entre los 52 pacientes tratados con CTX001, 48 de ellos (92%) dejaron de necesitar transfusiones de glóbulos rojos, permaneciendo libres de transfusiones durante un período que varió de 0,3 a 45,1 meses después de 60 días de la última transfusión. De los cuatro pacientes que no lograron independencia de transfusión, tres tenían menos de 3 meses de seguimiento. Estos tres pacientes compartieron características similares a los que cumplieron con el objetivo primario del estudio, como la exposición sistémica al busulfano, el número de ciclos de movilización, la dosis celular y la edición alélica en las células nucleadas de sangre periférica y en las células CD34+ de la médula ósea. En la última revisión de datos hasta el 16 de abril de 2023, los resultados fueron consistentes con los análisis previos, y estos tres pacientes dejaron de recibir transfusiones de glóbulos rojos durante períodos que oscilaron entre 2,8 y 10,3 meses.

Después de la infusión de CTX001, se observaron aumentos tempranos y sostenidos en los niveles de hemoglobina total y hemoglobina fetal, lo que coincide con la independencia de transfusión lograda. En general, entre los pacientes, la hemoglobina total mostró un promedio de  $11,4 \pm 2,2$  g/dL en el tercer mes y se mantuvo en 12 g/dL o más a partir del sexto mes hasta el final del seguimiento. Por su parte, la hemoglobina fetal promedió  $7,7 \pm 2,9$  g/dL en el tercer mes y permaneció en 10 g/dL o más desde el sexto mes hasta el final del seguimiento (Figura 9). Aquellos que lograron la independencia de transfusión alcanzaron un promedio de  $13,1 \pm 1,4$  g/dL de hemoglobina total y 11,9 g/dL de hemoglobina fetal, con una distribución pancelular de al menos el 94% de los glóbulos rojos conteniendo hemoglobina fetal a partir del mes 6 (Figura 9). Estos incrementos fueron consistentes en todos los subgrupos según la edad, genotipo, sexo y raza. En contraste, los tres pacientes con menos de 3 meses de seguimiento que no habían logrado inicialmente la independencia de transfusión experimentaron aumentos más lentos y bajos en los niveles de hemoglobina fetal y total. En el corte de datos del 16 de abril de 2023, con 3

meses adicionales de seguimiento, estos tres pacientes mostraron niveles de hemoglobina total y fetal estables o mejorados.

La edición alélica en el locus *BCL11A* se detectó en glóbulos rojos periféricos un mes después de la infusión de CTX001, manteniéndose estable por encima del 64% hasta el final del seguimiento. En la médula ósea, alrededor del  $78,0 \pm 11.6\%$  de los alelos del gen *BCL11A* estaban editados al mes 6 y se mantuvieron estables. Estos porcentajes fueron similares entre los pacientes de la población de eficacia primaria, incluidos aquellos que no lograron la independencia de transfusión.

La producción de glóbulos rojos, evaluada mediante la relación entre células mieloides y eritroides (M:E), mostró mejoras tras la infusión de CTX001. Entre los 15 pacientes con datos disponibles a los 24 meses de la infusión, la media de M:E en la médula ósea aumentó de  $0,62 \pm 0,45$  al inicio a  $0,81 \pm 0,42$  a los 24 meses. En pacientes con  $\beta$ -talasemia dependiente de transfusiones, la M:E suele ser inferior a 0,1 en ausencia de transfusiones, aumentando hacia un rango normal de 1,2 a 5 durante el soporte transfusional a largo plazo. El incremento en la relación M:E a los 24 meses de iniciado el tratamiento, combinado con la independencia de transfusión, indica una reducción de la eritropoyesis ineficaz <sup>(14)</sup>.

## **2. Seguridad**

Se experimentaron eventos adversos graves en 17 pacientes, siendo la enfermedad venooclusiva hepática la más común (en 5 pacientes), relacionada con el acondicionamiento con busulfano. Este evento ocurrió entre los días 13 y 32 después de la infusión, resolviéndose tras tratamiento con defibrotide sin necesidad de soporte ventilatorio o diálisis. Antes del desarrollo de la enfermedad venooclusiva hepática, todos los pacientes habían recibido o estaban recibiendo profilaxis con ácido urxodeoxicólico, con defibrotide o con ambos a partir del momento del acondicionamiento con busulfano.

Dos pacientes mostraron eventos graves relacionados con CTX001. Uno presentó dolor de cabeza, síndrome de dificultad respiratoria aguda y neumonía idiopática (esto último también considerado relacionado con el busulfano). Todos

estos eventos dentro del contexto de linfocitosis hemofagocítica, que comenzó dentro de los 32 días después de la infusión de CTX001 y se resolvió. El otro paciente experimentó retraso en el injerto y trombocitopenia, también considerados por los investigadores relacionados con el busulfano, que remitieron. Además, un paciente sufrió hemorragias cerebelosa y subaracnoidea, atribuidas al busulfano y no a CTX001. Estas hemorragias ocurrieron en el día 21 antes del injerto de plaquetas y durante el período temprano después del acondicionamiento mieloablativo. No se reportaron muertes, interrupciones ni cánceres después de la infusión de CTX001 <sup>(14)</sup>.

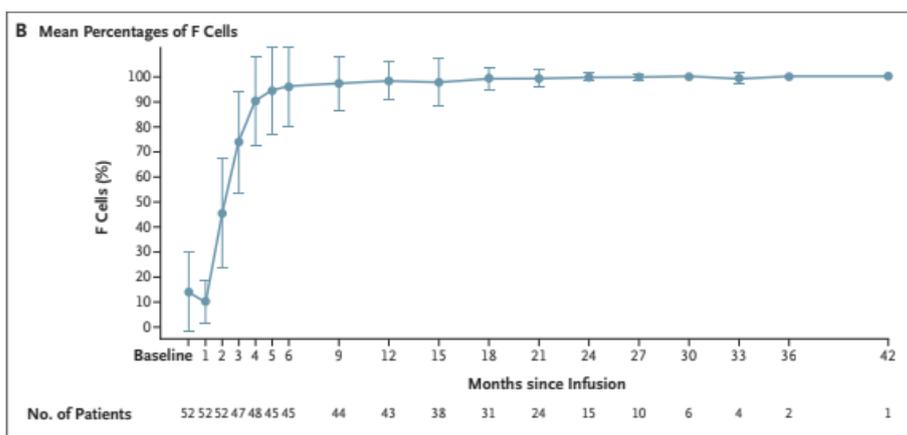
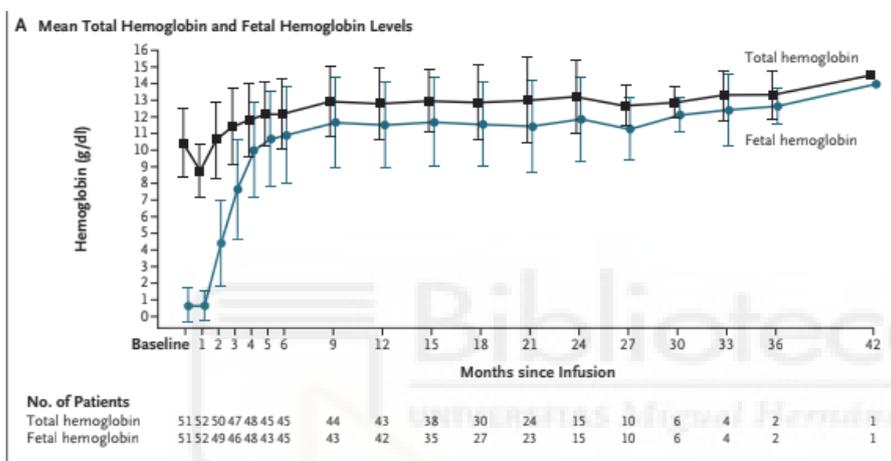


Figura 9: (A) Niveles de hemoglobina total y hemoglobina fetal durante el seguimiento desde el día 1 de la infusión de CTX001. (B) Porcentaje de células F (porcentaje de glóbulos rojos con hemoglobina fetal) <sup>(14)</sup>.

## **7. Limitaciones y aprobación de casgevy**

Los resultados de este estudio son alentadores. La estrategia desarrollada ha resultado en el primer medicamento de terapia génica aprobado en humanos mediante edición de genes con el sistema CRISPR/Cas9, habiendo mostrado en los ensayos clínicos su potencial curativo para enfermedades genéticas graves como la ECF y la TDT. Sin embargo, a pesar de los beneficios observados en los pacientes y la demostración de su viabilidad y seguridad, el tratamiento presenta algunas limitaciones.

Los pacientes que participaron en los ensayos clínicos con CTX001 experimentaron un tiempo medio de injerto de plaquetas más prolongado en comparación con los trasplantes de HSPC convencionales. Esta demora puede aumentar el riesgo de hemorragias hasta que se establezca el injerto de plaquetas. Por lo tanto, es importante monitorear a todos los pacientes para buscar signos de hemorragia y para evaluar los recuentos de plaquetas hasta que se complete el proceso de injerto <sup>(12) (13) (14)</sup>.

Una preocupación potencial en las terapias de edición génica es la posibilidad de que la tecnología pueda modificar inadvertidamente secciones no deseadas del genoma, distintas al gen diana, riesgo que no puede descartarse tras la infusión con CTX001. Sin embargo, hasta el momento, no se han observado tales modificaciones en los estudios realizados con células de donantes sanos o de pacientes <sup>(9)</sup>.

Otras limitaciones del estudio incluyen el tiempo de seguimiento, ya que se requiere un período más prolongado, de 10 a 20 años, para comprender completamente el efecto de esta terapia génica. Además, el ensayo se llevó a cabo con un número reducido de pacientes en cada subgrupo, lo que dificulta una evaluación exhaustiva de la terapia, especialmente en enfermedades raras.

Por otro lado, aunque el pretratamiento mieloablativo con busulfano fue efectivo para lograr el injerto, también conllevó toxicidad. La mayoría de los efectos adversos estuvieron relacionados con el acondicionamiento con busulfano.

CTX001 se comercializa con el nombre de casgevy. Fue aprobado por primera vez en el Reino Unido, en noviembre de 2023, donde puede usarse para pacientes con ECF mayores de 12 años que necesitan un trasplante de células madre hematopoyéticas, pero no tienen un donante disponible, y presentan crisis vasooclusivas recurrentes, y para el tratamiento de TDT. La EMA (European Medicines Agency) de la Unión Europea emitió un informe favorable para las dos enfermedades el 14 de diciembre de 2023 y la aprobación definitiva de comercialización el 9 de febrero de 2024. La FDA (Food and Drug Administration) de EE.UU. aprobó casgevy para la ECF en diciembre de 2023 y para la TDT en enero de 2024 <sup>(9)</sup>.



## 6. DISCUSIÓN

En este trabajo, se presenta la utilización de la edición genética mediante CRISPR/Cas9 para tratar dos enfermedades hereditarias graves: la  $\beta$ -talasemia dependiente de transfusión (TDT) y la enfermedad de células falciformes (ECF). Tras la administración de CTX001, ambos grupos de pacientes experimentaron aumentos tempranos, significativos y sostenidos en los niveles de hemoglobina fetal. Respecto a los pacientes con ECF, la mayoría permanecieron libres de crisis vasooclusivas durante un período promedio de 22,4 meses después de recibir el tratamiento, junto con mejoras en los marcadores de hemólisis. Los pacientes con TDT mostraron mejoras en las medidas de sobrecarga de hierro y en los biomarcadores de la médula ósea para la eritropoyesis, indicando una reducción en la eritropoyesis ineficaz.

La infusión de CTX001 también mejoró la calidad de vida de los pacientes, como lo indicaron las mejoras en las puntuaciones de los resultados reportados por los pacientes y en el dolor y bienestar general. Además, la durabilidad del tratamiento quedó respaldada por la estabilidad de la edición alélica en el locus *BCL11A*, con porcentajes consistentes de alelos editados tanto en la sangre periférica como en la médula ósea. Aunque algunos pacientes experimentaron eventos adversos relacionados con el tratamiento, el perfil de seguridad fue en su mayoría consistente con el acondicionamiento mieloablativo y el trasplante autólogo de HSPC.

Los hallazgos del seguimiento de los pacientes iniciales tratados con CTX001 indican una edición exitosa de *BCL11A* mediante CRISPR/Cas9 en células madre hematopoyéticas a largo plazo. Esto se ha asociado con un injerto duradero, niveles elevados de hemoglobina fetal y la ausencia de episodios vasooclusivos o la necesidad de transfusiones. Los resultados preliminares aquí presentados respaldan la continuación de la investigación del sistema de edición genética CRISPR/Cas9 para el tratamiento de enfermedades genéticas.

En general, CTX001 ha demostrado ser una opción terapéutica efectiva y segura tanto para pacientes con TDT como para aquellos con ECF, que han evidenciado

mejoras significativas en la independencia de transfusiones, los niveles de hemoglobina y la calidad de vida <sup>(12)</sup> <sup>(13)</sup> <sup>(14)</sup>.



## 7. CONCLUSIONES

Con todo lo anteriormente expuesto, después de haber revisado los artículos seleccionados y analizar la actual evidencia sobre el uso de la terapia génica como tratamiento de reciente aprobación para las enfermedades hereditarias anemia falciforme o enfermedad de células falciformes (ECF) y  $\beta$ -talasemia dependiente de transfusión (TDT), se concluye que:

- A día de hoy, casgevy es el primer medicamento aprobado para el tratamiento de enfermedades que se basa en el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9.
- Hay eficacia clínica demostrada de casgevy en el tratamiento de la ECF y la TDT. Los resultados de los ensayos clínicos muestran mejoras significativas en la producción de hemoglobina fetal y células sanguíneas sanas, así como en la reducción de los síntomas asociados a estas enfermedades.
- Respecto a su seguridad, la terapia ha sido bien tolerada por los pacientes, con efectos secundarios generalmente leves y transitorios. No se han observado efectos adversos graves específicamente relacionados con el tratamiento con casgevy.
- La persistencia de los efectos a largo plazo muestra una mejora sostenida en la producción de células sanguíneas saludables y una reducción en la necesidad de transfusiones de sangre durante un período de seguimiento prolongado después del tratamiento.
- La disponibilidad de una terapia efectiva para la anemia falciforme y la  $\beta$ -talasemia tiene un impacto significativo tanto a nivel clínico como social, mejorando la calidad de vida de los pacientes y ofreciendo esperanza de un tratamiento efectivo y prolongado a quienes padecen estas enfermedades genéticas.

Estas conclusiones destacan la eficacia, seguridad y el potencial terapéutico de Casgevy en el tratamiento de la anemia falciforme y la  $\beta$ -talasemia mayor, lo que representa un avance significativo en el campo de la medicina genética y la hematología.

## 8. BIBLIOGRAFÍA:

1. Barbarani G, Łabedz A, Ronchi AE. B-hemoglobinopathies: The test bench for genome editing-based therapeutic strategies. *Front Genome Ed* [Internet]. 2020 [cited 2024 May 14]; 2.Cnbcolombia.org. [cited 2024 May 18].
2. Cnbcolombia.org. [cited 2024 May 18].
3. Wilber A, Nienhuis AW, Persons DA. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. *Blood* [Internet]. 2011 [cited 2024 May 14];117(15)
4. Sankaran VG, Orkin SH. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2013 [cited 2024 May 14]
5. Beta thalassemia [Internet]. Medlineplus.gov. [cited 2024 May 14].
6. Anemia Falciforme Fique por dentro [Internet]. Comunidades.net. [cited 2024 May 20].
7. Rattananon P, Anurathapan U, Bhukhai K, Hongeng S. The future of gene therapy for transfusion-dependent beta-thalassemia: The power of the Lentiviral vector for genetically modified hematopoietic stem cells. *Front Pharmacol* [Internet]. 2021 [cited 2024 May 12];12.
8. Zhang H, Qin C, An C, Zheng X, Wen S, Chen W, et al. Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer. *Mol Cancer* [Internet]. 2021;20(1).
9. Shapiro L. Casgevy (exagamglogene autotemcel) for sickle cell disease [Internet]. *Sickle Cell Disease News*. 2023 [cited 2024 May 12].
10. Shapiro L. Casgevy (exagamglogene autotemcel) for sickle cell disease [Internet]. *Sickle Cell Disease News*. 2023 [cited 2024 May 12].

11. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen Y-S, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2024;384(3):252–60
12. Europa.eu. [cited 2024 May 11].
13. Frangoul H, Locatelli F, Sharma A, Bhatia M, Mapara M, Molinari L, et al. Exagamglogene autotemcel for severe sickle cell disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2024;390(18):1649–62
14. Locatelli F, Lang P, Wall D, Meisel R, Corbacioglu S, Li AM, et al. Exagamglogene autotemcel for transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2024;390(18):1663–76.

