



**Universidad de Valladolid**

**Facultad de Enfermería**

**GRADO EN ENFERMERÍA**

# **PRINCÍPIOS DE TERAPIA GÉNICA**

**Autora: Naiara Reverter Velasco**

**Tutor: Alfredo Moreno Díaz-Calderón**

**RESUMEN:**

Podríamos definir la terapia génica como la introducción de un gen foráneo en el ser humano con fines terapéuticos. La terapia génica comenzó a ser utilizada en el ser humano a principios de los años 90 y en los últimos años ha empezado a dar sus frutos. Se trata de un tratamiento principalmente experimental, aunque ya han comenzado a comercializarse algunos de sus productos. Este campo de la investigación ha generado y aún genera mucha controversia, generalmente por incompreensión de los principios en que se fundamenta. La única terapia génica admitida hoy en día es la que afecta a las células de la línea somática del paciente, y no presenta otros problemas éticos que los de cualquier terapia convencional, teniendo en cuenta que aún se encuentra en fase experimental. La modificación de la línea germinal, hoy estrictamente prohibida, sí que plantearía problemas éticos nunca antes presentados y quizá podría conducirnos a la eugenesia. En este sentido, la edición de genes mediante el nuevo sistema CRISPR/Cas9 puede dejar obsoletos los métodos de modificación génica utilizados hasta ahora y dar paso a una verdadera revolución para la que habrá que estar preparados.

**Palabras clave:** enfermedades genéticas, terapia génica, vector, edición de genes.

**ÍNDICE:**

1. Introducción	Pág. 1
2. Justificación	Pág. 2
3. Objetivos	Pág. 2
4. Metodología	Pág. 3
5. Marco Teórico	Pág. 4
a. Cómo es el gen que se introduce	Pág. 4
b. Terapia génica somática	Pág. 5
c. Terapia génica germinal	Pág. 6
d. Enfermedades que pueden tratarse	Pág. 6
e. Técnicas utilizadas en la transferencia de genes:	Pág. 8
i. Terapia génica <i>ex vivo</i>	Pág. 8
ii. terapia génica <i>in vivo</i>	Pág. 9
f. Métodos de transferencia de genes	Pág. 10.
i. Métodos de transducción: vectores virales	Pág. 12.
ii. Métodos de transfección: vectores no virales	Pág. 13.
iii. Ventajas e inconvenientes de unos y otros	Pág. 13.
g. Edición de genes: CRISPR/Cas9	Pág. 15.
h. Terapia génica en la actualidad	Pág. 16
i. Terapia génica en el mundo	Pág. 17.
ii. Terapia génica en España	Pág 18
iii. Protocolos de terapia génica comercializados:	Pág. 18
i. Marco regulatorio de los protocolos de terapia génica en España.	Pag 20.
j. Problemas éticos que presenta la terapia génica	Pag 21.
6. Conclusiones	Pag 22.
7. Bibliografía	Pag 23.
8. Anexos	

## 1.-INTRODUCCIÓN:

Desde que a mediados de los años 70 surgieron las técnicas del DNA recombinante, se contempló la posibilidad de introducir genes en seres humanos con fines terapéuticos, es decir realizar terapia génica.

El primer protocolo autorizado de transferencia génica en el ser humano, no tenía fines terapéuticos, ya que simplemente se introdujo un gen marcado y fue realizado en mayo de 1989. En septiembre del año 1990, se realizó el primer protocolo con fines terapéuticos por los doctores Anderson, Blaese y Culver, de la Keck School of Medicine (University of Southern California)<sup>1</sup>, en el cual se pretendía la introducción del gen de la adenosín deaminasa (ADA) en los linfocitos de un paciente afectado del Síndrome de Inmunodeficiencia Combinada Grave (SCID), causado en este caso por la deficiencia congénita del enzima adenosín deaminasa, lo que provoca la muerte de los linfocitos T y la consiguiente inmunodeficiencia. Tras estos primeros ensayos han seguido otros muchos, en Estados Unidos y otros países.

Desde un punto de vista laxo y realista podemos definir la terapia génica como la introducción de un gen con fines terapéuticos en algunas de las células somáticas de un ser humano, estando estrictamente prohibida la modificación genética de la línea germinal. El gen terapéutico introducido coexistirá con el mutado en el paciente, por lo que este tratamiento estaría indicado para enfermedades recesivas. Las enfermedades dominantes podrían tratarse inactivando además el gen dominante mutado, haciendo el tratamiento mucho más complejo. Al menos hasta el momento, ya que actualmente puede ser más fácil mediante los métodos de edición de genes.

En un principio, la terapia génica estaba dirigida al tratamiento de enfermedades genéticas simples (monogénicas). Sin embargo, en la actualidad, los protocolos dirigidos al tratamiento de estas enfermedades solo suponen alrededor de un 10% de los totales que se llevan a cabo en el mundo, mientras que un 65% de los protocolos se dirigen al tratamiento del cáncer y otras enfermedades genéticas complejas, que dependen de más de un gen y de factores ambientales (Fig.2). En estos casos, lo que se pretende es que el gen terapéutico introduzca una ventaja en la lucha contra la enfermedad. Incluso un 8% de los protocolos se dirigen al tratamiento de enfermedades infecciosas, que pueden

considerarse enfermedades genéticas adquiridas, siendo el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) una de las principales dianas.

Una razón para este desplazamiento en el tipo de enfermedades tratadas, es el interés social y económico, ya que existe un mayor número de pacientes afectados de cáncer y otras enfermedades genéticas complejas y adquiridas que por enfermedades monogénicas.

Los comienzos de la terapia génica no fueron tan fáciles como en un principio cabía esperar. Pasaron años de fracasos y reveses antes de que llegaran los primeros éxitos, que finalmente han empezado a acumularse (Anexo 5). Los avances en terapia celular unidos a la terapia génica están contribuyendo a estos éxitos. Los métodos de edición de genes, y sobre todo las nuevas técnicas basadas en el sistema CRISPR/Cas9 impulsarán nuevos avances, y se hará necesario meditar sobre sus implicaciones éticas.

Recientemente se han conseguido importantes logros dentro de este campo de investigación<sup>2</sup>, como por ejemplo: la eliminación del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) mediante el sistema de edición de genes CRISPR/Cas9<sup>3</sup>, la corrección de la  $\beta$ -Talasemia en células pluripotentes mediante este mismo sistema<sup>4</sup>, o la obtención de grandes mejoras en pacientes con síndrome de Wiskottt-Aldrich severa<sup>5</sup>.

### **3.-JUSTIFICACIÓN:**

La Terapia Génica es un campo que se mantiene principalmente en el terreno experimental y que suscita controversia, generalmente producida por desconocimiento del tema. Los éxitos que empiezan a acumularse, los avances en terapia celular y los recientes descubrimientos sobre la edición de genes, que pronostican un auge de la terapia génica justifican la necesidad de conocer los fundamentos de estos tratamientos para lograr una mejor comprensión y atención de los futuros pacientes.

### **4.-OBJETIVOS:**

Conocer los fundamentos de la Terapia Génica para lograr una mejor comprensión y atención del paciente.

## 5.-METODOLOGÍA:

Este trabajo intenta realizar un acercamiento a la terapia génica, y al papel de la enfermería en este campo, a través de una revisión bibliográfica de la literatura científica publicada.

Este trabajo se instrumentaliza con una revisión y búsqueda de información relacionada con el tema, en revistas especializadas, libros y búsquedas en internet. Se han utilizado las bases de datos más habitualmente utilizadas en ciencias de la salud, y en concreto en enfermería como:

- PUBMED/MEDLINE (US NLM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>), EMBASE (<http://www.embase.com>).
- COCHRANE LIBRARY (denominada en español Cochrane Library Plus: <http://www.updatesoftware.com/clibplus.htm>; accesible también desde portales como el centro Cochrane Iberoamericano: <http://www.cochrane.es>), CINAHL (Cumulative Index to Nursing & Allied Health).
- CUIDEN (Base de datos de la Fundación Índex, que incluye la producción científica de la enfermería española e iberoamericana: <http://www.index-f.com/new/acceso.php>).
- CUIDATGE (Base de datos de la Universidad de Rovira i Virgili: <http://teledoc.urv.es/cuidatge/>).
- DIALNET (Base de datos de la Universidad de la Rioja: <http://dialnet.unirioja.es/>).
- BDIE (Base de datos para la investigación en enfermería, creada por el Instituto de Salud “Carlos III”: [http://bdie.isciii.es/buscador\\_BDIE.htm](http://bdie.isciii.es/buscador_BDIE.htm)).
- Google Académico (<https://scholar.google.es/>).

He utilizado la base de datos de la Organización Mundial de la Salud (<http://www.who.int/es/>), de la Asociación Española de Terapia Génica y Celular (<http://www.setgyc.es/>) y del Ministerio de Sanidad de España. (<http://www.msssi.gob.es/>).

Las palabras claves para la búsqueda han sido: “enfermedades genéticas” (genetic diseases), “terapia génica” (gene therapy), “vector”, “edición de genes” (gene edition), “gene” (gene) y “CRISPR”.

Su límite temporal se ha estimado en artículos publicados desde el 2005 hasta abril del 2016, fundamentalmente, sin perjuicio de algún texto anterior a estas fechas, digno de reseñar por su importancia y relevancia sobre el caso que nos ocupa.

## **6.-MARCO TEÓRICO:**

### **A.-CÓMO ES EL GEN QUE SE INTRODUCE:**

Como ya se ha dicho, la terapia génica consiste en la introducción de un gen foráneo en el ser humano con fines terapéuticos. Un gen humano está formado por intrones (zonas que no codifican para un RNA maduro), exones (zonas que codifican para un RNA maduro) y por las zonas reguladoras de su transcripción, lo que confiere al gen un tamaño demasiado grande para ser manipulado fácilmente mediante las técnicas convencionales, haciendo prácticamente imposible su utilización en terapia génica.

El RNA precursor, que se produce a partir de un gen y lleva su información, se procesa para producir un RNA maduro (mRNA). Este mRNA carece de intrones y de las zonas reguladoras de la transcripción, teniendo un tamaño mucho más pequeño. A partir de él y mediante la enzima transcriptasa inversa, se puede producir una copia de DNA (DNA complementario, cDNA), que contiene la información para la producción de la proteína correspondiente (Fig. 1)<sup>6</sup>.

A este DNA se le debe añadir una secuencia promotora sencilla (de un virus, por ejemplo), que será la encargada de hacer que el “gen” se exprese. Este conjunto será lo que denominamos “casette de expresión” y lo introduciremos en un vector que servirá para introducirlo en las células diana, como se explicará más adelante.

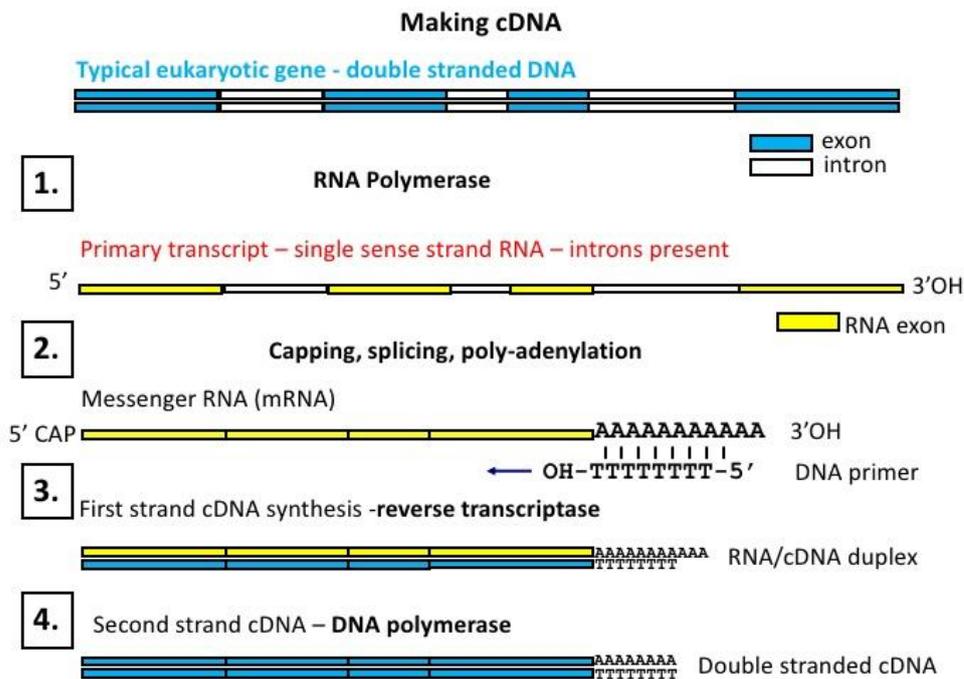


FIGURA 1 CONSTRUCCIÓN DE UN CDNA.

GENOMICS LECTURE 3. SLIDESHARE.NET. 2016 [CITED 15 JUNE 2016]. AVAILABLE FROM: [HTTP://WWW.SLIDESHARE.NET/IAINJ88/GENOMICS-LECTURE-3](http://www.slideshare.net/IAINJ88/GENOMICS-LECTURE-3)

Para poder realizar un protocolo de terapia génica, será necesario disponer del gen terapéutico y de un vehículo para transferir de dicho gen a las células diana (vector). No deberá existir una terapia convencional disponible.

En función del tipo de células diana, la terapia génica la podríamos dividir en:

**B.-TERAPIA GÉNICA SOMÁTICA:**

Es la terapia génica que se dirige a las células somáticas, es decir, a aquellas células que no son gametos (espermatozoides u óvulos) ni sus precursores. Las modificaciones genéticas que sufran no serán transmitidas a la descendencia y solo afectarán al individuo tratado<sup>7</sup>. Esta terapia es la única legalmente permitida en la actualidad.

Este tipo de terapia no presenta otra problemática que la de otros tratamientos médicos convencionales. Teniendo en cuenta que está en fase experimental, tras consentimiento

informado del paciente, debe tratar de aplicarse en caso de que no exista otro tratamiento disponible.

### C-TERAPIA GÉNICA GERMINAL

Este tipo de terapia se dirige hacia los gametos (espermatozoides y óvulos) y sus precursores o hacia los embriones. Su objetivo principal es la modificación permanente del genoma, por lo que estos cambios serán transmisibles a la descendencia<sup>7</sup>.

Este tipo de terapia sería la más indicada para corregir de manera definitiva las enfermedades hereditarias, pero en humanos presenta muchos interrogantes. Cualquier alteración, incluso negativa, que se produzca durante la modificación génica afectará a toda la línea de descendencia, la cual no ha tenido la oportunidad elegir dicho cambio, sino que se le ha impuesto. Por otra parte, este tratamiento podría llevarnos directamente a la eugenesia.

### D.-ENFERMEDADES QUE PUEDEN TRATARSE:

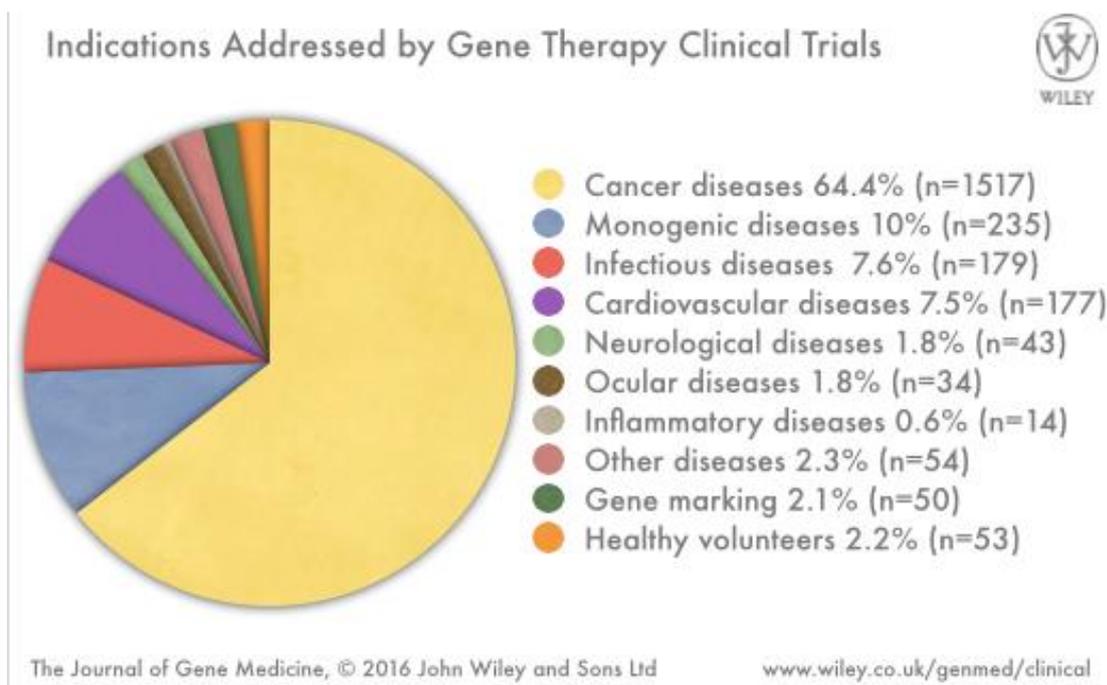


FIGURA 2: ENFERMEDADES TRATADAS MEDIANTE TERAPIA GÉNICA. FUENTE: [HTTP://WWW.WILEY.COM//LEGACY/WILEYCHI/GENMED/CLINICAL/](http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/)

Actualmente, la enfermedad en la que se realizan más protocolos de terapia génica es el cáncer (64'4%) (Fig. 2), seguida, en menor medida, de las enfermedades monogénicas y las infecciosas (Anexo 3).

El cáncer se trata de una enfermedad multifactorial, en la que además de posibles alteraciones genéticas innatas, se producen mutaciones en una serie de genes, interviniendo factores ambientales como estilo de vida, etc. Muchos genes son los que pueden estar implicados, pero podemos diferenciarlos en oncogenes y genes supresores de tumores.

Los protooncogenes son genes normales que intervienen en la proliferación celular, pero que pueden sufrir mutaciones dando lugar a oncogenes que provoquen la transformación de las células normales en cancerosas. Los genes supresores de tumores son aquellos que inhiben la proliferación celular por lo que su mutación puede dar lugar a procesos tumorales. El cáncer se produce por la acumulación de alteraciones en estos genes.

Existen diferentes estrategias que se utilizan en la actualidad para combatir el cáncer: inducir una respuesta inmune frente a las células tumorales, inducir la muerte de las células tumorales, introducir genes supresores de tumores, suprimir la angiogénesis o la utilización de virus oncolítico<sup>8</sup>.

El gen p53 es el gen supresor de tumores que más se transfiere en los protocolos de terapia génica contra el cáncer, normalmente combinado junto con quimioterapia o radioterapia. Aunque también existen otros, como el BRCA-1, FUS-1 y la endostatina utilizados en protocolos para el tratamiento del cáncer<sup>9</sup>.

Las enfermedades monogénicas son aquellas en las que la mutación en un gen da lugar a una enfermedad. Dentro de este grupo se encuentran enfermedades como la hemofilia B, la fibrosis quística, la anemia de Fanconi, etc.

Si la enfermedad se produce por un gen dominante, la estrategia a seguir consistirá en la anulación de la expresión del gen defectuoso, lo cual sería dificultoso, pero que podría ser una estrategia factible debido a los métodos de edición de genes. En cambio, si la patología se basa en la expresión de un gen recesivo, la metodología sería más simple, y podría consistir en la introducción del gen que sintetizará la proteína deficitaria.

Los Institutos Nacionales de la Salud (National Institutes of Health, NIH) de Estados Unidos comenzaron en los años 90, los primeros ensayos de terapia génica con enfermedades como las inmunodeficiencias combinadas graves asociadas a la mutación en los genes adenosina deaminasa (ADA)<sup>1</sup>.

Más tarde se trató la SCID-X1 (inmunodeficiencia grave ligada al cromosoma X), donde se ha conseguido una persistencia inmunológica tras la terapia génica en 17 de 20 niños que formaron parte del estudio<sup>10</sup>.

Dentro de las enfermedades infecciosas, los protocolos de terapia génica se centran en el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), lográndose avances en su tratamiento<sup>11</sup>.

### **E.-TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA TRANSFERENCIA DE GENES:**

Las terapias génicas pueden clasificarse también en función de la forma en la que se va a introducir en las células diana el nuevo gen. Podemos decir que existen dos tipos: las técnicas *ex vivo* e *in vivo* (Fig. 3).

#### **E.1.-Transferencia *ex vivo*:**

Primeramente, se extraen las células a tratar del paciente, se cultivan y activan, si es posible, para que se dividan, y se las somete a un tratamiento *in vitro* en el que se realiza la transferencia génica con el vector deseado (viral o no viral). Posteriormente se reintroducen en el paciente como si fuera un trasplante autólogo. Las células que se escogen para cultivar deben de poder ser de fácil extracción y reimplantación, como por ejemplo las células de la sangre.

Con este método se disminuye el riesgo de efectos secundarios, como la toxicidad producida por la expresión ectópica del gen terapéutico<sup>12</sup>. Habrá que tener en cuenta el posible riesgo de infecciones y contaminaciones que conlleva el extraer células y manipularlas.

### E.2.-Transferencia *in vivo*:

Consiste en la introducción directa del material genético en el organismo, sin que haya una extracción o manipulación de células previa. El gen terapéutico se transporta a las células diana vía sistémica, generalmente a través de la circulación sanguínea, con la ayuda de un vector adecuado<sup>13</sup>.

Su ventaja principal es su mayor sencillez respecto a las demás técnicas. Sin embargo, esta técnica supone la dilución del vector en la totalidad del organismo, pudiendo modificarse tanto a las células diana como al resto de células, disminuyendo su eficacia. Habrá que prestar especial cuidado para no modificar las células de la línea germinal.

Una modalidad de este tipo de técnicas es la terapia génica *in situ*, que se produce cuando el transgen se introduce directamente en el propio órgano afectado. Por ejemplo, al inyectar el gen terapéutico en el músculo en el caso de la distrofia muscular de Duchenne.

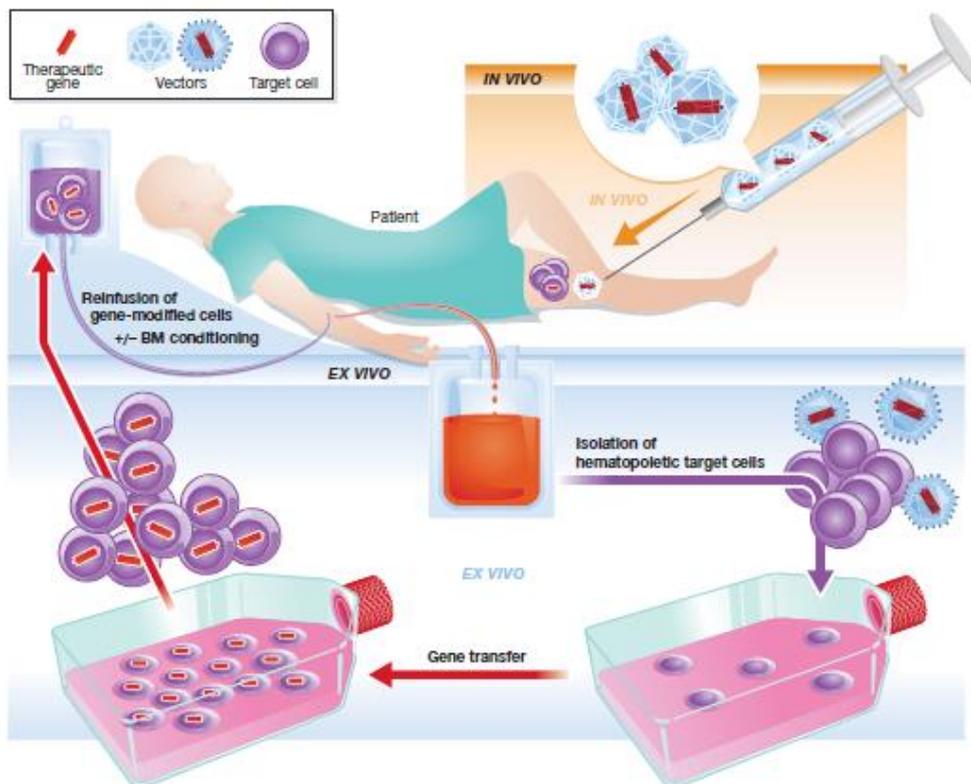


FIGURA 3 DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS *IN VIVO* Y *EX VIVO*.

KAUFMANN K, BÜNING H, GALY A, SCHAMBACH A, GREZ M. GENE THERAPY ON THE MOVE. *EMBO MOLECULAR MEDICINE*. 2013; 5:1642-1661.

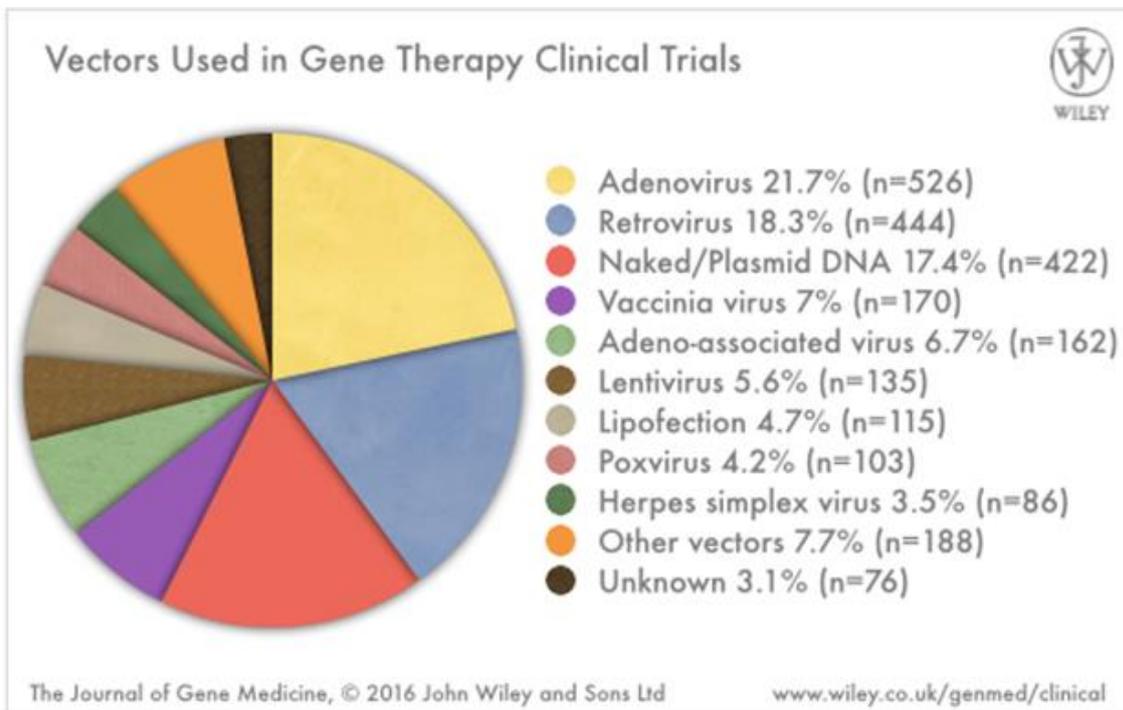
## F.-MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GÉNICA:

En los protocolos de terapia génica, es necesario que el gen terapéutico sea transportado por un vehículo: el vector.

Un “vector ideal” vendría descrito por las siguientes características<sup>14</sup>:

- Fácil de preparar, es decir, que sea reproducible fácilmente y que permanezca estable.
- Capaz de contener la mayor cantidad posible de material genético.
- Que pueda introducir el gen tanto en células en división como quiescentes.
- Producir una modificación persistente a lo largo del tiempo
- No producir toxicidad en el paciente ni generar una respuesta inmune.
- Estar dotado de elementos que puedan regular la expresión del gen.

Este “vector ideal” aún no existe en la actualidad. Prueba de ello es la gran cantidad de vectores distintos que se utilizan. (Fig. 4). Estos vectores se dividen en dos tipos principales: vectores virales y vectores no virales.



**FIGURA 4 VECTORES UTILIZADOS EN TERAPIA GÉNICA.**

FUENTE: [HTTP://WWW.WILEY.COM//LEGACY/WILEYCHI/GENMED/CLINICAL/](http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/)

Actualmente, más de un 67% de los métodos de transferencia utilizan vectores virales, siendo los más utilizados los derivados de adenovirus y retrovirus. También existen vectores no virales con los que se están realizando protocolos de terapia génica, pero presentan un menor índice de transferencia.

Para obtener un vector viral es necesario eliminar del genoma del virus aquellos componentes que hacen que pueda replicarse dentro de la célula. Para producir estos virus defectivos, debemos usar una línea celular que será la que proporcione los genes virales eliminados (Fig. 5).

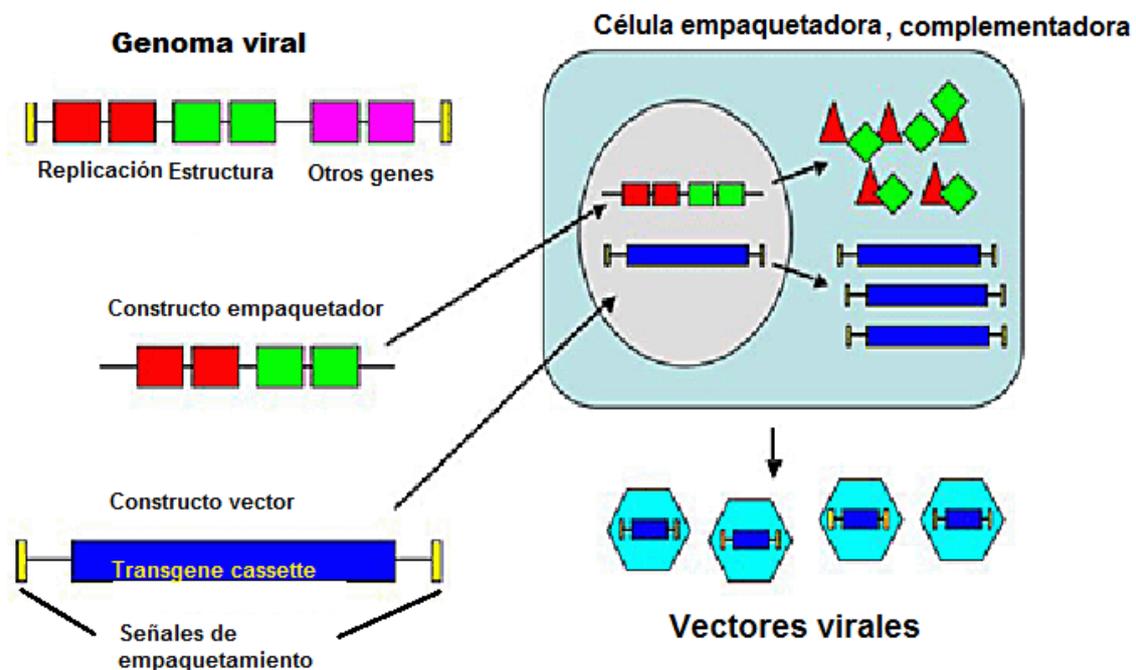


FIGURA 5 FABRICACIÓN DE VECTORES VIRALES. CÉLULAS EMPAQUETADORAS.

CYBEROUNDS CME [INTERNET]. CYBEROUNDS.COM. 2016 [CITED 15 JUNE 2016]. AVAILABLE FROM: [HTTP://WWW.CYBEROUNDS.COM/CMECONTENT/ART302.HTML?PF=YES](http://www.cyberounds.com/cmecontent/art302.html?pf=yes)

Estas líneas celulares se denominarás células empaquetadoras en caso de que den lugar a vectores retrovirales y células complementadoras si se utilizan para la fabricación de vectores adenovirales (Anexo 4).

### F.1.-Vectores virales:

Los vectores virales utilizados en terapia génica están modificados para que sean inocuos. Para ello, se eliminan la mayor parte posible de sus genes para inactivarlos, y se sustituyen por el gen terapéutico. Estos vectores virales pueden transducir células, pero no puedan dar lugar a una progenie vírica, es decir, no pueden producir una infección.

#### -Vectores Adenovirales:

Los vectores adenovirales son utilizados en un 22% de los protocolos de terapia génica realizados la actualidad. Estos virus son los encargados de producir infecciones respiratorias y conjuntivales.

Se pueden producir fácilmente en el laboratorio. Son vectores capaces de transducir células en estado quiescente y de transportar genes de mayor tamaño (unos 36 Kb). Este tipo de virus no se integran en el genoma del huésped, por lo que la expresión del gen terapéutico es transitoria (duran unas pocas semanas), siendo necesario repetir las dosis. Como consecuencia de esto, el paciente puede sufrir reacciones inmunológicas<sup>15</sup>.

#### -Vectores Retrovirales:

Son en la actualidad, por detrás de los vectores adenovirales, los vectores más utilizados en los protocolos de terapia génica (18.3%). La mayoría de estos vectores derivan del virus de la leucemia murina (*Moloney Leukemia Virus*, MLV), un retrovirus simple, que no puede infectar células que no se dividen. Actualmente, también se están utilizando vectores derivados del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH, causantes del SIDA), un retrovirus complejo<sup>16</sup>. Los lentivirus, como el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, presentan la particularidad de no necesitar la división de la célula para su integración, haciéndoles válidos para la transducción de células que permanecen quiescentes<sup>16</sup>. La integración del genoma de los retrovirus en el genoma de la célula diana no puede controlarse, pudiendo producirse mutagénesis insercionales.

### -Vectores virales derivados de Virus Adenoasociados:

Los virus adenoasociados son virus dependientes (dependovirus) de un virus colaborador (adenovirus o herpes virus), porque por ellos mismos no pueden replicarse. Se trata de un vector que ha suscitado interés en las investigaciones ya que es inocuo para el ser humano, es decir, no se ha encontrado que cause ninguna enfermedad grave en nuestra especie<sup>17</sup>.

Los virus adenoasociados son capaces de transducir tanto células en división como quiescentes, siendo altamente eficaces en su transferencia. Como desventaja tienen su pequeña capacidad (unas 5 Kb) y su dificultad de preparación.

Se ha mostrado su efectividad en la terapia *in vivo* de la hemofilia B, donde una de las causas es un defecto en el gen del factor IX de la coagulación. Este gen se ha regulado por un promotor específico del hígado y es capaz de producir un nivel estable en sangre del factor IX. Permitiendo a los pacientes abandonar o reducir su tratamiento habitual (terapia con factor IX recombinante)<sup>18</sup>.

### F.2.-Vectores no virales:

Los vectores no virales se utilizan, de manera similar a los vectores virales en la transferencia de material genético. Este tipo de vectores no provocan una respuesta inmunitaria significativa, no tienen tantas restricciones a la hora de almacenar genes y son más sencillos de sintetizar que los vectores virales. Por otra parte, los vectores no virales tienen un bajo índice de transferencia genética<sup>19</sup>.

### -DNA desnudo:

Consiste en la inyección de un DNA que contiene el gen terapéutico, habiéndose conseguido la expresión del gen terapéutico en músculo cardíaco y esquelético, piel y timo. Se trata de una técnica sencilla, pero que apenas consigue un nivel de transferencia aceptable debido a que no se produce integración del gen terapéutico en el genoma de la célula diana.

### -Liposomas:

La transferencia genética se logra debido a que el DNA se asocia a una vesícula formada por una bicapa de lípidos, denominada *lipoplejo*, que lo protege hasta la llegada al núcleo de la célula diana. Existen dos tipos de liposomas en función de la carga eléctrica de su superficie: los liposomas aniónicos (con carga negativa) y catiónicos (cargados positivamente).

Los liposomas catiónicos interactúan con el DNA, el cual está cargado negativamente, para formar un complejo estable. Aunque la mayor parte del material genético es degradado, una pequeña porción alcanza el núcleo de la célula permitiendo la expresión del gen terapéutico<sup>20</sup>.

### F.3.-Ventajas e inconvenientes de unos métodos y otros:

Los vectores virales son los más utilizados en terapia génica debido a su capacidad para introducir el material genético en las células y facilitar la expresión de genes endógenos, pero tienen como desventaja la introducción de material genético propio del virus, la posibilidad de producir mutaciones por inserción si se integran en el genoma del huésped y la respuesta inmunológica que pueden provocar algunos virus, como los adenovirus, constituyendo un riesgo para el paciente y una limitación para el tratamiento cuando son necesarias múltiples dosis. Por el contrario, los vectores no virales tienen baja eficacia de transferencia, pero ofrecen como principal ventaja su seguridad y su administración de manera dosis-dependiente (Anexo 6).

Los vectores virales más utilizados en la actualidad son los adenovirales y los retrovirales. Además de conseguir altos niveles de expresión génica, tienen capacidad para infectar células que están en estado de división, así como una menor respuesta inmune que el resto de vectores virales<sup>15</sup>.

Dentro de los factores no virales, los protocolos actuales se centran en su mayoría en el DNA desnudo (17'4%). Su mayor ventaja es que no produce reacciones inmunes, y aunque su transferencia genética es más baja que con el uso de vectores virales, ha conseguido tener una transferencia genética significativa mediante inyección directa en ciertos tejidos como el músculo.

### G.-EDICIÓN DE GENES: CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/ Cas9 Nuclease):

La edición de genes mediante el sistema CRISPR/Cas9 es un nuevo mecanismo descubierto por Francisco J. M. Mójica que está provocando una revolución en el mundo de la modificación génica<sup>21</sup>. Su descubridor lo denominó como sistema CRISPR en el año 2002, para hacer referencia a las repeticiones de secuencias interespaciadas que encontró en las bacterias y arqueas estudiadas<sup>22</sup>. Resulta un descubrimiento tan prometedor que, en el año 2015, recibieron el premio Princesa de Asturias las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna por su contribución en la utilización de la herramienta CRISPR/Cas9 en la modificación génica.

El sistema CRISPR/Cas9 forma parte de la defensa “inmunitaria” que utilizan ciertos organismos procariontes, como las bacterias y arqueas, para protegerse del ataque de virus. Estas bacterias son capaces de detectar la secuencia genética extraña e incorporar fragmentos de ese DNA exógeno en su propio genoma, utilizándolo como sistema de defensa en futuras invasiones del mismo agente extraño<sup>23</sup>.

En el sistema CRISPR/Cas9 se necesita que se introduzcan y/o se exprese en las células del organismo en las que se va a realizar la edición genética dos componentes: la nucleasa Cas9 y un RNA guía (gRNA). Este gRNA dirige a la nucleasa Cas9 a una zona específica del DNA mediante la regla de complementación de bases RNA-DNA. Con la ayuda de la nucleasa Cas9 se produce una escisión en el DNA, dejando el gen sin la parte mutada. La cadena de DNA volverá a formarse mediante: recombinación no homóloga, produciendo la inactivación del gen o recombinación homóloga insertando secuencias deseadas a través de moldes de DNA suministrados exógenamente, produciendo finalmente un gen libre de mutación (Fig. 6)<sup>24</sup>. Lo más común suele ser la recombinación no homóloga, por lo que en la actualidad los nuevos protocolos de terapia génica están investigando para que este sistema intente producir siempre una recombinación homóloga.

La edición del genoma mediante estas nucleasas está siendo usada para modificar genes endógenos en una gran cantidad de organismos, lo que tradicionalmente ha supuesto un reto, de manera rápida, fácil y eficiente. El poder de estos sistemas que pueden alterar de forma eficiente la secuencia del genoma y la expresión genética, van a transformar la investigación biológica y a estimular el desarrollo de terapias moleculares novedosas para las distintas enfermedades humanas<sup>23</sup>.

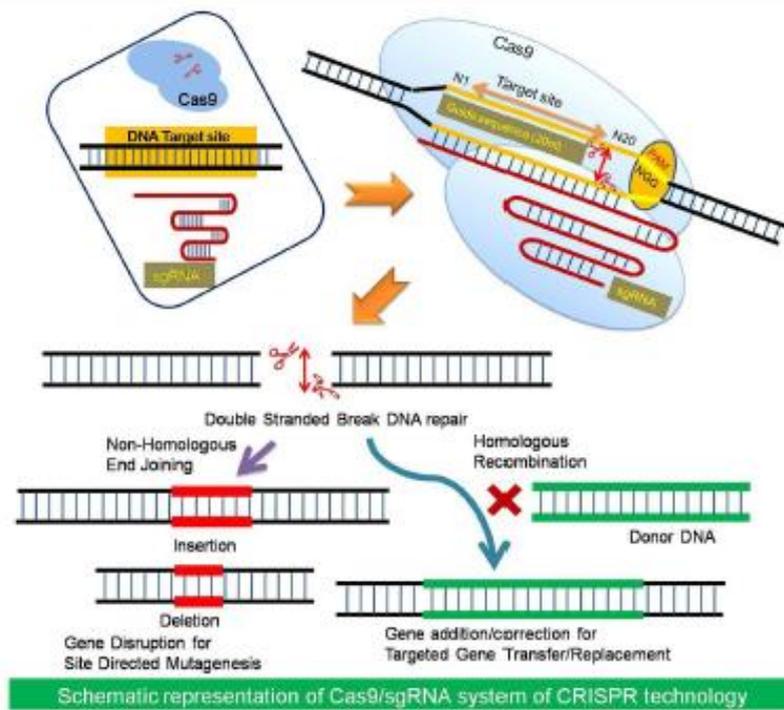


FIGURA 6 MECANISMO BÁSICO DE ACTUACIÓN DEL SISTEMA CRISPR/CAS9

KHATODIA S, BHATOTIA K, PASSRICHA N, KHURANA S, TUTEJA N. THE CRISPR/CAS GENOME-EDITING TOOL: APPLICATION IN IMPROVEMENT OF CROPS. FRONTIERS IN PLANT SCIENCE. 2016;7.

## H-TERAPIA GÉNICA EN LA ACTUALIDAD:

Actualmente se están realizando en el mundo 2.356 estudios clínicos sobre terapia génica. Este estos ensayos participan 31 países de los cinco continentes (Fig. 7).

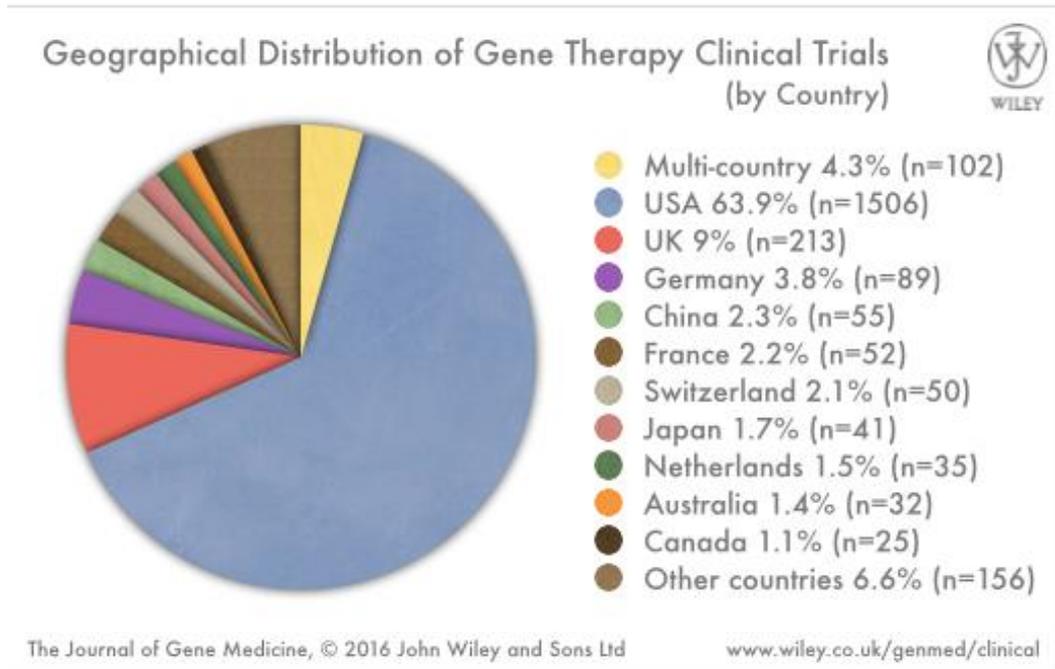


FIGURA 7 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS ENSAYOS CLÍNICOS DE TG. FUENTE: [HTTP://WWW.WILEY.COM//LEGACY/WILEYCHI/GENMED/CLINICAL/](http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/)

### H.1.-Terapia génica en el mundo:

La terapia génica se realiza en la actualidad en 31 países del mundo, ya que se trata de un campo de investigación importante y que suscita un gran interés. El predominio de la investigación científica en terapia génica es de Estado Unidos (E.E.U.U). Realiza un 63,9% de los estudios clínicos sobre terapia génica, lo que supone 1.506 protocolos de terapia génica en el año 2016 (Anexo 2).

Seguidamente, se encuentra el Reino Unido con un 9% de los protocolos. Es el primer país europeo de la lista y detrás de él aparecen otros como Francia, Alemania, Suiza... Europa patentó su primer producto de terapia génica en el año 2012 (Glybera®) y actualmente se encuentra en funcionamiento 545 protocolos sobre este campo.

China se sitúa como el país asiático que realiza más protocolos génicos (2'3%). En el año 2016, China controla 53 protocolos sobre terapia génica y fue el país que patentó el primer producto comercializado de terapia génica (Gendicine®).

Por último, también participan en ensayos clínicos de terapia génica países como Holanda, Australia, Canadá, etc. aunque en menor proporción. Estos países llevan a cabo entre el 1'4 y el 1'1% de los estudios genéticos.

### H.2.-Terapia génica en España:

Actualmente España ha realizado un total de 24 protocolos de terapia génica, lo que representa un 1% del porcentaje mundial de investigación en terapia génica. De estos 24 protocolos, 6 de ellos han sido cerrados, y 18 permanecen abiertos y en fase de investigación. Todos ellos se encuentran en fase I o II de investigación. Además de estos estudios clínicos en los que España aparece como primer país investigador, también participa en otros proyectos como colaborador de otros países<sup>25</sup>.

Ver el Anexo 1 (A, B, C, D, y E) de protocolos en España.

### H.3.-Productos de terapia génica comercializados:

Existen varios productos de terapia génica comercializados actualmente. De estos, cabe destacar el primer producto de este tipo que se aprobó en Europa (Glybera<sup>®</sup>) y el primer protocolo comercializado a nivel mundial (Gendicine<sup>®</sup>).

#### -Glybera<sup>®</sup>:

Se trata del primer tratamiento de terapia génica aprobado y comercializado en Europa (noviembre de 2012). Es un virus adenoasociado que sintetiza la lipoproteína lipasa (LPL), la cual se usa como tratamiento de aquellos pacientes que sufren deficiencia de la lipoproteína lipasa (lipoprotein lipase deficiency LPLD). Se trata de una enfermedad de tipo autosómico recesivo que produce un mal metabolismo de las grasas. Esta proteína ayuda al catabolismo de los triglicéridos, por lo que su mal funcionamiento da lugar a un acumulo de las grasas en el plasma produciendo una hipertrigliceridemia, dolor abdominal, pancreatitis y hepatoesplenomegalia<sup>26</sup>.

Glybera<sup>®</sup> se trata de un tipo de terapia génica *in vivo*, donde el producto se inyecta en múltiples músculos de las extremidades inferiores bajo anestesia epidural. Con la ayuda

de un promotor, se permite la síntesis de esta lipoproteína lipasa, que junto con la dieta especial que deben de seguir los pacientes, hacen que se reduzcan los síntomas y las probabilidades de padecer una pancreatitis<sup>27</sup>.

La aprobación de Glybera<sup>®</sup> como producto terapéutico se ha asociado a una mejora de los requisitos en la producción y comercialización de este tipo de productos y a una evaluación continua de su seguridad y eficacia<sup>26</sup>.

### -Gendicine<sup>®</sup>:

Se trata de un adenovirus oncolítico para el tratamiento del cáncer de células escamosas de cabeza y cuello. Este tipo de cáncer afecta a las células escamosas que revisten las superficies húmedas y las mucosas del interior de la cabeza y el cuello, es decir, dentro de la boca, la nariz y la garganta<sup>28</sup>. Fue el primer producto de terapia génica comercializado en el mundo, obteniéndose su permiso de comercialización por la SFDA (State Food and Drug Administration of China) en octubre de 2003<sup>28</sup>.

El adenovirus oncolítico Gendicine<sup>®</sup> es destruido en las células normales por mediación de la proteína p53 (esta proteína no está presente en muchas células cancerosas), mientras que es capaz de atacar a las células cancerosas que no pueden defenderse ya que son deficitarias de dicha proteína.

Este tratamiento se aplica mediante inyección directa intratumoral y junto a radioterapia, aumentando un 10% las posibilidades de supervivencia a los 3 años.<sup>29</sup> Se piensa que este tipo de terapia puede ser aplicable a otros procesos cancerosos como, por ejemplo, aquellos cánceres que por su localización o su alcance de órganos vitales se consideran como inoperables<sup>29</sup>.

Este producto ha generado mucha polémica debido a las diferencias de criterios reguladores entre las agencias orientales y las occidentales, en referencia a los resultados necesarios en estudios en fase clínica III<sup>30</sup>.

## I.-MARCO REGULATORIO DE UN PROTOCOLO DE TERAPIA GÉNICA EN ESPAÑA:

La regulación de los proyectos en terapia génica en España, se rige por la Agencia Europea del Medicamento (EMA en sus siglas en inglés).

Según la página web de la Sociedad Española de Terapia Génica y Celular: “La EMA fue creada por el Reglamento (CEE) nº2309/93, de 22 de julio de 1993. Londres fue elegida como su sede. La EMA es la encargada de coordinar los recursos científicos existentes en los Estados miembros con el fin de evaluar y supervisar los medicamentos de uso humano y veterinario. Sobre la base del dictamen de la Agencia, la Comisión Europea autoriza la comercialización de nuevos medicamentos y arbitra entre los Estados miembros de que otros medicamentos en caso de desacuerdo”<sup>31</sup>.

Esta sociedad regula la terapia génica agrupada dentro de lo que denomina medicamentos de terapia avanzada: “Son medicamentos de uso humano basados en genes (terapia génica), células (terapia celular) o tejidos (ingeniería tisular) e incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico. Constituyen nuevas estrategias terapéuticas y su desarrollo contribuirá a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces”<sup>32</sup>.

Para poder realizar un ensayo clínico sobre terapia génica, debe de ajustarse a las regulaciones de la Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de medicamentos y productos sanitarios, el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos y el Real Decreto 1564/1992, de 18 de diciembre, por el que se desarrolla y regula el régimen de autorización de los laboratorios farmacéuticos e importadores de medicamentos y la garantía de calidad en su fabricación industrial. Además, requiere de un Comité Ético de Investigación Clínica, formado por personal de los centros participantes, el acuerdo de la dirección de dichos centros que participan en el estudio y la autorización de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios<sup>32</sup>.

Una vez que los ensayos clínicos han sido satisfactorios, para poder comercializar el producto de terapia génica, debe solicitarse a la Agencia Española del Medicamento (AEM), la cual está al servicio de la Agencia Europea del Medicamento (EMA), su autorización. Existen excepciones en los que este procedimiento no está centralizado con

Europa. Estas excepciones están recogidas en el Reglamento (CE) N° 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de noviembre de 2007 sobre medicamentos de terapia avanzada, y cuya autorización corresponde a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios<sup>32</sup>.

Existen ciertos medicamentos que reciben una autorización de uso (no de comercialización) en el marco de una institución hospitalaria, que será la responsable del medicamento y que estará regulado por el Real Decreto 477/2014, de 13 de junio, por el que se regula la autorización de medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial<sup>32</sup>.

Finalmente, el Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios es la última actualización sobre los medicamentos de terapia avanzada<sup>33</sup>.

## **11.-PROBLEMAS ÉTICOS DE EN LA TERAPIA GÉNICA:**

La terapia génica somática se presenta como una intervención terapéutica cuyo objetivo es la curación de la enfermedad, como podría serlo cualquier procedimiento terapéutico. Se considera como una intervención deseable, puesto que pretende el bien estar personal del paciente, sin dañar su integridad o deteriorar su calidad de vida. Por lo tanto, la terapia génica somática no supondría mayor controversia que la que tiene cualquier procedimiento terapéutico, es decir, habría que informar adecuadamente al paciente, para que pueda valorar los pros y asumir los riesgos de la terapia. Además, debemos hacerle saber que se trata de una terapia experimental y, por lo que pueden aparecer efectos como la falta de control en la expresión de dichos genes o reacciones inmunitarias al producto. Actualmente y con la tecnología disponible, los efectos adversos más perjudiciales provienen de los problemas relacionados con la eficacia, la inmunogenicidad de los vectores virales y la mutagénesis insercional<sup>38</sup>. Dado que es una terapia aún experimental, solo debe aplicarse en caso que no pueda utilizarse un tratamiento convencional efectivo.

La terapia génica germinal es la terapia que más polémica puede suscitar. Si las investigaciones se dirigieran hacia la modificación genética de células germinales, sus precursores y embriones, no solo cambiaríamos su dotación genética, si no que habríamos cambiado también la de sus descendientes, los cuales no han decidido si querían recibir

esa terapia o no. Y, como aún no somos capaces de controlar estos procedimientos, no podemos asegurar que estos cambios producirían solo beneficios en la descendencia, podríamos provocar, por ejemplo, la activación de oncogenes que se transmitirían a la descendencia.

Finalmente, con la terapia génica germinal existe el riesgo de modificar la dotación genética de los embriones para obtener características “deseables” y caer en la eugenesia (*Buen nacimiento*). Sin embargo, actualmente este tipo de terapia está prohibida en el mundo, aunque investigadores chinos ya han experimentado con cigotos no viables <sup>34</sup>. Debemos estar preparados para los nuevos cambios legislativos que puedan ser necesarios a medida que se produzcan éxitos en este campo de la investigación.

## **12.-CONCLUSIONES:**

La terapia génica es uno de los avances científicos prometedores en la curación de enfermedades tanto hereditarias como adquiridas. Mediante los distintos tipos de transferencia genética (in vivo y ex vivo) y los distintos vectores que se utilizan (virales y no virales) la terapia génica está tratando todo tipo de enfermedades y, de hecho, ya ha sido capaz de curar a pacientes con enfermedades como el síndrome de la inmunodeficiencia combinada grave (SCID-X1) causada por la falta de la enzima adenosín deaminasa (ADA) además, de haber conseguidos otros muchos éxitos en la actualidad <sup>35,36,37,38,39</sup>.

La edición de genes mediante el sistema CRISPR/Cas9 ha sido toda una revolución en el campo de la genética. Gracias a él, ya no es necesario la presencia de vectores que medien en el proceso de transducción, simplemente reconocerá la zona defectuosa y la eliminará del DNA. Se alza como uno de los métodos más fiables dentro de la terapia génica.

Las leyes, tanto españolas como europeas, dejan bien regulado los pasos a seguir en caso de que se quiera realizar un protocolo de terapia génica y la comercialización de los mismos.

El profesional de enfermería, como parte del equipo multidisciplinar de salud encargado de la prevención y promoción de la salud, deberá incidir en aquellos aspectos que puedan ayudar al empoderamiento de la salud genética del paciente (prevención del tabaquismo,

sedentarismo, etc.), por lo que será necesario que a este personal se le instruya correctamente para identificar, apoyar y cuidar a personas afectadas, o con riesgo de padecer o transmitir enfermedades génicas hereditarias y adquiridas. Dentro de sus competencias actuales, el personal enfermero resulta de gran ayuda a los pacientes, principalmente como esclarecedoras de toda la información que se les aporta cuando participan en un protocolo de terapia génica, y como fuente de apoyo y empatía durante todo el proceso. Actualmente en la legislación española, no están definidas claramente las competencias de la enfermera en el campo de la terapia génica. Sin embargo, en mi opinión, el desarrollo de la enfermería debería avanzar en consonancia a los avances de la ciencia y a las demandas de la población.

### **13.-BIBLIOGRAFÍA:**

1. Sheridan C. Gene therapy finds its niche. *Nature Biotechnology*. 2011; 29(2):121-128
2. Kumar S, Markusic D, Biswas M, High K, Herzog R. Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*. 2016; 3:16034.
3. A Kaminski R, Bella R, Yin C, Otte J, Ferrante P, Gendelman H et al. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. *Gene Therapy*. 2016;
4. Xie F, Ye L, Chang J, Beyer A, Wang J, Muench M et al. Seamless gene correction of B-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Research*. 2016;
5. Hacein-Bey Abina S, Gaspar H, Blondeau J, Caccavelli L, Charrier S, Buckland K et al. Outcomes Following Gene Therapy in Patients With Severe Wiskott-Aldrich Syndrome. *JAMA*. 2015; 313(15):1550.
6. Manjula D, Harvey I, Chu L, Sinha M, Pelletier J. Full-length cDNAs: more than just reaching the ends. *Physiol Genomics*. 2001; volumen 6.
7. Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014; 459:70-83.
8. Rozalén J, Fernández Gómez F, Ceña V. Aplicaciones de la terapia génica. *OFFARM*. 2003; 22(10):142-150.
9. Ginn S, Alexander I, Edelstein M, Abedi M, Wixon J. Gene Therapy clinical trials worldwide to 2012-an update. *The journal of Gene Medicine*. 2013; 15:65-77.

10. Herzog R. Gene Therapy for SCID-X1: Round 2. *Molecular Therapy*. 2010; 18:1-2.
11. Zhen A, Kamata M, Rezek V, Rick J, Levin B, Kasparian S et al. HIV-specific Immunity Derived From Chimeric Antigen Receptor-engineered Stem Cells. *Mol Ther*. 2015; 23(8):1358-1367.
12. Kaufmann K, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene Therapy on the move. *EMBO Molecular Medicine*. 2013; 5:1642-1661.
13. Durviz C. Programa de terapia génica. Universidad de Valencia. Valencia.
14. Thomas C, Ehrhardt A, Kay M. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2003; 4(5):346-358.
15. Vorburger S. Adenoviral Gene Therapy. *The Oncologist*. 2002; 7(1):46-59.
16. Legorreta Herrera M, Martínez Flores F, Hernández Sánchez F, Zentella Dehesa A. Los Vectores virales y la transgénesis. *Vertientes Revista especializada en Ciencias de la Salud*. 2012; 15(1):5-14.
17. Collins M Thrasher A. Gene therapy: progress and predictions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2015; 282(1821):20143003
18. High K. The gene therapy journey for hemophilia: are we there yet?. *Blood*. 2012; 120(23):4482-4487.
19. Yin H, Kanasty R, Eltoukhy A, Vegas A, Dorkin J, Anderson D. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*. 2014; 15(8):541-555.
20. 13. Meissner J, Toporkiewicz M, Matuszewicz L, Machnicka B. Liposomes as non-viral carriers for genetic drugs. *Postepy Hig Med Dosw*. 2016; 70:200-209.
21. Mójica F. Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, premio Princesa de Asturias de Investigación Científica y Técnica 2015. SEBBM Divulgación [Internet]. 2016 [cited 1 June 2016];1-2. Available from: [http://www.sebbm.es/web/images/AAdocumentos/junio2016\\_franciscojica.pdf](http://www.sebbm.es/web/images/AAdocumentos/junio2016_franciscojica.pdf)
22. Doudna J Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2016; 346
23. Sander Joung J. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*. 2014; 32(4):347-355.
24. Ran F, Hsu P, Wright J, Agarwala V, Scott D, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013; 8(11):2281-2308.
25. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. *Abedia.com*. 2016 [cited 28 May 2016]. Available from: [http://www.abedia.com/wiley/search\\_results.php?TrialCountry=Spain&CategoryMain=&Vector=&GeneTypes=&Phase=&Status=&FinalApprYear=&Submit=%A0%A0Search%A0%A0](http://www.abedia.com/wiley/search_results.php?TrialCountry=Spain&CategoryMain=&Vector=&GeneTypes=&Phase=&Status=&FinalApprYear=&Submit=%A0%A0Search%A0%A0)

26. Bryant L, Christopher D, Giles A, Hinderer C, Rodriguez J, Smith J et al. Lessons Learned from the Clinical Development and Market Authorization of Glybera. *Human Gene Therapy Clinical Development*. 2013; 24(2):55-64.
27. Büning H. Gene therapy enters the pharma market: The short story of a long journey. *EMBO Molecular Medicine*. 2013; 5(1):1-3.
28. Pearson S, Jia H, Kandachi K. China approves first gene therapy. *Nature Biotechnology*. 2004; 22(1):3-4.
29. Alemany Bonastre R. Virus y Terapia Génica. *Virología*. 2013; 16(3):53-59.
30. Lane D, Cheok C, Lain S. p53-based Cancer Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010; 2(9):a001222-a001222.
31. Marco Regulatorio. Setgyc.es. 2016 [cited 27 May 2016]. Available from: <http://www.setgyc.es/Informaci%C3%B3n-de-Inter%C3%A9s/Marco-Regulatorio.aspx>
32. Agencia Española del Medicamento. 2016 [cited 30 May 2016]. Available from: [https://www.aemps.gob.es/investigacionClinica/terapiasAvanzadas/preg-resp\\_TA.htm](https://www.aemps.gob.es/investigacionClinica/terapiasAvanzadas/preg-resp_TA.htm)
33. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Madrid; 2015 p. 34.
34. Freire J, Medeiros S, Lopes Neto A, Monteiro Júnior J, Sousa A, Rocha A et al. Bioethical conflicts of gene therapy: a brief critical review. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2014; 60(6):520-524.
35. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell*. 2015; 6(5):363-372.
36. Spark Therapeutics. Positive Top-line results from pivotal phase 3 trial of SPK-RPPE65 for Genetic Blinding Conditions. 2016.
37. Long C, McAnally J, Shelton J, Mireault A, Bassel-Duby R, Olson E. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science*. 2014; 345(6201):1184-1188.
38. Schwank G, Koo B, Sasselli V, Dekkers J, Heo I, Demirçan T et al. Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. *Cell Stem Cell*. 2013; 13(6):653-658.
39. Ye L, Wang J, Beyer A, Teque F, Cradick T, Qi Z et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 $\Delta$ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014; 111(26):9591-9596

# ANEXOS

## Anexo 1.A:

Los protocolos de estudios génicos que se están realizando actualmente en España se resumen en esta tabla

Displaying records **1** through **10** of **24** records found

<b>Trial ID</b>	<b>Title</b>
<a href="#"><u>ES-0001</u></a>	Gene Therapy in Patients with Glioblastoma
<a href="#"><u>ES-0002</u></a>	Gene therapy clinical trial in gastrointestinal cancer
<a href="#"><u>ES-0003</u></a>	A phase I clinical trial of AF-IL12 (adenoviral vector coding for interleukin 12 genes) in the treatment of advanced gastrointestinal neoplasms.
<a href="#"><u>ES-0004</u></a>	A phase I trial of Intratumoral Injection of Dendritic Cells Engineered to Secrete Interleukin-12 by Recombinant Adenovirus in Patients With Digestive Tumors
<a href="#"><u>ES-0006</u></a>	Development of an Angiogenic Gene Therapy Product for Coronary Artery Disease.
<a href="#"><u>ES-0011</u></a>	Phase I clinical trial of intravenous administration of a conditionally replicating adenovirus ICOVIR-5 in patients with locally advanced or metastatic malignant melanoma
<a href="#"><u>ES-0013</u></a>	Phase I Clinical Trial Of Gene Therapy For Hepatocellular Carcinoma By Intratumoral Injection Of TK99UN (An Adenoviral Vector Containing The Thymidine Kinase Of Herpes Simplex Virus)
<a href="#"><u>ES-0014</u></a>	Phase I-II therapeutic vaccination clinical trial in patients with chronic hepatitis C by administration of autologous dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding NS3 protein
<a href="#"><u>ES-0015</u></a>	ICOVIR5 treatment of paediatric refractory or recurrent tumors of the Central Nervous System
<a href="#"><u>ES-0018</u></a>	Phase I trials to assess efficacy and safety of treatment with autologous mesenchymal cells infected with an oncolytic adenovirus (CELYVIR) in the treatment of paediatric patients with refractory or relapsed solid tumors

## Anexo 1.B:

Displaying records 11 through 20 of 24 records found

<b>Trial ID</b>	<b>Title</b>
<a href="#"><u>ES-0020</u></a>	Phase I, multicentre, open label, single dose, dose-ranging clinical trial to investigate the safety and tolerability of a gene therapy vector rAAV2/5-PBGD for the treatment of Acute Intermittent Porphyria.
<a href="#"><u>ES-0021</u></a>	A phase I, multi center, open label, dose escalation study of intratumoral injection of VCN 01 oncolytic adenovirus in combination with intravenous gemcitabine in advanced pancreatic cancer
<a href="#"><u>ES-0022</u></a>	A phase I, multicenter, open label, dose escalation study of intravenous administration of VCN 01 oncolytic adenovirus alone and in combination with intravenous gemcitabine in patients with advanced solid tumors
<a href="#"><u>ES-0023</u></a>	Phase I clinical trial of endovenous administration of a conditionally replicating adenovirus ICOVIR-5 in patients with locally advanced or metastatic malignant melanoma
<a href="#"><u>ES-0024</u></a>	Phase 1 Trial of Celyvir in Children and Adults With Metastatic and Refractory Solid Tumors.
<a href="#"><u>ES-0025</u></a>	Phase I Clinical Trial of Delta-24-RGD oncolytic adenovirus and temozolomide for treatment of glioblastoma at first recurrence
<a href="#"><u>ES-0026</u></a>	A Phase I, Multicenter, Open-label, Dose Escalation Study of Intratumoral Injections of VCN-01 Oncolytic Adenovirus With or Without Intravenous Gemcitabine in Advanced Pancreatic Cancer.
<a href="#"><u>ES-0028</u></a>	Phase I/II safety, tolerability and initial efficacy study of adeno-associated viral vector serotype 9 containing human Sulfamidase gene after intracerebroventricular administration to patients with Mucopolysaccharidosis IIIA (Sanfilippo A syndrome).
<a href="#"><u>ES-0029</u></a>	A Phase 2, Multicenter, Randomized, Open-label Trial Assessing the Efficacy and Safety of Talimogene Laherparepvec Neoadjuvant Treatment Plus Surgery Versus Surgery Alone for Resectable, Stage IIIB to IVM1a Melanoma
<a href="#"><u>ES-0030</u></a>	Phase I/II safety, tolerability and initial efficacy study of adeno-associated viral vector serotype 9 containing human Sulfamidase gene after intracerebroventricular administration to patients with Mucopolysaccharidosis IIIA (Sanfilippo A syndrome).

## Anexo 1.C:

Displaying records 21 through 24 of 24 records found

<b>Trial ID</b>	<b>Title</b>
<a href="#"><u>ES-0031</u></a>	Phase I/II Gene Therapy Clinical Trial of rAAV9.CMV.NAGLU for Mucopolysaccharidosis IIIB
<a href="#"><u>ES-0032</u></a>	Phase I/II Gene Therapy Clinical Trial of scAAV9.U1a.SGSH for Mucopolysaccharidosis IIIA
<a href="#"><u>ES-0033</u></a>	A phase I, unicentric, open-label and dose escalation clinical study to evaluate the safety and the antitumoral activity of VCN-01 in patients with refractory retinoblastoma
<a href="#"><u>ES-0036</u></a>	A Phase 1, Multi-center, Open-label, Dose De-escalation Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Talimogene Laherparepvec in Pediatric Subjects with Advanced Non Central Nervous System Tumors That are Amenable to Direct Injection

Anexo 1.D:

Ejemplo de un protocolo realizado en España:

Trial ID : **ES-0014**

Trial title	Phase I-II therapeutic vaccination clinical trial in patients with chronic hepatitis C by administration of autologous dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding NS3 protein
Trial country	<b>Spain</b>
Category	Infectious diseases
Indication	Chronic hepatitis C
Phase	Phase I/II
Date approved/initiated	2011-05-17
Status	Open
Date closed	
Gene(s)	NS3 protein
Gene type(s)	Antigen
Vector	Adenovirus
Cell source	
Target cells	
Gene delivery	
Administration route	
Principal investigator	Clínica Universidad de Navarra Pamplona <b>Spain</b>
Results reference	

**Anexo 1.E:**

Son 24 protocolos, de los cuales 18 están abiertos actualmente. Además, también interviene en ciertos protocolos en colaboración con distintos países, como, por ejemplo:

**Trial ID : ES-0019**

Trial title	A Phase 2b Randomized, Open-Label Trial of JX-594 (Vaccinia GM-CSF / TK-deactivated Virus) Plus Best Supportive Care Versus Best Supportive Care in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma Who Have Failed Sorafenib Treatment (JX594-HEP018)
Trial country	<b>Multi-Country: Spain, Germany, Italy, USA, Canada, Australia, Russia, South Korea, Taiwan, Hong Kong</b>
Category	Cancer diseases
Indication	Hepatocellular carcinoma
Phase	Phase II
Date approved/initiated	2011-11-02
Status	Open
Date closed	
Gene(s)	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)Tyrosinase
Gene type(s)	CytokineReplication inhibitor
Vector	Vaccinia virus
Cell source	
Target cells	
Gene delivery	
Administration route	
Principal investigator	
	<b>Spain</b>
Results reference	

Anexo 2:

Tablas de los distintos países que realizan actualmente protocolos de Terapia Génica:

Country	Gene Therapy Clinical Trials	
	Number	%
Australia	32	1.4
Austria	2	0.1
Belgium	22	0.9
Burkina Faso	1	0
Canada	25	1.1
China	55	2.3
Czech Republic	1	0
Denmark	2	0.1
Egypt	1	0
Finland	6	0.3
France	52	2.2
Gambia	1	0
Germany	89	3.8
Ireland	2	0.1
Israel	8	0.3
Italy	25	1.1
Japan	41	1.7
Kenya	1	0
Mexico	2	0.1
Netherlands	35	1.5
New Zealand	2	0.1
Norway	4	0.2
Poland	6	0.3
Romania	1	0
Russia	9	0.4
Saudi Arabia	1	0
Senegal	1	0
Singapore	3	0.1
South Korea	18	0.8
Spain	24	1
Sweden	11	0.5
Switzerland	50	2.1
Taiwan	1	0
Uganda	1	0
UK	213	9
USA	1506	63.9
Multi-country	102	4.3
<b>Total</b>	<b>2356</b>	

Anexo 3:

Enfermedades en las que se están aplicando protocolos de terapia génica:

Indications	Gene Therapy Clinical Trials	
	Number	%
Cancer diseases	1517	64.4
Cardiovascular diseases	177	7.5
Gene marking	50	2.1
Healthy volunteers	53	2.2
Infectious diseases	179	7.6
Inflammatory diseases	14	0.6
Monogenic diseases	235	10
Neurological diseases	43	1.8
Ocular diseases	34	1.4
Others	54	2.3
Total	2356	

Anexo 4:

Tabla de vectores virales que se utilizan actualmente en Terapia Génica:

Vector	Gene Therapy Clinical Trials		Naked/Plasmid DNA	409	17.4
	Number	%			
Adeno-associated virus	162	6.9	Naked/Plasmid DNA + Adenovirus	4	0.2
Adenovirus	499	21.2	Naked/Plasmid DNA + Modified Vaccinia Ankara virus (MVA)	2	0.1
Adenovirus + Modified vaccinia Ankara virus (MVA)	11	0.5	Naked/Plasmid DNA + RNA transfer	1	0
Adenovirus + Retrovirus	3	0.1	Naked/Plasmid DNA + Vaccinia virus	3	0.1
Adenovirus + Sendai virus	1	0	Naked/Plasmid DNA + Vesicular stomatitis virus	3	0.1
Adenovirus + Vaccinia virus	8	0.3	Newcastle disease virus	1	0
Alphavirus (VEE) Replicon Vaccine	1	0	Non-viral	2	0.1
Antisense oligonucleotide	6	0.3	Poliovirus	2	0.1
Bifidobacterium longum	1	0	Poxvirus	68	2.9
E. coli	2	0.1	Poxvirus + Vaccinia virus	35	1.5
Flavivirus	8	0.3	Retrovirus	441	18.7
Gene gun	5	0.2	RNA transfer	43	1.8
Herpes simplex virus	86	3.7	RNA virus	5	0.2
Lactococcus lactis	6	0.3	Saccharomyces cerevisiae	9	0.4
Lentivirus	135	5.7	Salmonella typhimurium	4	0.2
Lipofection	115	4.9	Semliki forest virus	2	0.1
Listeria monocytogenes	21	0.9	Sendai virus	4	0.2
Measles virus	10	0.4	Shigella dysenteriae	1	0
Modified Vaccinia Ankara virus (MVA)	7	0.3	Simian Immunodeficiency Virus (SIVagm)	1	0
mRNA Electroporation	5	0.2	Simian virus 40	1	0
			siRNA	5	0.2

<b>Sleeping Beauty transposon</b>	<b>10</b>	<b>0.4</b>
<b>Streptococcus mutans</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>Vaccinia virus</b>	<b>124</b>	<b>5.3</b>
<b>Venezuelan equine encephalitis virus replicon</b>	<b>3</b>	<b>0.1</b>
<b>Vesicular stomatitis virus</b>	<b>3</b>	<b>0.1</b>
<b>Vibrio cholerae</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>Unknown</b>	<b>76</b>	<b>3.2</b>
<b>Total</b>	<b>2356</b>	

Anexo 5:

Evolución del número de protocolos de Terapia Génica en el tiempo:



Anexo 6:

Tabla comparativa de los vectores más utilizados en terapia génica:

Características	Retrovirus	Lentivirus	Adenovirus	v. Adenoasociados	DNA desnudo
<b>Tamaño del gen</b>	7-7.5 Kb	7-7.5 Kb	≈30 Kb	3.5-4 Kb	ilimitado
<b>Concentración (partículas virales por ml)</b>	>10 <sup>8</sup>	>10 <sup>8</sup>	>10 <sup>11</sup>	>10 <sup>12</sup>	Sin límite
<b>Técnica de transferencia génica</b>	Ex vivo	Ex/in vivo	Ex/in vivo	Ex/in vivo	Ex/in vivo
<b>Integración en el genoma</b>	Sí	Sí	No	Sí/No	Muy poco
<b>Duración expresión in vivo</b>	Corta	Larga	Corta	Larga	Corta
<b>Estabilidad</b>	Buena	No probada	Buena	Buena	Muy buena
<b>Problemas inmunológicos</b>	Algunos	Algunos	Grandes	No conocidos	Ninguno
<b>Efectos secundarios</b>	Mutagénesis insercional	Mutagénesis insercional	Respuesta inflamatoria, toxicidad	Respuesta inflamatoria, toxicidad	Ninguna

