



TERAPIA GÉNICA EN ENFERMEDADES OCULARES

Trabajo Fin de Grado. Revisión bibliográfica

15/06/2018

**Mónica Marín Robayo
Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla**



TERAPIA GÉNICA EN ENFERMEDADES OCULARES

Trabajo Fin de Grado. Revisión bibliográfica

Autora: Mónica Marín Robayo

Doble Grado en Farmacia y Óptica y Optometría

Tutor: Ignacio David Rodríguez Llorente

Departamento de Microbiología y Parasitología

Facultad Farmacia

Universidad de Sevilla

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AAV: Virus adenoasociados

ARN_i: ARN interferencia

ARN_m: ARN mensajero

AV: Agudeza visual

CHM: Coroideremia

DMAE: Degeneración macular asociada a la edad

EIAV: Virus de la anemia infecciosa equina

EPR: Epitelio pigmentario de la retina

FR: Fotorreceptores

GC1: Guanilato ciclasa 1

IVT: Intravítrea

LCA: Amaurosis congénita de Leber

LV: Lentivirus

MERTK: Receptor de tirosín quinasa

MYO7A: Gen miosina VIIA

ONL: Capa nuclear externa

RP: Retinosis pigmentaria

RPGR: Gen regulador de la GTPasa

SR: Subretiniana

STGD1: Enfermedad de Stargardt

USH1: Síndrome de Usher

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

ÍNDICE

1. RESUMEN	- 4 -
2. INTRODUCCIÓN	- 5 -
2.1. ¿Qué es la terapia génica?	- 5 -
2.2. Modalidades de terapia génica	- 6 -
2.2.1. Según el método de transferencia genética (vector)	- 6 -
2.2.2. Según el tipo de célula sobre la que se aplique	- 8 -
2.2.3. Según el método de aplicación	- 8 -
2.3. Terapia génica: el futuro de la oftalmología.	- 10 -
2.3.1. El ojo como diana de terapia génica	- 10 -
2.3.2. Métodos de introducción del vector en la retina	- 11 -
2.4. Justificación de la revisión.....	- 13 -
3. OBJETIVOS	- 13 -
3.1. Objetivo general.....	- 13 -
3.2. Objetivos específicos.....	- 13 -
4. METODOLOGÍA.....	- 14 -
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 15 -
5.1 Amaurosis congénita de Leber (LCA)	- 16 -
5.2 Retinosis pigmentaria (RP)	- 18 -
5.2.1 Retinosis pigmentaria no sindrómicas	- 19 -
5.2.1.1 Retinosis pigmentaria autosómica dominante.	- 19 -
5.2.1.2 Retinosis pigmentaria autosómica recesiva.....	- 20 -
5.2.1.3 Retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X	- 21 -
5.2.2 Retinosis pigmentaria sindrómica	- 21 -
5.2.2.1 Síndrome de Usher.....	- 21 -
5.3 Acromatopsia (ACHM).....	- 22 -
5.4 Coroideremia (CHM)	- 25 -
5.5 Enfermedad de Stargardt (STGD1).....	- 26 -
5.6 Degeneración macular asociada a la edad (DMAE)	- 27 -
6. CONCLUSIONES	- 28 -
7. BIBLIOGRAFÍA	- 29 -

1. RESUMEN

La terapia génica es una estrategia prometedora ya que trata la enfermedad en sí misma, y no los síntomas; gen como agente terapéutico. Las mutaciones en un gran número de genes provocan la degeneración de la retina y ceguera sin que exista actualmente cura alguna.

El ojo constituye un blanco ideal, ya que se trata de un órgano de pequeño tamaño, compartimentalizado y con privilegio inmunológico, entre otras características.

Recientes avances en terapia génica han mostrado una mejor comprensión de enfermedades hereditarias retinianas. Nuevas técnicas se ha desarrollado para mejorar la eficacia y seguridad en la liberación del vector a sus células diana, siendo el principal objetivo el epitelio pigmentario de la retina (EPR) o los fotorreceptores (FR). El método más común para la liberación del vector viral a estas células es la inyección subretiniana (SR), y en algunos casos, inyección intravítrea (IVT). Los virus recombinantes adenoasociados (AAV) o lentivirus (LV) pueden ser diseñados para maximizar la eficacia de la transducción, o simplemente para obtener la capacidad de almacenamiento deseada.

Hay actualmente múltiples ensayos clínicos en curso debido a los prometedores resultados en modelos animales y a la actuación sobre las mutaciones del gen *RPE65*, responsable de la Amaurosis congénita de Leber tipo 2 (LCA). Se trata de la primera enfermedad ocular tratada con terapia génica y supuso un resultado alentador para el desarrollo de ensayos sobre otras enfermedades retinianas como retinosis pigmentaria, coroideremia, acromatopsia, entre otras.

En este artículo se describen los avances sobre la eficacia de los ensayos clínicos en la actualidad y se discuten los posibles obstáculos y soluciones de cara al futuro de la terapia génica para enfermedades de la retina.

Palabras clave: terapia génica ocular, enfermedades hereditarias de la retina, liberación vector, ensayos clínicos, tratamiento enfermedades oculares.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ¿Qué es la terapia génica?

La terapia génica es una estrategia terapéutica novedosa y prometedora ya que presenta un enfoque diferente a la mayoría de las terapias; los genes actúan como agentes terapéuticos.

El principio de la terapia génica es sencillo. Consiste en la introducción de un gen o genes exógenos, que se puede denominar transgén, en un sistema de expresión que es un ADN plasmídico no viral o un vector viral (Urtti, 2009). Una vez introducido en las células, tejidos u órgano diana, el sistema de expresión desencadena la producción de una proteína, aprovechando las estructuras transcripcionales y traduccionales del huésped. Su uso clínico está limitado o bajo investigación en varios tipos de trastornos, algunos de los cuales se tratarán más adelante (Flomenberg *et al.*, 2018).

La terapia génica permite reemplazar, añadir, silenciar o corregir genes que están directa o indirectamente relacionados con la fisiopatología de algunas enfermedades hereditarias.

– El reemplazo genético consiste en la liberación de un gen cuya función se encuentra ausente debido, generalmente, a mutaciones por pérdida de función en el gen afectado (Chacón-Camacho *et al.*, 2015). Se utiliza, por ejemplo, en casos de retinosis pigmentaria (RP).

– El silenciamiento genético consiste en la introducción de un gen o ácido nucleico para inhibir la expresión de un gen o producto génico. Dentro de esta estrategia se han utilizado las ribozimas, los oligonucleótidos antisentido y el ARN de interferencia (ARN_i), entre otros (Chacón-Camacho *et al.*, 2015).

Se denomina ribozima a toda molécula de ARN que tiene actividad catalítica, que elimina de forma específica los ARN mensajero (ARN_m) implicados en una enfermedad. Existen ribozimas naturales, pero también se pueden crear ribozimas sintéticas con la capacidad de dirigir el corte hacia la secuencia específica a tratar (Bravo *et al.*, 2017).

Los oligonucleótidos antisentido son secuencias de ADN o ARN de pequeño tamaño y de cadena simple que se unen al ARN_m endógeno formando un dúplex e impidiendo su traducción (Bravo *et al.*, 2017).

Por último, los ARN de interferencia son pequeñas moléculas de doble cadena de ARN complementarias al ARNm endógeno; esta interacción da lugar al corte de ARNm y su posterior degradación, lo que conlleva el silenciamiento del gen (Fillat, 2004).

– La adición génica se basa en introducir una copia correcta del gen funcional con el objetivo de conseguir la expresión de la proteína en el tejido adecuado y con niveles suficientes para que pueda desarrollar su función de forma apropiada, independientemente del defecto genético primario (Fillat, 2004). Es el caso del gen *RPE65* en amaurosis congénita de Leber tipo 2 (Chacón-Camacho *et al.*, 2015).

– Por último, la corrección genética se realiza mediante la liberación correcta del gen con el propósito de inducir la recombinación homóloga y sustituir la secuencia que tiene la mutación patógena por una secuencia normal (Chacon-Camacho *et al.*, 2015).

2.2. Modalidades de terapia génica

Existen diversas modalidades de terapia génica en función del método de transferencia genética, del tipo de célula sobre el que se aplique y/o el método de aplicación (Urtti, 2009).

2.2.1. Según el método de transferencia genética (vector)

Según el método de transferencia genética, pueden dividirse en terapias mediadas por vectores virales y terapias no virales.

Los vectores no virales típicos contienen un compuesto catiónico, generalmente de naturaleza lipídica o polimérica, que limita electrostáticamente el material genético y forman un complejo estable (Solinís *et al.*, 2014). Comprenden liposomas, inyección directa de ADN, ARN de interferencia, nanopartículas, entre otros (Urtti, 2009). Todos ellos tienen el inconveniente de presentar una baja eficiencia y un efecto a corto plazo. No obstante, merecen mención debido al éxito y continuas mejoras en modelos animales (Sengillo *et al.*, 2017).

El método de elección suele ser los vectores virales, los cuales han sido modificados para no ser patógenos ni replicativos, mientras preservan sitios para transportar productos transgénicos que son insertados dentro de ellos. La elección de éste puede tener un gran impacto en la eficacia y

seguridad, por lo que se selecciona en base a una serie de características: integración, nivel y duración de la expresión, capacidad, producción del vector, etc. (Flomenberg *et al.*, 2018).

La primera generación de vectores se basaba en adenovirus, pero su capacidad de almacenamiento y seguridad dejaba que desear, por lo que actualmente se están estudiando otros vectores, concretamente virus adenoasociados y lentivirus (Huang *et al.*, 2016).

Los vectores génicos basados en virus adenoasociados gozan ya de gran aceptación entre los investigadores. Ofrecen numerosas ventajas, como que no son integrados en el genoma humano, una alta eficacia de transducción en células retinianas incluidas las del epitelio pigmentario de la retina (EPR), fotorreceptores (FR), células ganglionares y de Müller, mínimas respuestas inmunitarias (Liu *et al.*, 2017), una gama de serotipos naturales con tropismo complementario que favorece varias poblaciones de células y la duración del efecto tras una sola inyección llega incluso a un año (Urtti, 2009). Hasta el momento, tanto la seguridad de los vectores AAV como la eficacia de su transferencia parecen satisfactorias. No obstante, su capacidad de almacenamiento es insuficiente (4,7kb) en algunos casos.

Los primeros vectores AAV usaron una componente genómica y cápside proteica del serotipo 2 (AAV2/2). Muchos vectores recombinantes cuentan con la componente genómica del serotipo 2, pero cápsides de diferentes serotipos AAV, con el objetivo de adaptarse a las diferentes necesidades y optimizar la transfección. Un ejemplo sería rAAV2/5 (primer número haría referencia al serotipo del vector y el segundo al de la cápside) (Liu *et al.*, 2011; Sengillo *et al.*, 2017).

Los lentivirus (LV) son virus con envoltura lipídica y cadena simple de ARN, derivados del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH1) o el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV). Estos vectores tienen capacidad de almacenar hasta 8kb, solucionando así, el problema de empaquetamiento de los AAV (Chacón-Camacho *et al.*, 2015). Resultan eficientes en la transducción de células no divisorias y en la transducción a largo plazo. Tienen riesgo potencial de mutagénesis debido a la integración en el genoma; sin embargo, se ha demostrado que este riesgo es menor en el ojo que en los objetivos sistémicos, y el uso de secuencias autoactivantes ha reducido significativamente este riesgo (Garoon *et al.*, 2016).

2.2.2. Según el tipo de célula sobre la que se aplique

También se puede distinguir en función del tipo de célula sobre el que se aplique: terapia génica sobre células germinales o somáticas.

La terapia génica de células germinales es aquella dirigida a modificar la dotación genética de las células implicadas en la formación de óvulos y espermatozoides y por tanto, sus efectos terapéuticos se transmiten a los descendientes. Este tipo de terapia génica sería la indicada para corregir de forma definitiva las enfermedades congénitas, pero no se encuentra autorizada en ningún país actualmente. Esto es debido, sobre todo, a consideraciones éticas, en especial el peligro de la modificación del acervo/patrimonio genético de la especie humana, y el riesgo de potenciación genética, que derivaría en prácticas de eugenesia por selección artificial de genes que confiriesen caracteres ventajosos para el individuo (Ronchera-OMS *et al.*, 2002).

Por otra parte, la terapia génica somática está dirigida a modificar la dotación de células no germinales, es decir, de las células somáticas o constituyentes del organismo. Por ello, la modificación genética solo afecta al individuo, no puede transmitirse a la descendencia. Por consenso general entre los investigadores y la legislación actual, basada en motivos éticos y de seguridad, solamente se llevan a cabo protocolos clínicos en este tipo de terapia génica. En principio, no ha sido motivo de reservas éticas, salvo las relacionadas con toda manipulación genética cuyo objetivo sea potenciar algún carácter, como la altura, sin pretender tratar enfermedad alguna (Ronchera-OMS *et al.*, 2002).

2.2.3. Según el método de aplicación

Por otro lado, las células se pueden transducir ya sea *in vivo* o *ex vivo* (Figura 1).

La terapia génica *in vivo* agrupa las técnicas en las que el material genético se introduce directamente en las células del organismo permaneciendo éstas en su nicho fisiológico. De esta manera, es menos probable que estén expuestas a tensiones ambientales como hiperoxia. La gran ventaja de este tipo de terapia es su sencillez en comparación con las técnicas *ex vivo*.

Sin embargo, tienen el inconveniente de que el grado de control sobre todo el proceso de transferencia es menor, la eficiencia global es también menor (dado que no pueden amplificarse las células transducidas) y, finalmente, es difícil conseguir un alto grado de especificidad tisular (Ronchera-OMS *et al.*, 2002; Bravo *et al.*, 2017).

En cuanto a la terapia génica *ex vivo* comprende todos aquellos protocolos en los que las células a tratar son extraídas del paciente, aisladas, crecidas en cultivo y sometidas al proceso de transferencia *in vitro*. Una vez que se han seleccionado las células que han sido efectivamente transducidas, se expanden en cultivo y se introducen de nuevo en el paciente. Sus principales ventajas son ofrecer una mayor oportunidad para la selección y prueba de las células transducidas, mantener un estrecho control sobre todo el proceso, y la mayor eficacia de la transducción genética. Pero este tipo de terapia no está exenta de problemas. Existe una mayor complejidad y coste de los protocolos, imposibilidad de transducir aquellos tejidos que no son susceptibles de crecer en cultivo y el riesgo inherente a la manipulación de células en cuanto a problemas de contaminación (Ronchera-OMS *et al.*, 2002; Bravo *et al.*, 2017).

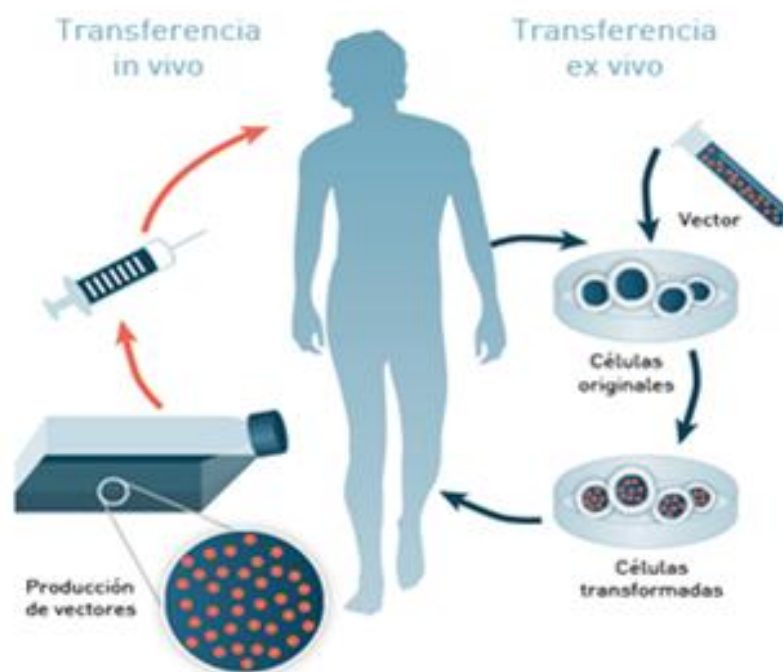


FIGURA 1. Diagrama de transferencia *in vivo* (izquierda) y *ex vivo* (derecha).

Fuente: Ronchera-OMS *et al.*, 2002.

2.3. Terapia génica: el futuro de la oftalmología.

La oftalmología ha desempeñado un papel importante en términos de comprender las enfermedades hereditarias de la retina, ya que el paciente detecta rápidamente la disfunción visual asociada a dicha enfermedad (Fischer, 2017). Estas enfermedades forman un numeroso grupo de enfermedades genéticas y fenotípicas heterogéneas que afectan a aproximadamente 1 de 2000 individuos de la población general.

2.3.1. El ojo como diana de terapia génica

El ojo es un órgano ideal para la terapia génica. En primer lugar porque se trata de un órgano pequeño y cerrado y con una pequeña cantidad de vector es suficiente (Garoon *et al.*, 2016). Se disminuyen así, los efectos tóxicos que puedan estar relacionados con el vector. Además, el microambiente intraocular creado a través de barreras mecánicas y mediadores solubles inespecíficos (sistema inmune innato) unido a mecanismos encaminados a inhibir la respuesta inflamatoria hacen que se trate de un órgano inmunoprivilegiado. Estas características reducen, en cierto modo, el riesgo de efectos secundarios sistémicos (Liu *et al.*, 2011; Kumaran *et al.*, 2018).

En relación a la estructura de este órgano, se puede añadir que facilita el seguimiento del tratamiento ya que debido a su transparencia nos ofrece la capacidad de observar la retina directamente, así como con diversas modalidades de imagen *in vivo* (Kumaran *et al.*, 2018). La naturaleza bilateral y simétrica de las distrofias permite usar un ojo como control mientras que se observa el efecto del tratamiento sobre el contralateral (Sengillo *et al.*, 2017).

Como las células retinianas son postmitóticas, se puede lograr la expresión génica persistente sin interacción entre los genes (Fischer, 2017).

La disposición de estudios de modelos animales ha acelerado el proceso de evaluación de la eficacia del tratamiento en ensayos preclínicos. También lo hace un blanco ideal la identificación de muchos genes causantes de enfermedades oculares monogénicas.

Por último, el fácil acceso quirúrgico al ojo hace posible que el material genético se administre directamente a la capa ocular deseada y a la masa celular objetivo (Ochakovski *et al.*, 2017).

2.3.2. Métodos de introducción del vector en la retina

El cirujano tiene principalmente dos opciones para entregar el vector a la retina, ya sea inyectándola en el cuerpo vítreo, utilizando el llamado enfoque intravítreo (IVT), o inyectando la solución en la retina sensorial, en un espacio potencial entre los fotorreceptores y células del epitelio pigmentario de la retina, con una inyección subretiniana (Figura 2).

La inyección intravítrea (IVT) es una técnica ampliamente utilizada para administrar agentes terapéuticos. El procedimiento generalmente se realiza bajo anestesia local (Ochakovski *et al.*, 2017).

Durante el procedimiento, los párpados y las pestañas se tratan con desinfectante como solución de povidona yodada. Posteriormente, se inserta una aguja de calibre 30 a través la esclerótica en la región de la pars plana, y se inyecta directamente en la cavidad vítreo con reflujo limitado (Garoon *et al.*, 2016).

Aunque se considera relativamente seguro, la inyección IVT presenta un cierto grado de complicaciones, siendo una de las principales la endoftalmitis (Garoon *et al.*, 2016; Ochakovski *et al.*, 2017).

La administración subretiniana de agentes terapéuticos es un procedimiento establecido en la cirugía vítreoretiniana y se disponen de procedimientos e instrumentos microquirúrgicos para llevarla a cabo. Sin embargo, deben tenerse en cuenta ciertos factores específicos, tales como pequeños volúmenes de inyección (aprox. 100-500 microlitros) y las alteraciones biomecánicas del tejido ocular debido a la enfermedad subyacente.

Se realiza con una aguja fina que avanza a través de la esclerótica, la cavidad vítreo y la retina interna. Esto genera una ampolla de suspensión vectorial que separa temporalmente la retina neurosensorial del EPR subyacente y posteriormente la suspensión vectorial ocupa el espacio subretinal (Sengillo *et al.*, 2017; Kumaran *et al.*, 2018).

Distintos ensayos han aplicado la suspensión del vector en el espacio subretiniano (Sengillo *et al.*, 2017). Por ejemplo, Bainbridge *et al.* (2008) introdujeron 1000 microlitros con intercambios gas-liquido para inyectar de forma lenta la ampolla en zona de destino.

Presenta mayor eficiencia de transducción y mayor control de biodistribución que la intravítrea (Sengillo *et al.*, 2017).

Son múltiples factores los que determinan la mejor cirugía para la entrega de vectores. El diseño del tejido diana, en este caso, la laminación vertical de la retina, es uno de los factores determinantes (Ochakovski *et al.*, 2017).

Una segunda consideración anatómica para la elección del vector es la distribución no homogénea de la densidad celular a través de la superficie de la retina.

Por último, dado que la terapia genética solo puede ser exitosa si las células diana siguen siendo viables, el estadio de la enfermedad debe ser considerado al elegir el enfoque de la aplicación

En muchos trastornos genéticos oculares en fase de ensayo clínico, un consenso sobre el tipo de inyección preferido ya ha sido alcanzado. Por ejemplo, en la amaurosis congénita de Leber, de la que hablaré más adelante, las células del EPR son el objetivo de la terapia génica y el enfoque SR se emplea en los ensayos actuales. Sin embargo, en muchos otros casos, como en las distrofias maculares y en retinitis pigmentosa, ambos enfoques se han sugerido y no existe consenso (Ochakovski *et al.*, 2017).

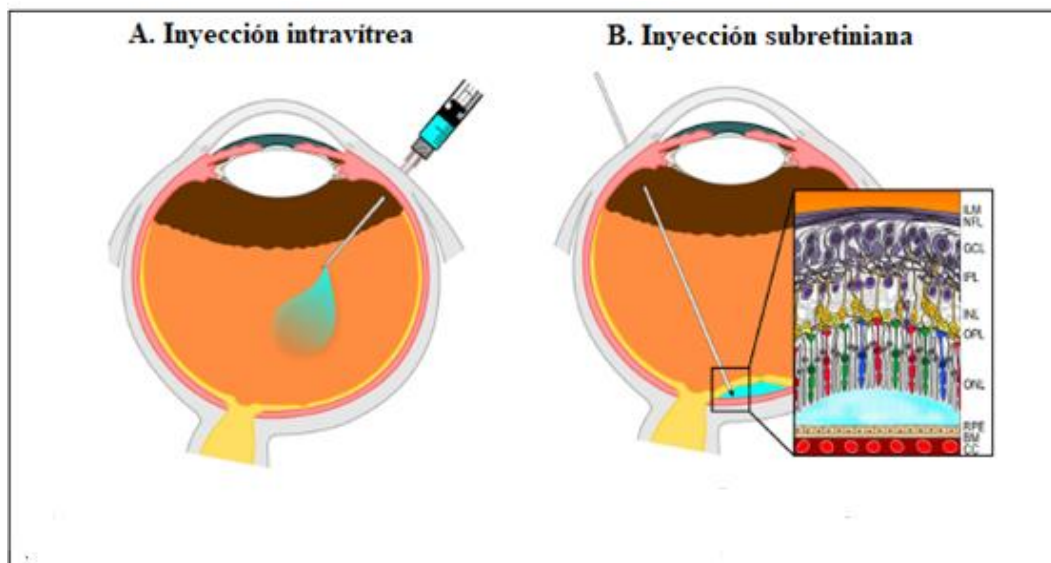


FIGURA 2. Diagrama de rutas de administración de terapia génica intraocular. (A) Inyección intravítrea, acceso a través de la pars plana para administrar la solución del vector en la cavidad intravítrea. (B) Inyección subretiniana, a través de pars plana. La aguja entra la solución en el espacio potencial entre el EPR y los FR de la capa nuclear externa (ONL). Fuente: Ochakovski *et al.*, 2017.

2.4. Justificación de la revisión

La terapia génica es en la actualidad una técnica revolucionaria y prometedora. Empecé a conocerla con la asignatura de biotecnología, y concretamente con el que es ahora mi tutor. Me pareció un tema adecuado para lo que sería mi trabajo de fin de grado.

Debido a la enorme amplitud de la terapia génica decidí centrarme en el área de enfermedades oculares por dos motivos principales:

- Curso el doble grado de farmacia y óptica y optometría, y dicho TFG debe estar referido a un tema que tenga en cuenta ambos grados.
- Conocer que el ojo constituía un blanco terapéutico ideal debido a las características que posee, y alguna de las cuales había aprendido durante estos seis años.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

El objetivo de esta revisión es recopilar la información disponible acerca de los ensayos clínicos de terapia génica existentes hasta el momento en determinadas enfermedades oculares.

3.2. Objetivos específicos

Describir y analizar los resultados existentes en los ensayos de terapia génica aplicados a las siguientes enfermedades retinianas hereditarias y adquiridas: amaurosis congénita de Leber, retinosis pigmentaria, coroideremia, acromatopsia, enfermedad de Stargardt y degeneración macular asociada a la edad.

Delimitar los genes implicados en la enfermedad sobre los que se ha realizado terapia génica.

Conocer el método de administración y el tipo de vector utilizado en el ensayo.

4. METODOLOGÍA

El trabajo que se presenta actualmente es una revisión bibliográfica basada en la evidencia científica existente sobre el tema planteado.

Para llevar a cabo dicha revisión, se han utilizado tanto bases de datos electrónicas internacionales como nacionales, y además se ha llevado a cabo una búsqueda inversa (a través de la bibliografía de otros artículos).

Los términos utilizados en las bases de datos internacionales fueron: ocular gene therapy, inherited retinal diseases, treatment of ocular disease, vector delivery. En las siguientes bases de datos internacionales: (PUBMED, UPTODATE) se ha impuesto como límite de fecha de publicación el año 2006 con el fin de obtener los resultados más actuales.

Las palabras claves utilizadas en las bases de datos nacionales fueron: terapia génica ocular, enfermedades retinianas, retinosis pigmentaria, amaurosis congénita de Leber. En la base de datos utilizada, Dialnet, no fue necesario poner límite en la fecha de publicación.

Para aquellos artículos que no eran de publicación libre, se buscó su acceso a través de la biblioteca virtual de la Universidad de Sevilla (famaUS).

También se consultaron las siguientes páginas web:

- <https://www.sefh.es>

- <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

La búsqueda se realizó durante los meses de marzo, abril y mayo de 2018 en las bases de datos anteriormente mencionadas.

Antes de realizar la búsqueda bibliográfica, se establecieron los criterios de inclusión y exclusión transversales para todas las bases de datos consultadas.

Los criterios de inclusión fueron:

- Estar publicados en inglés o castellano.
- Artículos de publicación libre o que se pueda acceder a ellos a través de la biblioteca de la Universidad de Sevilla (famaUS).
- Documentos que proporcionen información relevante sobre terapia génica ocular.

Tras leer el abstract de los trabajos identificados se excluyeron aquellos artículos que no pudieron conseguirse a texto completo.

Tras leer el texto completo de los trabajos, se identificaron en las citas de los mismos posibles trabajos que no hubieran aparecido en la búsqueda inicial y se recogieron las siguientes características de los estudios: patología ocular (amaurosis congénita de Leber, retinosis pigmentaria, coroideremia, acromatopsia, enfermedad de Stargardt, degeneración macular asociada a la edad), genes implicados en la patología, gen sobre el que se realiza la terapia génica, éxito o fracaso de la eficacia y seguridad en modelos animales y consecuente realización de ensayos clínicos en humanos, ensayos clínicos hasta el momento y resultados existentes.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los primeros estudios de la terapia génica para enfermedades genéticas retinianas fueron realizados en modelos animales, y mostraron mejoras modestas, pero de gran interés.

Con el paso de los años el conocimiento sobre alguno de los genes causantes de las diferentes enfermedades ha dirigido a una mejor eficiencia en el tratamiento de una amplia variedad de modelos animales (Figura 3).

Por otra parte, resultó un gran éxito el desarrollo preclínico de los vectores AAV para enfermedades hereditarias de la retina tanto en seguridad como en eficacia. Es por esta razón, por la que se procedió a la realización de ensayos clínicos con aplicaciones de terapia génica ocular por primera vez en seres humanos, siendo la primera amaurosis congénita de Leber tipo 2, con AAV2-RPE65 (Kumaran *et al.*, 2018).

Los resultados pioneros en esta enfermedad ocasionaron la iniciación de ensayos en diferentes enfermedades hereditarias de la retina, como retinosis pigmentaria, acromatopsia, coroideremia, entre otros.

No obstante, la terapia génica también ha sido aplicada a enfermedades retinianas adquiridas como degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

En la Tabla 1 se recopilan los ensayos clínicos completados y activos de terapia génica en las enfermedades oculares abordadas a lo largo de esta revisión.

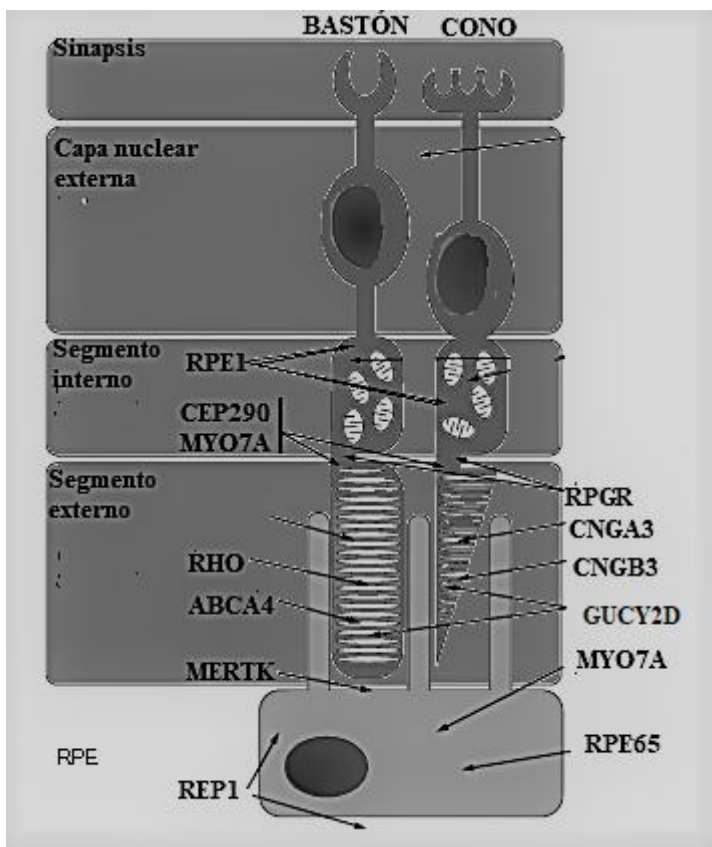


FIGURA 3. Diagrama esquemático que muestra la retina externa y la ubicación celular de los productos de los genes para los ensayos de terapia génica. Fuente: Kumaran *et al.*, 2018.

5.1 Amaurosis congénita de Leber (LCA)

Se trata de una distrofia retiniana que origina una severa pérdida de la visión desde edades muy tempranas (Chacón-Camacho *et al.*, 2015). Fue descrita por primera vez por Theodore Leber en

1869. La observación cuidadosa y descripción de los pacientes con LCA ha revelado una gran variabilidad en la progresión de la enfermedad y una amplia gama de fenotipos.

Hasta la fecha, al menos 22 genes retinianos se han encontrado asociados a esta distrofia, la mayoría de los cuales presenta un patrón de carácter recesivo (Chacón-Camacho *et al.*, 2015).

Una de las causas de LCA es la mutación del gen que codifica una proteína de 65kDa específica del EPR (RPE65), responsable de reciclar los derivados de la vitamina A, necesarios a su vez para detectar la luz en los fotorreceptores (Bainbridge *et al.*, 2008). La mutación de dicho gen es la responsable de la LCA tipo 2. Se manifiesta como una disfunción visual desde el nacimiento con retina pigmentada, nistagmo pendular y pupilas amauróticas.

Después de la eficacia mostrada en un ensayo canino de forma natural, se realizaron múltiples ensayos clínicos en humanos que se encuentran actualmente en fases variables. La mayoría de los diseños variaron con respecto al uso del promotor, el volumen de vector inyectado, y el protocolo quirúrgico. Los pacientes también variaron en edad y función visual basal (Petit *et al.*, 2016).

Los ensayos en fase I han mostrado con éxito la seguridad de la adición de genes en pacientes tanto con mutaciones de aminoácidos como con mutaciones anuladoras. Este hallazgo resultó relevante, ya que hasta entonces no se había demostrado si los pacientes con mutaciones anuladoras darían una respuesta inmunitaria contra el producto transgénico. El hecho fue demostrado más tarde por Bennett *et al.* (2012) (NCT01208389). Otros ensayos están focalizados en la seguridad de la dosis administrada a través de inyección subretiniana (Maguire *et al.*, 2008).

Un estudio de fase II aleatorizado está también en progreso con pacientes de más de 3 años. Aunque la mayoría de los pacientes mostraron algún tipo de mejora en la función visual, sobre todo, en condiciones mesópicas o escotópicas; ninguno experimentó una respuesta electrofisiológica. No se alcanzaron de este modo las expectativas alentadas por los resultados excepcionales obtenidos en los modelos animales previamente (Fischer, 2017).

El seguimiento a largo plazo de los pacientes de los primeros ensayos apunta a un posible descenso de la mejora funcional inicial (Bainbridge *et al.*, 2015; Jacobson *et al.*, 2015). Por lo tanto, la terapia génica puede no ofrecer un tratamiento permanente, requiriendo en algunos casos una segunda ronda de genes.

Los resultados de Spark Therapeutics de un ensayo en fase III en 2015 demostraron una evidencia estadísticamente significativa en la que la terapia de reemplazo genético mejoraba la habilidad de los pacientes para moverse bajo diferentes condiciones de iluminación y en pruebas

de sensibilidad a la luz comparada con los pacientes no tratados (AAV2-hRPE65 era el primer fármaco aprobado en EEUU, voretigene neparvovec). Sin embargo, los resultados de agudeza visual no mejoraban significativamente (ClinicalTrials.gov; NCT00999609).

Como explicación surgieron varias hipótesis. A pesar de la función mejorada de la retina sobreviviente, los beneficios de la terapia génica puede estar limitados por la progresión de la enfermedad, debido a la pérdida intensa y prolongada de visión desde el nacimiento, la plasticidad cortical está limitada y como tercera, la dosis aplicada no había alcanzado el umbral terapéutico (Fischer, 2017).

Para investigar la hipótesis de que una mayor provisión de *RPE65* proporcionará un beneficio más duradero y robusto, el efecto de un vector optimizado AAV 2/5 más eficiente está siendo investigado (Kumaran *et al.*, 2018).

De los 22 genes descritos hasta el momento para LCA, *GUCY2D* fue el primero identificado, de ahí la designación LCA tipo 1. *GUCY2D* codifica la enzima guanilato ciclasa 1 (GC1), localizada principalmente en los conos. GC1 es responsable de detectar niveles bajos de calcio intracelular y producir GMPc, lo que provoca que los canales de puerta de GMPc se abren y permiten que la afluencia de calcio devuelva a los FR a su estado de preexcitación. Las mutaciones en *GUCY2D* causan disfunción de las células fotorreceptoras.

Existen modelos animales en los que tanto la administración subretinal de rAAV2/8 como de AAV5 mejora la función visual durante al menos seis meses (Mihelec *et al.*, 2011; Boye *et al.*, 2015).

Pese a las fuertes evidencias preclínicas, los ensayos para el tratamiento de LCA1 no han iniciado.

5.2 Retinosis pigmentaria (RP)

Es una de las degeneraciones hereditarias de la retina más frecuente que afecta aproximadamente a 1 de cada 3000 personas (Kumaran *et al.*, 2018). Da lugar a una progresiva pérdida de la visión como consecuencia de un deterioro gradual de la retina.

Inicialmente, las personas afectadas presentan ceguera nocturna debido a la degeneración de los bastones, lo que puede llevar a la visión de túnel (pérdida campo periférico). La pérdida completa de la visión en un individuo aparece en el momento en el que se produce también la degeneración de los conos (Roy *et al.*, 2010).

Cabe destacar que es en la retinosis pigmentaria donde se han iniciado los primeros ensayos clínicos en una novedosa y revolucionaria tecnología/terapia que combina métodos ópticos con métodos genéticos, la terapia optogenética. Esto es debido a que, como ya se ha dicho, el ojo es un blanco ideal, existe una degeneración de células fotosensibles y el nervio óptico permanece intacto (Sengillo *et al.*, 2017).

Actualmente se está evaluando la eficacia de RST-001, una terapia genética administrada por vía intravítrea que expresa un receptor fotoeléctrico, que permite que las células transfectadas de la retina interna respondan a la luz incluso después de que los fotorreceptores hayan degenerado (Sengillo *et al.*, 2017). Se trata de un tipo de terapia génica para los pacientes con RP (independiente de la mutación y del gen).

Los estudios de prueba en ratones y monos titís apoyaron el inicio de un ensayo clínico que se encuentra en fase I / II (Bi *et al.*, 2006).

5.2.1 Retinosis pigmentaria no sindrómicas

Se han identificado mutaciones en más de 60 genes que dan lugar a retinosis pigmentaria no sindrómica, que por lo general se distingue por su patrón de herencia: autosómico dominante, autosómico recesivo y ligado al cromosoma X (Song *et al.*, 2007).

Más de 20 de estos genes están asociados con la forma autosómica dominante de la enfermedad, al menos 35 están asociados con la forma autosómica recesiva y se cree que 6 genes darían lugar a la forma ligada al cromosoma X.

5.2.1.1 Retinosis pigmentaria autosómica dominante.

Las mutaciones en el gen *RHO* representan el 20-30% de todos los casos de RP autosómica dominante, por lo que se cree que es la forma más frecuente de la enfermedad. La mayoría de las mutaciones del gen *RHO* alteran el plegamiento o el transporte de la proteína rodopsina. Algunas mutaciones hacen que la rodopsina se encuentre constitutivamente activa en lugar de ser activada en respuesta a la luz. Los estudios sugieren que las versiones alteradas de la rodopsina interfieren con las funciones celulares esenciales, provocando la apoptosis de las

células de los bastones. No está claro como las mutaciones de *RHO* afectan a la función y supervivencia de las células del cono (Kumaran *et al.*, 2018).

Las estrategias para suprimir la expresión del alelo de la enfermedad específicamente son actualmente difíciles debido a la heterogeneidad mutacional, más de 150 mutaciones en *RHO* han sido identificadas.

Un enfoque alternativo es suprimir tanto el alelo mutante como el alelo normal no específicamente, y simultáneamente proporcionar un gen funcional de reemplazo que se ha modificado para resistir la supresión. Este enfoque puede mejorar el resultado en un modelo de roedor, pero aún no se ha explorado en humanos afectados (Kumaran *et al.*, 2018).

5.2.1.2 Retinosis pigmentaria autosómica recesiva.

La rápida degeneración de los bastones en la forma recesiva de la RP es causada por mutaciones anuladoras en algunos genes que codifican proteínas involucradas tanto en la fototransducción como en la regulación de FR del segmento externo (Roy *et al.*, 2017).

Uno de los genes implicados es el que codifica al receptor de la tirosin quinasa (*MERTK*), expresado en células del EPR y que controla la fagocitosis en el EPR. Por lo tanto, su mutación ocasionaría una acumulación los residuos generados por los FR y la consecuente degeneración de éstos (Bennet, 2017; Kumaran *et al.*, 2018).

Estudios previos han demostrado la eficacia y la seguridad utilizando *MERTK* humano empaquetado en virus adenoasociados en el tratamiento de ratas y ratones con deficiencia de *MERTK*. Después de una fase preclínica que confirma la seguridad del vector en monos, se inicia un ensayo de fase I con seis pacientes con RP relacionada con *MERTK* (ClinicalTrials.gov; NCT01482195).

La inyección subretinal de rAAV2-VMD2-hMERTK se asoció con perfiles de seguridad oculares y sistémicos aceptables basados en un seguimiento de 2 años. Ninguno de los pacientes desarrolló complicaciones que pudieran atribuirse al vector con certeza. Tres pacientes mostraron una mejor agudeza visual tras la cirugía, aunque dicha mejora no permaneció a lo largo del seguimiento (Sengillo *et al.*, 2017).

Es posible que la calidad del tratamiento, incluida la cantidad de células tratadas y los niveles de expresión de *MERTK*, hayan sido demasiado bajos como para promover beneficios a largo plazo (Petit *et al.*, 2016).

5.2.1.3 Retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X

La RP ligada al cromosoma X o ligada al sexo es causada en un 70-80% de los casos por mutaciones en el gen regulador de la GTPasa (*RPGR*). Se cree que la proteína que codifica este gen regula la distribución de proteínas en el cilio de conexión al dirigir o restringir el transporte de proteínas al segmento externo del fotorreceptor (Kumaran *et al.*, 2018).

En los modelos de roedores y caninos con esta condición, la administración de genes mediados por AAV usando construcciones truncadas u optimizadas por codones para mejorar la estabilidad del transgén disminuyó la degeneración de la retina. Ensayos en fase I / II de terapia génica mediada por AAV en humanos afectados están en curso (ClinicalTrials.gov; NCT03116113, NCT03252847).

5.2.2 Retinosis pigmentaria sindrómica

Con menos frecuencia, esta enfermedad se produce como parte de síndromes que afectan a otros tejidos y órganos del organismo, por lo que se denomina retinosis pigmentaria sindrómica. La forma más habitual de la RP sindrómica es el síndrome de Usher, caracterizado por pérdida de visión y audición (Chacón-Camacho *et al.*, 2015).

5.2.2.1 Síndrome de Usher

El síndrome de Usher es una afección hereditaria de carácter recesivo caracterizada por deterioro de la audición neurosensorial y deterioro de la vista debido a la degeneración de los conos. Es clínica y genéticamente heterogéneo y está asociado con defectos en al menos 10 genes.

El síndrome de Usher tipo 1B (USH1) es causado por defectos en el gen miosina VIIa (*MYO7A*), que resulta en acumulación de opsina en los cilios de las células fotorreceptoras. Debido al gran tamaño de *MYO7A* (8.1kb), se excede la capacidad de transporte de los vectores convencionales AAV2/2 y se han buscado estrategias alternativas (Roy *et al.*, 2017). Sanofi (París, Francia) ha desarrollado un medicamento UshStat® para administrar el gen terapéutico en un vector lentivirus. La inyección subretinal de EIAV-MYO7A es bien tolerado en primates

no humanos y el beneficio de la visión en seres humanos se está explorando en un ensayo clínico de fase I/II que se prevé que termine en 2018 (ClinicalTrials.gov; NCT01505062).

5.3 Acromatopsia (ACHM)

La acromatopsia es un trastorno hereditario de carácter recesivo, que afecta a 1 de cada 30000 personas, caracterizado por una ausencia parcial o total de la visión del color. Involucra también otros problemas en la visión, que incluyen una mayor sensibilidad a la luz y deslumbramiento (fotofobia), movimientos involuntarios de los ojos hacia adelante y hacia atrás (nistagmo) y una agudeza visual significativamente reducida (baja agudeza visual) (Sengillo *et al.*, 2017; Kumaran *et al.*, 2018).

La acromatopsia es el resultado de mutaciones en alguno de estos genes: *CNGA3*, *CNGB3*, *GNAT2*, *PDE6C* o *PDE6H*. Los genes más comúnmente implicados en esta condición son el gen *CNGB3* (más frecuente en pacientes de descendencia europea) y el *CNGA3* que codifican una subunidad del canal iónico activado por nucleótidos cíclicos, componentes fundamentales en la cascada de fototransducción. Así, las mutaciones de éstos ocasionan que los conos no reaccionen adecuadamente a la luz (Kumaran *et al.*, 2018).

En personas con acromatopsia completa, los conos no son funcionales, y la visión depende completamente de la actividad de los bastones. La pérdida de la función del cono conduce a una falta total de visión del color y causa los otros problemas de visión. Las personas con acromatopsia incompleta conservan alguna función de cono. Estas personas tienen visión de color limitada, y los demás problemas de visión tienden a ser menos severos (Roy *et al.*, 2017).

En ensayos de terapia génica mediada por vectores AAV se ha comprobado una mejora de la función de los conos tanto en *CNGA3*-ACHM como en *CNGB3*-ACHM en modelos de roedores, y de *CNGB3*-ACHM en modelos caninos.

Actualmente, debido a los resultados conseguidos en modelos animales, se han iniciado cinco ensayos clínicos sobre humanos afectados: tres cuyo objetivo es la forma *CNGB3* de la enfermedad (ClinicalTrials.gov; NCT02599922, NCT03001310, NCT02946879) y dos dirigidos al *CNGA3* (ClinicalTrials.gov; NCT02610582, NCT02935517). Estos estudios están usando promotores específicos para FR y AAVs (AAV8, AAV2tYF) que transducen FR más eficientemente que AAV2 (Bennet, 2017). Con ellos se pretende determinar la medida en que este enfoque podría beneficiar la agudeza visual, la discriminación del color, la fotofobia y el nistagmo.

TABLA 1. Ensayos clínicos completados y activos de terapia génica en determinadas enfermedades oculares. Recopilado de: ClinicalTrials.gov.

Enfermedad	Gen	Nombre del vector	Liberación	ID ensayo clínico	Fase	Edad	Fecha inicio / Fecha fin	Patrocinador
Amaurosis congénita de Leber	<i>RPE65</i>	tgAAAG76 rAAV2/2-hRPE65p-hRPE65	SR	NCT00643747	I/II	Niño, Adulto	2007 / 2014	University college (London)
Amaurosis congénita de Leber	<i>RPE65</i>	Voretigene Neparvovec AAV2-hRPE65v2	SR	NCT01208389 NCT00516477	I/II	Niño, Adulto, Anciano	2007 / 2024 2010 / 2026	Spark Therapeutics (USA)
Amaurosis congénita de Leber	<i>RPE65</i>	rAAV2-CBSB-hRPE65	SR	NCT00481546	I	Niño, Adulto, Anciano	2007 / 2026	University of Pennsylvania (USA)
Amaurosis congénita de Leber	<i>RPE65</i>	rAAV2-hRPE65	SR	NCT00821340	I	Niño, Adulto, Anciano	2009 / 2017	Hadassah Medical Organization
Amaurosis congénita de Leber	<i>RPE65</i>	rAAV2-CB-hRPE65	SR	NCT00749957	I/II	Niño, Adulto, Anciano	2009 / 2017	Applied Technologies Corp (USA)
Amaurosis congénita de Leber	<i>RPE65</i>	rAAV2/4-hRPE65	SR	NCT01496040	I/II	Niño, Adulto	2011 / 2014	Nantes University Hospital (Francia)
Amaurosis congénita de Leber	<i>RPE65</i>	AAV2-hRPE65v2 voretigene neparvovec	SR	NCT00999609	III	Niño, Adulto, Anciano	2012 / 2029	Spark Therapeutics (USA)
Amaurosis congénita de Leber	<i>RPE65</i>	AAV2/5-OPTIRPE65	SR	NCT02781480 NCT02946879	I/II Observacional	Niño, Adulto, Anciano	2016 / 2018 2016 / 2023	MeiraGTx UK II Ltd (UK)
Amaurosis congénita de Leber	<i>CEP290</i>	Fármaco: QR-110	IVT	NCT03140969	I/II	Niño, Adulto, Anciano	2017 / 2018	ProQR Therapeutics (US)
Retinosis pigmentaria autosómica recesiva	<i>MERTK</i>	rAAA2-VMD2-hMERTK	SR	NCT01482195	I	Niño, Adulto, Anciano	2011 / 2023	King Khaled Eye Specialist Hospital (Arabia Saudi)
Retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X	<i>RPGR</i>	rAAV2-tYF-GRK1-RPGR	SR	NCT03316560	I/II	Niño, Adulto	2018 / 2024	Applied Technologies Corp (USA)
Retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X	<i>RPGR</i>	AAV2/5-hRKp.RPGR	SR	NCT03252847	I/II	Niño, Adulto, Anciano	2017 / 2020	MeiraGTx (UK)
Retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X	<i>RPGR</i>	AAV8-RPGR	SR	NCT03116113	I/II	Adulto, Anciano	2017 / 2019	NighthRx (UK)
Retinosis pigmentaria		RST-001	IVT	NCT02556736	I/II	Adulto	2019 / 2033	Allergan (USA)
Síndrome de Usher tipo 1	<i>MYO7A</i>	UshSthata EIAV-CMV-MYO7A	SR	NCT01505062 NCT02065011	I/II Observacional	Adulto, Anciano	2012 / 2020 2013 / 2035	Sanofi (Francia)

TABLA 1. Continuación.

Enfermedad	Gen	Nombre del vector	Liberación	ID ensayo clínico	Fase	Edad	Fecha inicio / Fecha fin	Patrocinador
Acromatopsia	<i>CNGA3</i>	AGTC-402 rAAV2YF-PR1.7-hCNGA3	SR	NCT02935517	I/II	Niño, Adulto, Anciano	2017 / 2023	Applied Technologies Corp (USA)
Acromatopsia	<i>CNGA3</i>	rAAV8.hCNGA3	SR	NCT02610582	I/II	Adulto, Anciano	2015 / 2017	STZ Eyetrial (Alemania)
Acromatopsia	<i>CNGB3</i>	rAAV2YF-PR1.7-hCNGB3	SR	NCT02599922	I/II	Niño, Adulto, Anciano	2016 / 2022	Applied Technologies Corp (USA)
Acromatopsia	<i>CNGB3</i>	AAV2/8-hCARp.hCNGB3	SR	NCT03001310 NCT03278873	I/II A largo plazo	Niño, Adulto, Anciano	2016 / 2019 2017 / 2023	MeiraGTx (UK) II Ltd (UK)
Coroideremia	<i>REPI</i>	AAV2-REPI	SR	NCT03496012	III	Adulto, Anciano	2017 / 2020	Nightstar Therapeutics (USA)
Coroideremia	<i>REPI</i>	AAV2-REPI	SR	NCT03507686	II	Adulto, Anciano	2017 / 2020	Nightstar Therapeutics (USA)
Coroideremia	<i>REPI</i>	AAV2-REPI	SR	NCT02553135	II	Adulto, Anciano	2015 / 2018	Byron Lam (USA)
Coroideremia	<i>REPI</i>	AAV2-REPI	SR	NCT02671539	II	Adulto, Anciano	2016 / 2018	STZ Eyetrial (Alemania)
Coroideremia	<i>REPI</i>	rAAV2.REPI	SR	NCT02077361	I/II	Adulto, anciano	2015 / 2017	Ian M. McDonald (USA)
Coroideremia	<i>REPI</i>	rAAV2.REPI	SR	NCT01461213	I/II	Adulto, Anciano	2011 / 2017	University Oxford (UK)
Coroideremia	<i>REPI</i>	AAV-mediated REPI gene replacement	SR	NCT02407678	II	Adulto, Anciano	2016 / 2021	University Oxford (UK)
Coroideremia	<i>CHM</i>	AAV2-hCHM	SR	NCT02341807	I/II	Adulto, Anciano	2015 / 2019	Spark Therapeutics (USA)
Enfermedad de Stargardt	<i>ABCA4</i>	SAR422459	SR	NCT01367444 NCT01736592	I/II	Niño, Adulto, Anciano	2011 / 2019	Sanofi (Francia)
DMAE neovascular	<i>S-Flt</i>	rAAV.sFIt-1	SR	NCT01494805	I/II	Adulto	2011 / 2017	Lions Eye Institute
DMAE neovascular	<i>S-Flt</i>	AAV2-sFIt0	IVT	NCT01024998	I	Adulto	2010 / 2018	Genzyme (Francia)
DMAE neovascular	endostatin, angiosstatin	Retinostat: endostatin and angiosstatin	SR	NCT01301443	I	Adulto	2011 / 2015	Oxford BioMedica
DMAE atrófica	<i>CD59s</i>	AAVCAGsCD59	IVT	NCT03144999	I	Adulto	2017 / 2019	Hemera BioSciences (USA)

5.4 Coroideremia (CHM)

La coroideremia es una distrofia retiniana hereditaria ligada al cromosoma X que tiene una prevalencia de 1 en 50000-100000 individuos y que se caracteriza por una degeneración progresiva de la coriocapilaris, los FR y el EPR (Garoon *et al.*, 2016). Es causada por mutaciones en el gen *CHM* que codifica la proteína Rab escort 1(REP1), requerida en el transporte vesicular intracelular (Kumaran *et al.*, 2018).

Los afectados (masculinos) comienzan a presentar ceguera nocturna en la infancia seguida de pérdida de campo visual periférico, generalmente entre la primera y segunda década de vida. En la mayoría de los casos, la visión central está preservada hasta la edad de 40-50 años (Chacón-Camacho *et al.*, 2015).

Los estudios de terapia génica para CHM se iniciaron por primera vez en la universidad de Oxford, siendo el objetivo inicial demostrar la seguridad y eficacia en términos de prevenir un mayor deterioro de la visión. En el ensayo clínico de fase I en Oxford, seis pacientes masculinos (35-63 años) fueron aceptados y tratados con la inyección subretiniana del vector AAV2-REP1 (MacLaren *et al.*, 2014). Dos pacientes con CHM avanzada ganaron en AV en torno a 2-4 líneas, mientras que los otros 4 pacientes mantuvieron la AV hasta seis meses después del tratamiento. De esta manera se muestra que se podría preservar la AV y evitar o prevenir la degeneración macular, que es característica de las etapas finales de la enfermedad.

Actualmente hay seis ensayos diferentes de CHM (con más de 75 pacientes adultos varones) en proceso. Los informes descritos hasta el momento (ensayos clínicos fase I / II) indican que hay un alto grado de seguridad asociado con el procedimiento de inyección subretiniana del vector AAV2 que expresa REP1 (Bennet, 2016). Se informa que el proceso es bien tolerado y que se encuentra relacionado con mejoras de la función visual en algunos casos.

Tras el seguimiento a largo plazo se determinará si la mejora de la agudeza visual puede persistir en un subconjunto de pacientes (ClinicalTrials.gov; NCT01461213, NCT02553135, NCT02671539, NCT02077361).

5.5 Enfermedad de Stargardt (STGD1)

La enfermedad de Stargardt es la forma más común de degeneración macular heredada, con una incidencia de 1 a 10000, caracterizada por un deterioro progresivo y severo de la visión desde la primera infancia o adolescencia (Sengillo *et al.*, 2017).

En la mayoría de los casos, este proceso es debido a mutaciones en el gen *ABCA4*. Se han identificado más de 640 mutaciones en el gen *ABCA4* responsables de la enfermedad de Stargardt. Aunque también puede ser responsable de otras distrofias retinianas, incluyendo la retinosis pigmentaria y degeneración macular asociada a la edad (Chacón-Camacho *et al.*, 2015).

Este gen codifica una proteína que se encuentra en los fotorreceptores, y se encarga de transportar sustancias potencialmente tóxicas, originadas tras el proceso de fototransducción, al exterior de los fotorreceptores. De esta manera, las mutaciones en el gen conducen a la acumulación intracelular de retinoide tóxico y la degeneración de la retina externa.

La liberación de un gen normalmente funcional, vía terapia génica, a los FR que portan la mutación en el gen *ABCA4* debe ser considerada como una posible "cura" para enfermedades asociadas a *ABCA4*, debido a que estas enfermedades son recesivas, y a que la degeneración de las células retinianas en las enfermedades por *ABCA4* es tardía; por lo tanto, esto permite una ventana de tiempo razonable para una posible intervención quirúrgica (Chacón-Camacho *et al.*, 2015).

El gen *ABCA4* excede la capacidad de carga de los vectores AAV. De esta manera, se ha buscado estrategias alternativas para el reemplazo de genes. Actualmente, dos vectores virales diferentes se encuentran en investigación (Garoon *et al.*, 2016).

Se está estudiando la eficacia de SAR422459, un vector lentiviral basado en el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) que se ha informado que mejora el resultado de la condición en un modelo de roedor. Aunque la extrapolación a los humanos requiere precaución, la alta eficiencia de transducción de los fotorreceptores y la reducción estadísticamente significativa de la acumulación del tóxico en el modelo de ratón de STGD1 sugiere que el gen lentiviral es una herramienta potencialmente eficiente para tratar las enfermedades asociadas a *ABCA4* (Kong *et al.*, 2008; Chacón-Camacho *et al.*, 2015).

Así, un ensayo clínico de fase I/II con inyección subretinal a tres concentraciones diferentes del vector se está realizando con un seguimiento a largo plazo (ClinicalTrials.gov; NCT01367444).

El único informe hasta la fecha menciona que 8 pacientes han sido tratados en el primer nivel de dosis sin ningún efecto adverso serio.

Otro estudio de tolerabilidad y seguridad (fase I/II) se está realizando sobre pacientes con bajo visión que reciben diferentes concentraciones de MA09-hRPE bajo administración subretiniana (NCT01345006; Garoon, 2016).

5.6. Degeneración macular asociada a la edad (DMAE)

Como ya se ha dicho anteriormente la terapia génica también se ha aplicado en enfermedades retinianas adquiridas.

La degeneración macular asociada a la edad es la principal causa de pérdida de visión en mayores de 60 años. La DMAE puede ser clasificada como neovascular (DMAE húmeda) o atrófica (DMAE seca) (Roy *et al.*, 2010).

La DMAE neovascular se caracteriza por una proliferación anómala del vaso coroideo por detrás de la mácula. La excesiva secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) juega un papel importante en la patogénesis de la DMAE húmeda, y el estándar habitual para su tratamiento es la administración intravítrea, de manera repetida, de anticuerpos terapéuticos anti-VEGF. La terapia génica tendría una ventaja teórica y es que reduciría o eliminaría la necesidad de las repetidas inyecciones de inhibidores anti-VEGF (Kumaran *et al.*, 2018).

La inyección subretinal de un vector rAAV 2/2 que expresa el receptor soluble de VEGF sFlt-1 parece estar bien tolerado en humanos con DMAE neovascular, aunque se necesitará un estudio más amplio para determinar el beneficio (NCT0149805; (Rackozy *et al.*, 2015; Constable *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en primates no humanos, Genzyme/Sanofi inició un ensayo clínico en fase I utilizando AAV2-sFLT01 con administración intravítrea para DMAE húmeda (Chacón-Camacho *et al.*, 2015).

Oxford Biomedica ha iniciado también ensayos clínicos para la administración subretinal de Retinostat™, un lentivirus que contiene angiostatina (producto del metabolismo del colágeno XVIII) y endostatina (un producto del metabolismo del fibrinógeno), para prevenir el crecimiento de los vasos y consecuente disminución de la visión (Chacón-Camacho *et al.*, 2015; Kumaran *et al.*, 2018). Los resultados del estudio mostraron que la administración subretiniana era bien tolerada y los niveles se mantuvieron hasta la última medida (NCT01301443; Campochiaro *et al.*, 2016).

La DMAE atrófica se caracteriza por la disfunción y degeneración de las células del EPR, y supone el 85-90% de todos los casos de la DMAE. Se caracteriza por la disfunción y degeneración de las células del EPR, formación de drusas y pérdida de los vasos en la zona coriocapilar.

Se encuentra asociada a la activación inapropiada de la cascada complemento, la cual está formada por 3 brazos que convergen para formar un complejo similar a un poro en la superficie de las células llamado complejo de ataque a la membrana (MAC). La acumulación de MAC en las superficies celulares conduce al daño celular y la muerte. Las células normales dentro del cuerpo humano producen una proteína en sus superficies celulares llamada CD59 que bloquea la formación de MAC. En el caso de la DMAE atrófica existe una acumulación de éste (Kumaran *et al.*, 2018).

El ensayo de terapia génica consiste en una administración intravítrea de AAVCAGsCD59 a diferentes dosis, que hace que las células retinianas normales aumenten la expresión de CD59s (ClinicalTrials.gov; NCT03144999).

6. CONCLUSIONES

Los beneficios de la terapia génica para LCA-RPE65 han llevado a la FDA a aprobar en 2018 la primera terapia génica para esta enfermedad ocular. Esto ha supuesto una rápida expansión en ensayos clínicos que exploran la seguridad y la eficacia de la terapia génica para otras enfermedades retinianas heredadas y adquiridas.

No cabe duda que la terapia génica ocular continuará mejorando a medida que conozcamos la patogénesis y evolución de la enfermedad y desarrollemos la capacidad de atacar las mutaciones específicas del paciente con mayor precisión y con una mejor administración del gen dirigido. Un área activa de investigación es el desarrollo adicional en el diseño de vectores, como por ejemplo, vectores virales con capacidades más precisas de selección a través de las cápsides de AAV.

No obstante, se debe tener en cuenta que el estadio de la enfermedad es una consideración crucial para la terapia génica en la retina, ya que muchas condiciones dan como resultado una destrucción progresiva e irreparable de la retina. Para pacientes con enfermedad en etapa avanzada, pueden requerirse enfoques más agresivos, como el uso de herramientas optogenéticas.

7. BIBLIOGRAFÍA

Bainbridge JWB, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K *et al.* Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N England J Med* 2008;358(21):2231-2239.

Bainbridge JWB, Mehat MS, Sundaram V, Robbie SJ, Barker SE, Ripamonti C *et al.* Long-term effect on gene therapy on Leber's congenital amaurosis, *N England J Med* 2015; 372(20):1887-1897.

Bennet J, Ashtari M, Wellman J, Marshall KA, Cyckowski LL, Chung DC *et al.* AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Sci Transl Med* 2012;4(120):120ra115.

Bennet J. Taking stock of retinal gene therapy: Looking back and moving forward. *Molecular Therapy* 2017;25(5):1076-1094.

Bi A, Cui J, Ma YP, Olshevskaya E, Pu M, Dizhoor AM *et al.* Ectopic expression of a microbial-type rodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 2006;50:23-33.

Boye SL, Peterson JJ, Choudhury S, Min SH, Ruan Q, McCullough KT *et al.* Gene Therapy fully restores vision to the all-cone *Nrl(-/-) Gucy2e(-/-)* mouse model of leber congenital amaurosis-1. *Hum Gene Ther.* 2015;26(9):575-592.

Bravo A & Liñán JC. *Terapia génica: presente y futuro.* Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid 2017.

Campochiaro PA, Lauer AK, Sohn EH, Mir TA, Naylor S, Anderton MC *et al.* Lentiviral Vector Gene Transfer of Endostatin/Angiostatin for Macular Degeneration (GEM) Study. *Hum Gene Ther.* 2017;28(1):99-111.

Chacón-Camacho OF, Astorga-Carballo A & Zenteno JC. *Terapia génica para enfermedades hereditarias oftalmológicas: avances y perspectivas.* *Gac Med Mex* 2015;151:501-11.

ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/home> (Última consulta el 20 Mayo, 2018).

Constable IJ, Pierce CM, Lai CM, Magno AL, Degli-Esposti MA, French MA *et al.* Phase 2a randomized clinical trial: safety and post hoc analysis of subretinal rAAV.sFLT-1 for wet age-related macular degeneration. *EBioMedicine* 2016;14:168–75.

DiCarlo JE, Mahajan VB & Tsang H. Gene therapy and genome surgery in the retina. *J Clin Invest* 2018;12(6):2177-2188.

Fillat C. Perspectivas actuales de la terapia génica. *BSCP Can Ped* 2004;28(2,3):602-608.

Fischer MD. Sobre la terapia génica para las enfermedades de la retina. *Ophthalmologica* 2017;238(suppl 1):48-55.

Flomenberg P & Rene D. Overview of gene therapy, gene editing and gene silencing. *UptoDate* [en línea]. [Consultado en Mayo 2018]. Disponible en: https://www.uptodate.com/contents/overview-of-gene-therapy-gene-editing-and-gene-silencing?search=overview%20of%20gene%20therapy,%20gene%20editing%20and%20gene%20silencing&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1

Garoon RB & Stout T. Update on ocular gene therapy and advances in treatment of inherited retinal diseases and exudative macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* 2016;27(3):268-273.

Ghazi NG, Abboud EB, Nowilaty SR, Alkuraya H, Alhommadi A, Cai H *et al.* Treatment of retinitis pigmentosa due to MERTK mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: results of a phase I trial. *Hum Genet* 2016;135(3):327-343.

Huang SS, High K & Toso R. Ocular Gene Therapy-The future is now. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology* 2016;5(4):227-228.

Jacobson SG, Cideciyan AV, Roman AJ, Sumaroka A, Schwartz SB, Heon E *et al.* Improvement and decline in vision with gene therapy in childhood blindness. *N Engl J Med* 2015;372(20):1920-1926.

Kong J, Kim SR, Binley K, Pata I, Doi K, Mannik J *et al.* Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy. *Gene therapy* 2008;15:1311-1320.

Kumaran N, Michaelides M, Ali RR & Bainbridge JWB. Retinal gene therapy. *British Medical Bulletin* 2018; 1-13. doi:10.1093/bmb/ldy005

Liu MM, Tuo J & Chan CC. Gene therapy for ocular diseases. *Br J Ophthalmol* 2011; 95:604-612.

MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, Cottrill CL, Tolmachova T, Seymour L *et al.* Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet* 2014; 383:1129-37.

Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN Jr, Mingozzi F, Bennicelli J *et al.* Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N England J Med* 2008;358(21):2240-2248.

Mihelec M, Pearson RA, Robbie SJ, Buch PK, Azam SA, Bainbridge JW, *et al.* Long-term preservation of cones and improvement in visual function following gene therapy in a mouse model of leber congenital amaurosis caused by guanylate cyclase-1 deficiency. *Hum Gene Ther.* 2011;22(10):1179–1190.

Ochakovski GA, Bartz-Schmidt KU & Fischer D. Retinal gene therapy: Surgical vector delivery in the translation to clinical trials. *Front. Neurosci.* 2017;11:174. doi:10.3389/fnins.2017.00174

Petit L, Khanna H & Punzo C. Advances in gene therapy for diseases of the eye. *Human Gene Therapy* 2016;27(8):563-79.

Rakoczy EP, Lai CM, Magno AL, Wikstrom ME, French MA, Pierce CM *et al.* Gene therapy with recombinant adeno-associated vectors for neovascular age-related macular degeneration: 1 year follow up of a phase 1 randomised clinical trial. *Lancet* 2015;386:2395–403.

Ronchera-OMS & González JM. Capítulo 6:Terapia génica. Disponible en: www.sefh.es

Roy K, Stein L & Kaushal S. Ocular gene therapy: An evaluation of recombinant adeno-associated virus-mediated gene therapy interventions for the treatment of ocular disease. *Human Gene Therapy* 2010;21:915-927.

Sengillo JD, Justus S, Cabral T & Tsang SH. Correction of Monogenic and Common Retinal Disorders with Gene Therapy. *Genes* 2017;8(2):53.

Solinís MA, del Pozo-Rodríguez A, Apaolaza PS & Rodríguez-Gascón A. Treatment of ocular disorders by gene therapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015 Sep;95(Pt B):331-42.

Urtti A. Promesas de la terapia génica ocular. *Arch Soc Esp Oftamol* 2009;84:57-60.