

El ADN en la innovación de terapias génicas

Punto Farmacológico



SUMARIO

I. Justificación

II. Introducción: aspectos generales sobre el ADN

III. Patología molecular y fundamentos del uso terapéutico del ADN

- CRISPR y los progresos en la edición genética

IV. Terapias génicas

- Aplicaciones clínicas de la terapia génica
- Medicamentos de terapia génica autorizados por la Comisión Europea

V. Avances en edición genética y vacunas de ADN

VI. El papel del farmacéutico

VII. Bibliografía

JUSTIFICACIÓN

El 25 de abril de 1953 se publicaba en la prestigiosa revista *Nature* un artículo denominado “Estructura molecular de los ácidos nucleicos; una estructura para el ácido desoxirribonucleico”. Los autores, James Watson y Francis Crick, fueron las caras visibles del trabajo de un equipo que descubrió la estructura en doble hélice de ADN, abriendo el camino hacia el estudio del genoma humano y el desarrollo de novedosas técnicas de biología molecular que han supuesto una revolución en el ámbito terapéutico. En conmemoración de esta efeméride, cada 25 de abril se celebra el **Día Mundial del ADN**.

Uno de los primeros pasos en este camino se dio con la utilización de las enzimas de restricción para aislar y clonar genes concretos, permitiendo la identificación de regiones específicas del genoma asociadas a la presencia de una determinada enfermedad. Estos avances constituyeron la base conceptual que dio cabida, varias décadas después, al desarrollo de medicamentos capaces de transferir con objetivos terapéuticos material genético nuevo a un individuo, un tipo de terapia avanzada conocida como **terapia génica**.

De acuerdo a su definición legal, los medicamentos de terapia génica son aquellos que *incluyen un principio activo que contiene un ácido nucleico recombinante, o están constituidos por él y son utilizado en seres humanos, o administrados a los mismos, con objeto de regular, reparar, sustituir, añadir o eliminar una secuencia génica; además, su efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico debe depender directamente de la secuencia del ácido nucleico recombinante que contengan o del producto de la expresión genética de dicha secuencia*.

Las aplicaciones clínicas de los medicamentos de terapia génica son múltiples, tanto en enfermedades monogénicas, ocasionadas por la

mutación en un único gen, como en enfermedades relacionadas con múltiples factores, como ocurre en la mayor parte de los cánceres.

En el ámbito de las enfermedades monogénicas, las terapias génicas han permitido obtener ya grandes avances en enfermedades neuromusculares como la atrofia muscular espinal, para la que se dispone del fármaco onasemnogén abeparvovec, o la hemofilia B, con etranacogén dezaparvovec. Por otra parte, aproximadamente el 40 % de los medicamentos de terapia génica autorizados en la Unión Europea cuenta con indicación en algún tipo de cáncer, especialmente en neoplasias hematológicas como la leucemia linfoblástica aguda o distintos tipos de linfoma. Aunque con una presencia creciente, de los 14 medicamentos que actualmente disponen de una autorización de comercialización en el marco de la UE, únicamente 5 (36 %) están comercializados en España.

Además, es reseñable también el interés actual en la investigación en edición genética, aprovechando la enorme variedad de posibilidades que ofrece la tecnología CRISPR-Cas9. En febrero de 2024 se autorizó la primera terapia génica en la que se ha empleado esta técnica de edición, exagamglogén autotemcel, con indicación en β -talasemia y anemia de células falciformes.

El Consejo General de Colegios Farmacéuticos desea sumarse a la celebración de este Día Mundial del ADN con la publicación de este informe, en el que se recogen los principales avances que se han producido tanto en la investigación como en la aplicación práctica de los medicamentos de terapia génica. Asimismo, se resalta la importante labor que ejercen los farmacéuticos a nivel hospitalario y comunitario, así como en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas.

INTRODUCCIÓN: ASPECTOS GENERALES SOBRE EL ADN

El **ácido desoxirribonucleico (ADN)** es un polímero aniónico de desoxirribonucleótidos fosfatados cuya unidad primaria es el nucleótido, constituido por el glúcido desoxirribosa, que posee un grupo fosfato unido a su carbono 5 (C5) y una base nitrogenada en el carbono 1 (C1). Lo que diferencia a los nucleótidos entre sí es la presencia de las diferentes bases nitrogenadas que tienen unidos los restos glucídicos, pudiéndose distinguir entre las bases púricas (adenina y guanina) y las bases pirimidínicas (citosina y timina, presentes en el ADN, y uracilo en el ARN).

El ADN es una **hélice doble dextrógira** constituida por dos cadenas de nucleótidos. Cada cadena tiene un extremo 5', en el que se encuentra un grupo fosfato, y un extremo 3', que posee un grupo hidroxilo (OH). La unión entre los nucleótidos se da gracias a enlaces fosfodiéster entre los grupos fosfato y los OH del residuo de desoxirribosa del nucleótido. Estas dos cadenas se encuentran enfrentadas de forma antiparalela, lo que quiere decir que el extremo 5' de una cadena siempre está unido al extremo 3' de la otra. Los emparejamientos entre las bases nitrogenadas se dan gracias a la presencia de enlaces de hidrógeno entre éstas, poseyendo la unión adenina-timina (A-T)

dos puentes de hidrógeno, y la unión guanina-citosina (G-C), tres; esto resulta de gran interés en genética, ya que cuanto mayor es el contenido de pares de bases G-C mayor temperatura se necesitará para separar o desnaturalizar la doble hélice del ADN al ser una unión más estable termodinámicamente. La estructura de doble hélice que el ADN adquiere se debe a la naturaleza anfipática de la molécula: las bases nitrogenadas son hidrofóbicas y se encuentran en el interior de la hélice, pero los glúcidos y fosfatos son hidrófilos y están en la zona exterior de la cadena (Nelson *et al.*, 2017).

En la década de 1940 se consiguió descomponer tanto el ADN como el ARN en sus distintas partes, que son fundamentalmente bases nitrogenadas, ácido fosfórico y un azúcar, la ribosa en el caso del ARN y la desoxirribosa en el caso del ADN. Las bases nitrogenadas que componen el ADN –adenina, citosina, guanina y timina– son las mismas que están presentes en el ARN, a excepción de la timina, que es sustituida por uracilo (Figura 1). La unión de las bases nitrogenadas con ribosa o con desoxirribosa conforma los denominados **nucleósidos**, mientras que la unión del nucleósido a un grupo fosfato forma los **nucleótidos**.

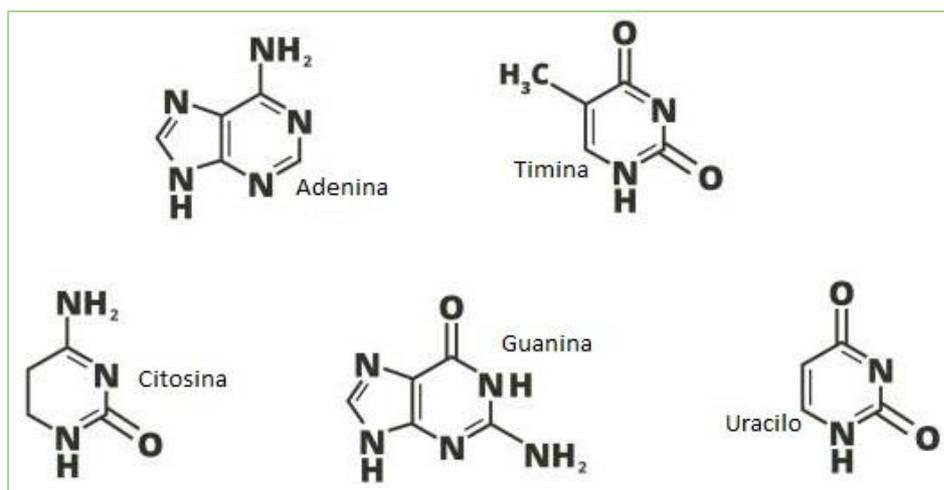


Figura 1. Bases nitrogenadas del ADN y del ARN.

La organización del ADN en eucariotas¹ es compleja, y el gran tamaño del material genético² requiere de un proceso de compactación que le permita establecerse en el interior del núcleo celular. De este modo, a partir de la doble hélice de ADN, que presenta una anchura de unos 2 nm, podemos distinguir varios niveles de compactación (Figura 2):

- Nucleosomas: son el componente estructural fundamental de la compactación del ADN, con una anchura de 11 nm. Las histonas son las proteínas encargadas de esta compactación, gracias a su basicidad, que permite una interacción electrostática con el polianión que es el ADN. El ADN se enrolla alrededor de un octámero de 4 tipos de histonas diferentes, y se compacta.

- Solenoide: es una hélice formada por la compactación de los nucleosomas sobre sí formando una estructura parecida a un muelle, con una anchura de 30 nm.

- Eucromatina: el solenoide se ancla sobre una estructura proteica que compacta más todavía

la estructura al formar bucles; tiene un grosor de 300 nm.

- Fibras de cromatina: se da una vez que el ADN en su forma de cromatina ya se ha replicado y la célula está dispuesta a dividirse. Esta compactación se produce por acción de las condensinas, que forman bucles con la eucromatina, convirtiéndola en cromatina condensada o heterocromatina, que no puede ser leída para expresar genes. Tiene un grosor de 700 nm.

- Cromosoma: es la forma más compacta del material genético que solo se presenta cuando la célula está en la fase mitótica para facilitar la separación del genoma y su encapsulación en el núcleo. Los cromosomas de los seres eucariotas poseen distintas partes fácilmente diferenciables: están compuestos por dos cromátidas hermanas exactamente iguales la una a la otra, cada una de las cuales es una copia del material genético del cromosoma en cuestión.

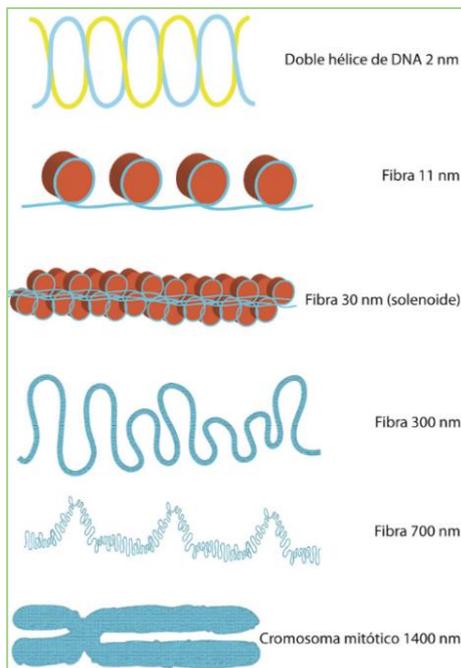


Figura 2. Niveles de compactación del ADN. Tomada de (Tecalco-Cruz *et al.*, 2021).

¹ Las células eucariotas, presentes, entre otros, en los reinos animal y vegetal, se caracterizan por poseer un citoplasma compuesto por orgánulos diferenciados y separados del citosol por una membrana plasmática; entre estos orgánulos se encuentra el núcleo celular, que contiene la mayor parte del ADN celular –las mitocondrias poseen una cantidad relativamente pequeña de ADN propio, denominado ADN mitocondrial, que contiene en los humanos únicamente 37 genes–. Las células procariotas, al contrario, carecen

de orgánulos separados por una membrana plasmática y en ellas el material genético se encuentra disperso en el citoplasma.

² El genoma humano contiene alrededor de 3200 millones de pares de bases y está compuesto por alrededor de 20 000 a 25 000 genes, con un tamaño medio de 27 000 pares de bases por gen, aunque con una gran variabilidad, pues existen genes muy grandes, como el de la distrofina (2,4 Mb).

En seres vivos diploides como los humanos, los cromosomas están duplicados y el mismo gen que se presenta en una parte o *locus* de un cromosoma se encontrará en su cromosoma gemelo (Strachan *et al.*, 2019). Este gen puede presentarse exactamente igual en ambos cromosomas (**homocigosis** o individuo homocigótico) o puede ser que cada cromosoma tenga una copia del gen con pequeñas variaciones (**heterocigosis** o individuo heterocigótico).

Los genes presentan la capacidad de dirigir la secuencia lineal de los aminoácidos para formar los polipéptidos y, consecuentemente, las proteínas, que son las moléculas estructurales –también muchas con carácter funcional– del organismo. Esta transformación de la información genética a cadenas peptídicas se conoce como el **dogma central de la biología molecular** (Figura 3), de acuerdo al cual el ADN se transcribe para producir ARN y éste se traduce a proteínas. Además, el ADN se copia –replica– a ADN, constituyendo este mecanismo el fundamento de la herencia genética.

La **replicación** es un proceso que se da sobre cada una de las cadenas desapareadas del ADN, que sirven de molde para la síntesis de una nueva hebra. Comienza en un punto denominado *origen de replicación*, a partir del cual determinadas proteínas separan las cadenas de ADN generando una burbuja de replicación desde la cual la enzima ADN polimerasa va

añadiendo los nucleótidos complementarios a los presentes en la cadena molde en sentido 5' → 3'. La ADN polimerasa es una enzima muy eficaz, y en células eucariotas como las humanas va añadiendo alrededor de 90 000 pares de bases por segundo, con una probabilidad de error extremadamente baja³.

La **transcripción** es el proceso que permite crear una cadena de ARN a partir de una cadena de ADN. Aunque el ADN está compuesto por una doble cadena, solo una de ellas será utilizada para la transcripción –cadena molde–. El proceso comienza sobre las cadenas de ADN que han sido separadas, formando una pequeña burbuja que va avanzando por la hebra de ADN a partir de la acción de la ARN polimerasa, y en él se pueden distinguir tres etapas:

- **Iniciación:** la polimerasa de ARN reconoce las bases de la secuencia de inicio –*secuencia promotora*– y comienza el proceso al abrirse la burbuja de transcripción, que avanza en sentido 5' → 3'.
- **Elongación:** la ARN polimerasa avanza a través del ADN a la misma vez que éste se va separando en sus dos cadenas y cerrándose por la parte anterior.
- **Terminación:** la ARN polimerasa detecta una secuencia de terminación en el extremo 3' y finaliza el proceso.

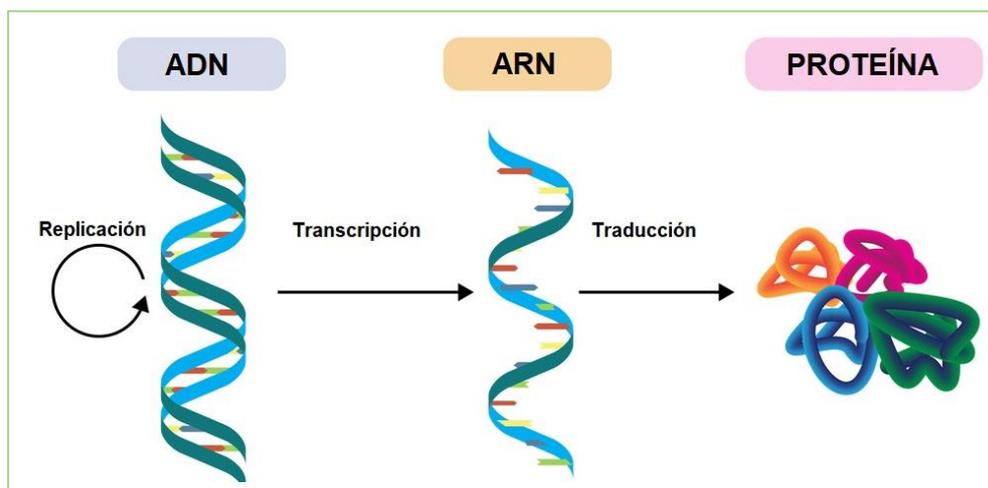


Figura 3. Dogma central de la biología molecular.

³ Se estima que la ADN polimerasa comete un error por cada 10 millones de pares de bases añadidas. No obstante, existen mecanismos para corregir estos errores de forma rápida.

Dado que la transcripción se da sobre una única cadena molde de las dos que componen el ADN, el resultado es un ARN monocatenario que posteriormente podrá someterse al proceso de traducción. Sin embargo, este ARN transcrito, conocido como *transcrito primario*, tiene que pasar por una serie de modificaciones destinadas a convertirlo en un ARN funcional. Por un lado, en el extremo 5' de dicho ARN se produce la adición de una *caperuza (capping)* de guanina mediante una serie de enzimas que se engloban en el *complejo enzimático de capping*. Por otro lado, se produce la poliadenilación del extremo 3', con la adición de alrededor de 200 nucleótidos de adenina cuya función es proteger al transcrito de la degradación enzimática. Además, se debe tener en cuenta que en las células eucariotas los genes poseen unos fragmentos realmente codificadores denominados *exones* y otros fragmentos espaciadores que no son útiles para la codificación a proteína, denominados *intrones*. Por ello, la maduración del transcrito primario requiere del corte preciso que elimine los intrones y deje unidos los exones en un proceso denominado *splicing*, que está dirigido por los espliceosomas y que produce el *ARN mensajero (ARNm)*.

Una vez que se ha producido el ARNm, esta cadena de nucleótidos está lista para pasar por el proceso de *traducción*, que permite generar una cadena de aminoácidos y, por ende, proteínas. Este proceso implica una lectura de los nucleótidos en tripletes (codones), de modo que cada secuencia de 3 bases codifica para un aminoácido concreto. Aunque existen 64 codones, solo hay 20 aminoácidos constituyentes de las proteínas, lo que significa que un mismo aminoácido puede estar codificado por distintos codones. Entre los más relevantes se encuentra el codón AUG (adenina-uracilo-guanina) que codifica para el aminoácido metionina y es el denominado *codón de inicio*, de modo que su reconocimiento por parte de la maquinaria de traducción permite comenzar a sintetizar la cadena peptídica. También hay tres codones –UAA, UAG y UGA– que no codifican para un aminoácido sino que señalan el final de la traducción.

El proceso de traducción está a cargo de los *ribosomas*, unos macrocomplejos de proteínas y ARN ribosomal (ARNr), y de los ARN de

transferencia (ARNt), que son los verdaderos adaptadores del lenguaje del ARN a los aminoácidos. Los ribosomas están compuestos por más de 50 proteínas diferentes y están divididos en dos subunidades (pequeña y grande). Además, en ellos se presenta un hueco A (aminoacil) y un hueco P (peptidil), siendo el primero el encargado de producir el enlace peptídico entre los aminoácidos, mientras que al segundo pasa la cadena peptídica que se está sintetizando. Como en el caso de la transcripción, la traducción puede dividirse en tres etapas:

- **Iniciación:** etapa en que la subunidad menor del ribosoma se une a la cadena de ARNm por la zona en la que está presente el codón de iniciación AUG; tras ello, se une el ARNt, que está cargado con el aminoácido metionina.
- **Elongación:** siguiendo la cadena de ARNm y dependiendo del aminoácido codificado por cada codón, el ARNt va añadiendo los aminoácidos correspondientes en el hueco A. El proceso de elongación se produce en sentido amino → carboxilo.
- **Terminación:** cuando el complejo ribosomal llega a un codón de terminación se produce la separación de las subunidades del ribosoma, dejando la cadena peptídica libre.

Aunque, tal y como se ha sugerido, estos procesos son realizados por enzimas con una alta eficiencia y muy baja tasa de error, en ocasiones durante la replicación del ADN pueden ocurrir *mutaciones* en el material genético, que pueden darse de manera espontánea o verse inducidas por otros estímulos, como determinados agentes físicos o químicos, como la radiación ultravioleta. Para que ocurran estas mutaciones es necesario que falle alguno de los mecanismos de reparación del ADN, de manera que el ADN replicado incluya la mutación y se transmita a las células descendientes. En la mayoría de casos, cuando se encuentra un error en una cadena de ADN se repara rápidamente antes de que se produzca la replicación; de hecho, la misma maquinaria de replicación posee la capacidad de corregir sus propios errores de emparejamiento.

Existen una gran cantidad de estos *sistemas de reparación* para asegurar la conservación de

nuestro genoma correctamente, entre los que destacan:

- **BER** (*Base Excision Repair*): cuando una base se encuentra dañada –por oxidación, alquilación, etc., generalmente por lesiones de causa endógena–, estos sistemas la escinden y colocan en su lugar una nueva base con propiedades de emparejamiento correctas.

- **NER** (*Nucleotide Excision Repair*): este sistema permite corregir, mediante escisión, pequeños segmentos del ADN que han sido dañados y alteran localmente la estructura de la doble hélice, como pueden ser los dímeros de timina⁴.

- **MMR** (*Mismatch Repair*): el sistema de reparación de apareamientos incorrectos elimina

emparejamientos erróneos presentes en el ADN por problemas en la replicación o por desaminaciones espontáneas.

- **NHEJ** (*Nonhomologous end-joining*): a diferencia de los anteriores –que corrigen errores en una sola cadena–, se trata de un sistema de reparación de roturas en la doble cadena en los cromosomas. No es muy eficaz, pues la corrección no suele conservar la secuencia original y produce mutaciones con frecuencia, pero si no se da este tipo de reparación la muerte celular es inmediata.

Los fallos en los sistemas de reparación del ADN se asocian con un mayor riesgo de enfermedades graves y complejas y, de manera particular, con el cáncer (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos de enfermedades genéticas relacionadas con fallos en la reparación del ADN.

Enfermedad	Características
Síndrome de Lynch	Se produce por una mutación germinal en alguno de los genes <i>MMR</i> (<i>mismatch repair</i>). Estas mutaciones ocasionan inestabilidad de fragmentos repetitivos del ADN (microsatélites), distribuidos a lo largo del genoma, y producen acumulación de errores en la replicación del ADN. Se asocia con la aparición de cáncer colorrectal en edades tempranas.
Xeroderma pigmentosum	Se trata de una enfermedad causada por la deficiencia en genes relacionados con el sistema NER. Se asocia con el cáncer de piel debido a la acumulación de dímeros de pirimidina tras la exposición a la radiación UV.
Anemia de Fanconi	Es una enfermedad en la que se produce una anemia aplásica relacionada con la mutación en distintos genes asociados a la reparación de daños en la doble hebra de ADN.
Síndrome de Werner	La enfermedad se produce por mutaciones en el gen <i>WRN</i> , que codifica para una proteína que participa en los sistemas BER y NHEJ. Los pacientes presentan un crecimiento retardado y un envejecimiento prematuro.

⁴ Los dímeros de pirimidina, y especialmente los que se producen entre dos nucleótidos de timina, son uno de los errores más frecuentes en el ADN. La causa más habitual es la radiación

ultravioleta, que induce la dimerización entre nucleótidos adyacentes mediante un anillo de ciclobutano.

PATOLOGÍA MOLECULAR Y FUNDAMENTOS DEL USO TERAPÉUTICO DEL ADN

La patología molecular examina e identifica las moléculas implicadas en enfermedades concretas, explicando la relación entre un determinado cambio genético y unas manifestaciones específicas de una enfermedad, debida a la presencia de mutaciones en el genoma que producen un cambio en la actividad de una proteína. En este sentido, es importante conocer la localización de las mutaciones en el gen.

Así, las mutaciones que afectan a la región codificadora producen una proteína con estructura anormal que ve alterada su funcionalidad. Generalmente, el resultado es de pérdida de función, siendo poco probables las mutaciones que producen una proteína de mayor funcionalidad. Si, por otro lado, la mutación afecta a la zona reguladora, tendremos una proteína con estructura normal, pero en una cantidad superior o inferior a lo habitual, lo cual se equipara con una ganancia o pérdida de función, respectivamente. En el caso de que se afecte el procesamiento, se produce como resultado un ARNm con una secuencia incorrecta, dando lugar a una proteína con una estructura anormal.

El tratamiento de las enfermedades causadas por mutaciones en el material genético es complejo, y las posibilidades terapéuticas son, por lo general, todavía reducidas. La manipulación del material genético o **ingeniería genética** tiene una utilidad básica al permitir crear una gran variedad de productos de utilidad en biomedicina. Una creciente cantidad de sustancias de interés farmacológico se produce por métodos de manipulación genética, abriendo un gran abanico de posibilidades terapéuticas que actualmente se encuentra en expansión.

Uno de los pilares de las técnicas de ingeniería genética son las **enzimas de restricción**, descubiertas en la década de los 60 del siglo XX por

Werner Arber, Hamilton Smith y Daniel Nathans, motivo por el cual recibieron el Premio Nobel de Medicina en 1978. Estas enzimas son endonucleasas que están presentes en bacterias y arqueas, donde tienen un papel defensivo contra la infección vírica como parte de un sistema de restricción/modificación (Di Felice *et al.*, 2019). Las enzimas de restricción son capaces de cortar el ADN en lugares determinados, lo cual les confiere una enorme ventaja sobre las endonucleasas inespecíficas. Se han descrito tres tipos de enzimas de restricción: las tipo I, que cortan y metilan al azar cerca de un determinado punto de reconocimiento en el ADN; las tipo II, que solo tienen actividad de corte o restricción, siempre sobre el mismo punto de la secuencia que reconocen; y las tipo III, que cortan y metilan a 25-27 pares de bases (pb) en un punto lejano al de reconocimiento. Las enzimas de restricción de tipo II son las más usadas en ingeniería genética, ya que presentan una especificidad dentro de la secuencia de reconocimiento, haciendo más predecible su comportamiento. Los puntos de reconocimiento son secuencias de ADN cortas (4-8 pb), normalmente palindrómicas⁵.

Las enzimas de restricción pueden utilizarse para la clonación de ADN. El proceso de clonación se inicia mediante la extracción de una secuencia de ADN, que se une a un vector de clonación, como un plásmido⁶, formando un ADN recombinante –también denominado ADN quimérico–. Los plásmidos usados para la clonación de genes son artificiales, y poseen una región con varios puntos de reconocimiento para varias enzimas de restricción donde se abrirá el plásmido y se unirá el fragmento de ADN que se va a clonar aprovechando la capacidad autorreplicativa del plásmido. La clonación permite estudiar la secuencia de un gen con una determinada relevancia clínica.

⁵ Las secuencias palindrómicas son secuencias de ácidos nucleicos que se leen del mismo modo en sentido 5' → 3' que en sentido 3' → 5'. Por ejemplo, la secuencia GATC forma un palíndromo con su secuencia complementaria CTAG.

⁶ Un plásmido es una molécula pequeña de ADN, generalmente circular, presente en algunos microorganismos y que cuenta con la capacidad de replicarse de forma independiente.

De manera análoga a la clonación, la ingeniería genética permite obtener sustancias de interés farmacológico mediante el empleo de vectores de expresión que permiten a la célula hospedadora transcribir el gen elegido y producir la proteína para la que éste codifica. Los vectores

de expresión permiten replicar en un organismo procariota o eucariota un gen de cualquier otra especie y, por tanto, obtener proteínas recombinantes y otros productos con potencial terapéutico.

CRISPR y los progresos en la edición genética

El descubrimiento a finales de la década de los años 80 del pasado siglo de numerosas secuencias palindrómicas repetidas en el ADN de algunos microorganismos, como bacterias y arqueas, despertó el interés por conocer su posible funcionalidad, que no fue descrita por primera vez hasta el año 2005 por el grupo de investigación de Francisco Mojica en la Universidad de Alicante (Mojica *et al.*, 2005), el cual también acuñó el término con el que hoy se designa a estas secuencias: **CRISPR** (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). Su utilidad en terapéutica radica en el hecho de que estas secuencias, que proceden de la infección por parte de bacteriófagos, pueden ser reconocidas de manera muy específica por el sistema inmunitario del microorganismo y eliminadas a través de endonucleasas –por ejemplo, Cas9–, protegiéndose de infecciones posteriores que produzcan esta misma “huella” en el ADN.

La elevada especificidad del sistema CRISPR-Cas⁷ y su relativa sencillez han supuesto un gran impulso en los últimos años para la edición genética y motivaron asimismo la concesión del Premio Nobel de Química en 2020 para Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier por su desarrollo, aunque sus aplicaciones van mucho más allá del ámbito de la biomedicina⁸.

La simplicidad, flexibilidad, precisión y bajo precio de producción en comparación con otras técnicas de edición genética han favorecido la generalización de CRISPR-Cas en este

ámbito. El funcionamiento de esta técnica (Figura 4) se basa en el uso de una endonucleasa Cas que se asocia con una secuencia de ARN guía específica que dirige al complejo hacia una secuencia de ADN genómico con la que este ARN es complementario; este ARN guía contiene una secuencia denominada PAM (*protospacer adjacent motif*) que es reconocida de manera específica por la endonucleasa. Una vez localizada la secuencia complementaria, la endonucleasa corta ambas hebras del ADN, dejando un corte que es reparado por recombinación homóloga o mediante el sistema NHEJ (Charpentier *et al.*, 2013). Esta especificidad y precisión es fundamental para garantizar la seguridad de la técnica, pues la escisión incorrecta de nucleótidos podría tener graves consecuencias.

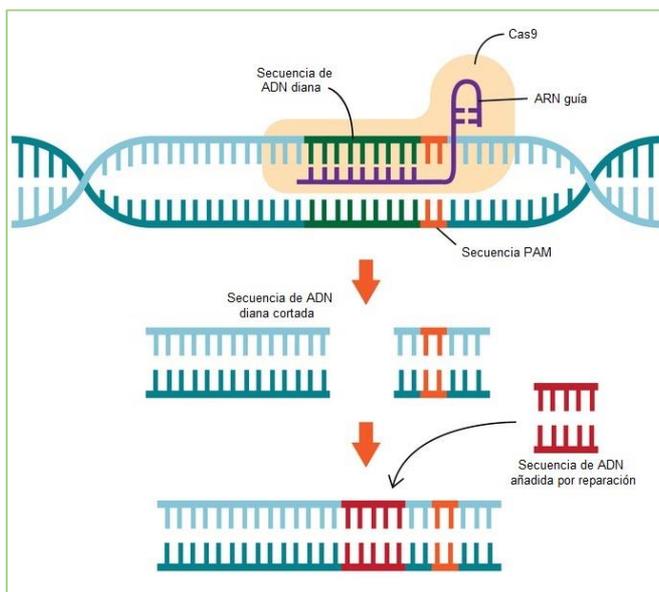


Figura 4. Mecanismo de edición genética mediante CRISPR-Cas9.

⁷ Las enzimas Cas, como Cas9, son endonucleasas denominadas así porque su actividad se desarrolla asociada a las secuencias palindrómicas CRISPR (*CRISPR associated protein*).

⁸ Esta técnica de edición genética se ha utilizado, por ejemplo, en la producción de un tipo de arroz –conocido como “arroz dorado”–

capaz de almacenar betacaroteno en elevada cantidad, que permite fortificar la dieta con este micronutriente en zonas en desarrollo en las que el arroz constituye la base de la alimentación.

TERAPIAS GÉNICAS

Entre los productos con potencial terapéutico que se pueden obtener mediante técnicas de ingeniería genética se encuentran los ácidos nucleicos, que al ser introducidos en un paciente pueden llegar a corregir deficiencias celulares expresadas a nivel fenotípico. Esta es la base de la **terapia génica**, un tipo de terapia avanzada que permite producir medicamentos con una serie de características definidas en la Directiva 2001/83/CE:

- Los medicamentos de terapia génica incluyen un principio activo que contiene un ácido nucleico recombinante, o están constituidos por él y son utilizado en seres humanos, o administrados a los mismos, con objeto de regular, reparar, sustituir, añadir o eliminar una secuencia génica;

- Además, su efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico debe depender directamente de la secuencia del ácido nucleico recombinante que contengan, o del producto de la expresión genética de dicha secuencia.

La terapia génica consiste, por tanto, en una transferencia de material genético nuevo a células de un individuo dando lugar a un beneficio terapéutico para el mismo, consistente en corregir defectos genéticos (genes mutados) o bloquear la activación de ciertas alteraciones nocivas (oncogenes) o sus efectos, y facilitar otros tratamientos, como anular la resistencia a ciertos fármacos o incrementar la tolerancia a otros. Para ello, se emplean dos sistemas generales: *in vivo*, introduciendo directamente el gen en las células del tejido diana; o *ex vivo*, obteniendo las células del paciente, que son modificadas en el laboratorio y reintroducidas en él (Cuéllar, 2019).

Los **vectores** son indispensables para el proceso de transferencia genética y de ellos depende en gran medida la eficiencia transfectiva. Los primeros vectores empleados experimentalmente han sido los **vectores virales**, auténticos virus que, tras sufrir un proceso

de transformación previo para eliminar su potencial patogénico, reciben una carga genética adicional para que, aprovechando su enorme capacidad de invadir células y utilizar su maquinaria genética, pueda ser incorporada al propio material genético celular.

Las ventajas de los vectores virales son muchas: infectan a casi todas las células, suelen dejar solo una copia en el genoma, tienen una estructura genómica viral bien conocida generalmente, la manipulación celular *ex vivo* no suele producir lesiones y todas las etapas del proceso son controlables, en principio. Pero también tienen importantes inconvenientes, que conviene no olvidar: el ADN viral puede insertarse en regiones esenciales del genoma celular (provocando la activación de oncogenes o de otros genes defectuosos), pueden activar virus latentes o transformarse en virus patológicos, al recombinarse con el genoma celular.

Entre los vectores virales, unos de los más estudiados son los **retrovirus**, que presentan características muy interesantes: suelen tener lugares preferentes de inserción en el genoma celular, permiten incorporar secuencias específicas para determinados tejidos y marcadores para comprobar si las células han sido transfectadas⁹. Obviamente, tienen limitaciones también importantes, entre las que destaca el hecho de que solo infectan (*transfectan*) a células en fase de división y de que no pueden ser utilizados en métodos *in vivo*, porque son peligrosos e inestables en el torrente sanguíneo.

Por otro lado, los **adenovirus** se han revelado como una buena alternativa a los retrovirus, ya que son fáciles de producir en grandes cantidades y son capaces de transferir genes de forma eficiente en una amplia cantidad de células y tejidos. Infectan células en fase no proliferativa y pueden usarse *in vivo* en ciertos casos; además, permiten la inserción de trozos grandes de ADN (de hasta 37 Kb). Pero, como

⁹ La transfección se define como la adquisición de nuevo material genético por una célula humana mediante la incorporación de ADN adicional.

ocurre con los retrovirus, los adenovirus tienen limitaciones no menos importantes, ya que pueden replicarse *in vivo* en ciertas células y activar la síntesis de proteínas tóxicas e inducir respuestas inmunológicas e inflamatorias frente a las células diana. De hecho, la inmunogenicidad es una de las principales desventajas de este tipo de vectores, debido a la posible existencia de anticuerpos neutralizantes producidos como consecuencia de infecciones previas por un adenovirus (Olive *et al.*, 2002), que pueden comprometer tanto la eficacia del tratamiento como su seguridad, con un riesgo relativamente elevado de reacciones inflamatorias (Schnell *et al.*, 2001; Ronzitti *et al.*, 2020). Por otro lado, producen una expresión solo transitoria de los genes transferidos al genoma: la respuesta del hospedador al virus parece limitar la duración de la expresión y la capacidad de repetir la dosis, al menos con altas dosis de vectores de primera generación.

Relacionados con los adenovirus se encuentran los **virus adenoasociados** (AAV, por sus siglas en inglés). Se trata de virus muy pequeños con una organización de su genoma extremadamente simple, con un ADN lineal de cadena sencilla y que requieren la coinfección con adenovirus u otros para replicarse; es decir, no son autónomos. Los AAV están extendidos en la población humana, como evidencia la detección de anticuerpos específicos en numerosas personas, pero este hecho no parece estar asociado con ninguna enfermedad conocida. Los AAV tienen la virtud de facilitar una expresión génica a largo plazo en células que no se dividen, posiblemente –aunque no necesariamente– porque el ADN vírico lo integra. Asimismo, los vectores son estructuralmente simples y pueden provocar menos respuesta de la célula hospedadora que del adenovirus. Sin embargo, son difíciles de producir en grandes cantidades y tampoco es descartable un potencial genotóxico (Colella *et al.*, 2017).

Por último, dentro de los vectores virales es preciso citar a los **herpesvirus** (HV) por su capacidad de llevar insertadas grandes secuencias de ADN extraño y para establecer infecciones latentes de larga duración. Sin embargo, los herpesvirus son enormemente diversos, tanto en lo que se refiere al tamaño del genoma, como a sus mecanismos patogénicos, a la organización de su genoma, a su contenido

genético o a las células sobre las que actúa. Además, la naturaleza de la latencia viral es de particular relevancia. Todo este conjunto de aspectos ha determinado que, hasta el momento, solo se haya experimentado con virus del *herpes simplex* (HSV) *in vivo*.

Como alternativa a los vectores virales se han planteado numerosas y muy diversas iniciativas. Una de las primeras fue el **bombardeo de partículas de ADN**, que ha demostrado ser efectivo para transferir genes tanto *in vitro* como *in vivo*. Para ello, es preciso que el plásmido de ADN sea previamente revestido sobre su superficie de gotas de 1 a 3 micras de diámetro de oro o tungsteno. Las partículas son aceleradas por una descarga eléctrica de un aparato o por un pulso de gas y son “disparadas” hacia el tejido, permitiendo que la fuerza física del impacto supere la barrera de la membrana celular. Los resultados obtenidos han mostrado grandes variaciones en la eficiencia de la expresión de los genes debido a las diferencias de la rigidez de los tejidos, de la procedencia del ADN extraño y de la propia capacidad de transcripción intrínseca.

La **inserción directa de ácidos nucleicos** consiste en la inyección directa de ADN o ARN puro circular y cerrado covalentemente dentro del tejido deseado. Se trata de una técnica factible solo para determinados tejidos, como el muscular, pero es simple, económica y no es tóxica. Tiene potencial para llevar largas construcciones de ADN, pero produce unos niveles y una persistencia de la expresión de genes demasiado corta (pocos días). Habida cuenta de sus características, podría tener potencial como un procedimiento de vacunación y como expresión de genes a un nivel bajo pero suficiente para provocar una respuesta inmunitaria.

Los **complejos ADN-liposoma** se basan en las propiedades de carga eléctrica del ADN (negativa debido a la cadena de fosfatos ionizados negativamente en la superficie en la doble hélice), lípidos catiónicos (carga positiva) y la superficie celular (una red de cargas negativas debido a los residuos del ácido siálico). Actúan de forma similar a las histonas, proteínas ricas en aminoácidos cargados positivamente que compactan el ADN, mientras que en los liposomas son los lípidos catiónicos los que inte-

raccionan con las cargas negativas del ADN condensándolo. El exceso de cargas positivas permite a los transportadores catiónicos interaccionar, mediante enlaces electrostáticos, con las cargas negativas que presenta la membrana celular. Entre las ventajas atribuidas a los complejos liposómicos de ADN están las de no existir limitación importante para el tamaño del plásmido, no pueden replicarse o recombinarse para dar lugar a un virus infeccioso, ni provocan respuestas inmunitarias o inflamatorias; atendiendo a estas características, pueden usarse en técnicas *in vivo*. Sin embargo, pese a que se han introducido mejoras en los liposomas catiónicos, como un incremento de las cargas positivas en su región hidrofílica o cambios en el tamaño de partícula, hasta el momento no se ha conseguido una eficiencia transfectiva satisfactoria (Liu *et al.*, 2020).

El principal problema de los métodos no virales descritos consiste en que el ADN no posee la capacidad de introducirse en su tejido diana. Para intentar soslayar este problema crítico, se han desarrollado técnicas de *transferencia de genes mediante receptores*. Para ello –lo mismo que con los vectores víricos– se pueden trasplantar *ligantes* al transportador, unas moléculas que serán reconocidas por los receptores presentes en el tipo celular elegido. La naturaleza de los *ligantes* es muy variada: azúcares, péptidos, hormonas, etc.

Las células absorben algunos elementos del medio exterior por endocitosis: su membrana se repliega hasta formar una vesícula, el *endosoma*. Los *complejos de transfección* aprovecharían este mecanismo para penetrar en sus objetivos celulares. El interior del endosoma se acidifica progresivamente y luego se fusiona con lisosomas, que contienen enzimas que degradan su contenido. Por tanto, una vez en el endosoma, los complejos deben

necesariamente escapar de él antes de ser vertidos en los lisosomas y sufrir su ataque enzimático. Por esto, a los vectores sintéticos se les asocia unas moléculas llamadas *fusiógenas* que, como su nombre indica, favorecen la fusión entre el endosoma y la célula, favoreciendo la liberación del fármaco en el citosol celular (Wang *et al.*, 2023), que idealmente se podría producir de manera selectiva en un tipo celular, como los miocitos, con potenciales aplicaciones en enfermedades que afectan a la función muscular, como la distrofia muscular de Duchenne (Hindi *et al.*, 2023). El principal problema de esta técnica consiste en la penetración del ADN en el núcleo de la célula receptora, que solo es posible en las células en crecimiento (especialmente células en cultivo) durante la división celular, cuando se rompe la envoltura nuclear, mientras que en las células en reposo (la mayor parte de las células del organismo) esta penetración se produciría por difusión (siempre que se trate de moléculas cuyo tamaño sea inferior a 9 nm) o a través de los poros de la membrana nuclear (moléculas de tamaño entre 9 y 25 nm). Éste último se trata de un transporte activo que necesita el reconocimiento de unas señales especiales llamadas *señales de localización nuclear*. Sin embargo, la mayoría de los complejos de transferencia miden más de 25 nm.

Otro problema viene determinado por la posible necesidad de que el vector deba permanecer asociado al ADN hasta el interior del núcleo, lo que obliga a asegurar que su presencia no interfiera con la transcripción del gen introducido (*transgén*): los transportadores lipídicos catiónicos inhiben la transcripción cuando tienen un exceso de cargas positivas. Otros elementos cruciales son el mantenimiento duradero del gen terapéutico en las células y la regulación de su expresión según las necesidades del organismo.

Aplicaciones clínicas de la terapia génica

La terapia génica representa una alternativa de tratamiento que se dirige a la corrección de la causa de una enfermedad, con potencial curativo en enfermedades de base genética. No obstante, se requiere de mucha información sobre la patología molecular de un desorden

genético antes de decidir si es factible la terapia génica, lo que obliga a que el gen en cuestión sea clonado. Las terapias génicas han supuesto un avance disruptivo en el tratamiento de algunas enfermedades hasta hace pocos años consideradas fatales, aunque debido a la

relativa *juventud* de los medicamentos autorizados hasta la fecha basados en este tipo de terapia avanzada, en la mayor parte de los casos todavía están por confirmar sus efectos en el largo plazo.

Uno de los ámbitos en los que se ha focalizado la investigación en terapias génicas son las **enfermedades hereditarias monogénicas** (producidas como consecuencia de los defectos en un único gen): se han descrito más de 1800 genes asociados a enfermedades hereditarias y en muchos casos se ha demostrado el mecanismo por el cual alteraciones en su expresión son la causa de la enfermedad. En este contexto, el desarrollo de terapias de reemplazo del gen defectuoso o complementación con su forma funcional representa una potencial alternativa para obtener un efecto terapéutico a largo plazo en los pacientes afectados por enfermedades monogénicas.

Una de las aplicaciones más exitosas de la terapia génica en el ámbito de este tipo de enfermedades se ha dado en el campo de la neurología y, muy especialmente, en el de las enfermedades neuromusculares. Por ejemplo, en 2020 se autorizó en la UE el uso de **onasemnogén abeparvovec** (Zolgensma®)¹⁰ para el tratamiento de la atrofia muscular espinal (AME)¹¹ en 5q¹², una terapia génica consistente en un vector recombinante no replicativo basado en un adenovirus serotipo 9 (AAV9), con capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y transducir las motoneuronas, y que contiene el ADN complementario del gen *SMN1* humano, favoreciendo su expresión en las células transducidas. Así, proporciona una fuente alternativa de la expresión de la proteína SMN en las motoneuronas. Su autorización se sustentó fundamentalmente en los datos de un estudio pivotal de fase 3, en el cual el fármaco se administró en una única dosis intravenosa, ampliando la supervivencia a los 14 meses al 91 % de los pacientes, frente a un 26

% estimado en cohortes históricas de pacientes de AME (Day *et al.*, 2021). Además, el fármaco permitió que aproximadamente 2 de cada 3 pacientes (64 %) alcanzaran el hito motor de sentarse sin ayuda (apoyo) durante un mínimo de 30 segundos; esta capacidad se mantiene al menos hasta los 18 meses, lo cual destaca notablemente al recordar que, sin tratamiento, no se esperaría que ninguno de los pacientes incluidos pudiera alcanzarla (Fernández Moriano, 2022). Se ha estudiado también su uso en niños presintomáticos con mutaciones bialélicas en *SMN1* y tres copias de *SMN2*, que fueron tratados con una dosis única del fármaco en las seis primeras semanas de vida. En este ensayo de fase 3 multicéntrico y de un solo brazo en el que participaron 15 niños, todos podían mantenerse en pie antes de los 24 meses y 14 eran capaces de caminar de forma independiente, de manera similar a niños sin AME (Strauss *et al.*, 2022).

También se encuentra ya comercializada en EEUU, aunque todavía no en la UE, la primera terapia génica frente a la **distrofia muscular de Duchenne** (DMD). Esta enfermedad se produce como consecuencia de deleciones en el gen de la distrofina –el gen más grande conocido en humanos–, que conduce a una degeneración muscular grave que suele resultar fatal en la tercera década de la vida por insuficiencia cardíaca y/o respiratoria. El fármaco aprobado, **delandistrogén moxeparvovec** (Elevidys®), fue autorizado en EEUU en junio de 2023 como medicamento huérfano, indicado para el tratamiento de pacientes pediátricos ambulatorios de 4 a 5 años con DMD con una mutación confirmada en el gen *DMD*. Se trata de un medicamento de terapia génica constituido por un vector basado en un virus adenoasociado, recombinante y no replicante que contiene el transgén de la **microdistrofina** bajo el control del promotor MHCK7; la proteína microdistrofina expresada es una versión abreviada (138 kDa, en comparación con el

¹⁰ En España, el medicamento se encuentra comercializado desde diciembre de 2021.

¹¹ Las atrofia muscular espinal proximal es un grupo de trastornos musculares caracterizados por una debilidad muscular progresiva resultado de una degeneración y pérdida de las neuronas motoras inferiores en la médula espinal y en los núcleos del tronco encefálico. En concreto, la **atrofia muscular espinal** (AME) es una enfermedad hereditaria de carácter autosómico recesivo que implica la degeneración de las neuronas motoras del asta

anterior de la médula, lo cual provoca la falta de transmisión del impulso nervioso y de estímulo al músculo inervado, con la consiguiente debilidad y atrofia progresiva de los músculos voluntarios, de predominio proximal y de un amplio espectro de gravedad.

¹² La mutación que causa la enfermedad se produce en el brazo largo del cromosoma 5 (5q), en el gen de supervivencia de la neurona motora 1 (*SMN1*).

tamaño de 427 kDa de la distrofina expresada en células musculares normales) que contiene dominios seleccionados de la distrofina natural.

Su eficacia clínica está avalada por dos ensayos clínicos multicéntricos, aún en progreso. El primero constó de dos partes: mientras que la primera consistió en un periodo de 48 semanas, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, la segunda parte tuvo un periodo de 48 semanas que comenzó después de completar la primera parte, donde los pacientes que recibieron placebo inicialmente fueron tratados con el fármaco y los pacientes tratados con el fármaco (durante la parte 1) recibieron placebo. La población del estudio fueron pacientes masculinos ambulatorios con DMD (N=41) de 4 a 7 años de edad con una mutación de marco de lectura confirmada o una mutación prematura del codón de terminación entre los exones 18 a 58 en el gen DMD. Entre los objetivos principales se evaluó la expresión de microdistrofina en el músculo esquelético y el efecto del fármaco en la puntuación total de la escala de Evaluación ambulatoria de North Star (NSAA). El estudio 2 es un estudio abierto que incluye una cohorte de 20 sujetos masculinos ambulatorios con DMD de 4 a 7 años de edad, todos los cuales tienen una mutación de cambio de marco confirmada, una mutación del sitio de empalme canónico o una mutación prematura del codón de parada en el gen DMD. El cambio en la puntuación total de la NSAA se evaluó desde el inicio hasta la semana 48 después de la infusión de Elevidys® o placebo, siendo la mediana del 40,8 % en el estudio 1 y del 50,6 % en el segundo ensayo (Cuéllar, 2024).

Por otro lado, los pacientes con enfermedades hematológicas como la **hemofilia** pueden beneficiarse en gran medida de la aplicación de una terapia génica, teniendo en cuenta que pequeños incrementos en el nivel de un factor de la coagulación correlaciona con una importante mejora fenotípica, especialmente en el caso de la hemofilia B, causada por una deficiencia en el factor IX. Recientemente (en 2023 en la UE y en 2022 en EEUU), se ha autorizado la comercialización de **etranacogén dezaparvovec** (Hemgenix®), una terapia génica basada en un virus adenoasociado de tipo 5 (AAV5) recombinante y no replicante que contiene

una secuencia de ADN de codones optimizados de la variante Padua con ganancia de función del factor IX humano, que ha demostrado en un estudio pivotal reducir en más de un 60 % la tasa de sangrado anualizada hasta los 18 meses con una única dosis del medicamento en comparación con el tratamiento convencional, consistente en la administración profiláctica de factor IX de la coagulación (Pipe *et al.*, 2023).

También en el ámbito de las enfermedades hematológicas se ha aprobado recientemente en Europa (en febrero de 2024), la primera terapia génica que utiliza la tecnología CRISPR-Cas9 para la edición genética. Se trata de **exagamglogén autotemcel** (Casgevy®), constituido por células madre hematopoyéticas CD34+ autólogas editadas *ex vivo* mediante tecnología CRISPR-Cas9 en la región potenciadora específica de eritroides del gen *BCL11A* para reducir la expresión de la proteína BCL11A en células del linaje eritroide, lo que conduce a una mayor producción de proteína de hemoglobina fetal (HbF). El medicamento, con designación huérfana, ha recibido la *autorización condicional* con indicación en el tratamiento de la anemia de células falciformes y de la β -talasemia.

La eficacia clínica de exagamglogén autotemcel en dosis única en la indicación de anemia de células falciformes se ha evaluado en un ensayo multicéntrico en pacientes adultos y adolescentes. La variable primaria de eficacia fue la proporción de respondedores VF12 (pacientes que no experimentaron ninguna crisis vaso-oclusiva grave durante al menos 12 meses consecutivos) dentro de los primeros 24 meses después de la infusión del medicamento en el ensayo 1. La evaluación de dicho criterio comenzó 60 días después de la última transfusión de glóbulos rojos para apoyo postrasplante o manejo de la enfermedad. La mediana del tiempo transcurrido hasta la última transfusión de glóbulos rojos fue de 19 días después de la infusión para los pacientes del grupo primario de eficacia y la tasa de respuesta de VF12 fue del 93,5 %. Los pacientes que respondieron a VF12 no experimentaron crisis graves durante el periodo de evaluación, con una duración media de 22,2 meses en el momento del análisis intermedio.

En el caso de la β -talasemia, se dispone de un ensayo todavía en curso, de un solo grupo de pacientes. En él, se incluyeron en el conjunto primario de eficacia 42 pacientes, incluidos 13 adolescentes, con β -talasemia dependiente de transfusiones que recibieron una dosis única. De estos 42 pacientes, 39 estuvieron libres de transfusiones durante al menos un año (Cuéllar, 2024).

Aunque, como se ha podido comprobar, se han producido extraordinarios avances en el tratamiento de numerosas enfermedades monogénicas, el ámbito en el que se han desarrollado un mayor número de estudios clínicos ha sido la oncología (Henderson *et al.*, 2024), en el cual las terapias génicas pueden ofrecer múltiples posibilidades terapéuticas, como la inducción de respuestas inmunitarias específicas, la incorporación de genes productores de citocinas antiproliferativas, la inserción de genes *suicidas* para la activación selectiva de fármacos citotóxicos o de genes *represores* de oncogenes.

En España se encuentran comercializados tres medicamentos de terapia génica con indicación en distintos tipos de cáncer. **Tisagenlecleucel** (Kymriah®) fue la primera terapia génica CAR-T disponible en España (desde el año 2019) y representó una innovación disruptiva en el área de la onco-hematología (Fernández Moriano, 2019a). Es un tratamiento de inmunoterapia consistente en células T autólogas modificadas genéticamente *ex vivo* mediante el empleo de un vector lentiviral para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19. Tras la unión de los linfocitos T reprogramados que expresan CAR a las células que expresan CD19 –células del linaje B desde etapas tempranas de su desarrollo a células plasmáticas, tanto malignas como normales–, la proteína quimérica transmite las señales intracelulares necesarias para activar la citotoxicidad frente a esas células CD19+, así como una señal que favorece la expansión de las células T y la persistencia de tisagenlecleucel (Figura 5).

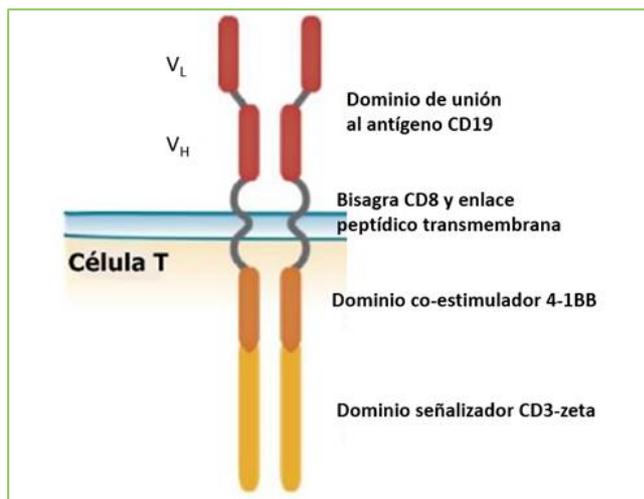


Figura 5. Estructura del receptor de antígeno quimérico CTL109 que portan las células contenidas en tisagenlecleucel. Adaptada de (EMA, 2018).

El medicamento fue oficialmente autorizado como medicamento huérfano para el tratamiento, en perfusión única, de pacientes pediátricos y adultos jóvenes de hasta 25 años de edad con leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células B refractaria, en recaída postrasplante o en segunda o posterior recaída, y de pacientes adultos con linfoma difuso de células grandes B (LBDCG) en recaída o refractario tras dos o más líneas de tratamiento sistémico.

Posteriormente se ha aprobado su indicación en linfoma folicular (LF) en recaída o refractario después de dos o más líneas de tratamiento sistémico en pacientes adultos.

Se han publicado resultados a largo plazo de un estudio de fase 2, abierto y de un único brazo (Schuster *et al.*, 2021), del tratamiento con tisagenlecleucel en 115 pacientes con LBDCG. Tras una mediana de seguimiento de

40,3 meses, la tasa de respuesta global fue del 53,0 % (61 pacientes), con un 39 % de pacientes (n= 45) que obtuvieron una respuesta completa. En el caso de la indicación en LF, la eficacia y la seguridad del fármaco fueron evaluadas (Salles *et al.*, 2022) en un ensayo de fase 2 de un solo brazo en comparación con los del tratamiento estándar procedentes de una cohorte en condiciones del mundo real. Con una mediana de seguimiento de 15 meses, se administró el tratamiento a 97 pacientes y se obtuvo una tasa de respuesta completa (TRC) del 69 % vs. 37 % en la cohorte de comparación. La supervivencia global (SG) fue del 88 % a los 24 meses vs. 65 % en la cohorte de tratamiento en condiciones del mundo real, y la supervivencia libre de progresión (SLP) fue también superior a los 24 meses con el tratamiento con tisagenlecleucel (54 % vs. 42 %).

Por su parte, **axicabtagén ciloleucel** (Yescarta®) fue la segunda terapia génica CAR-T disponible comercialmente en España, introducida también en 2019. Como tisagenlecleucel, se trata de un tratamiento de inmunoterapia consistente en células T autólogas modificadas genéticamente *ex vivo* –a través de un vector lentiviral– para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19. Tras la unión de los linfocitos T reprogramados a las células que expresan CD19 (células del linaje B desde etapas tempranas de su desarrollo a células plasmáticas, tanto malignas como normales), la proteína quimérica transmite las señales intracelulares necesarias para la activación, proliferación, secreción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias de las células T y la adquisición de funciones efectoras como la citotoxicidad (Fernández Moriano, 2019b). El medicamento, designado como huérfano, fue oficialmente autorizado en la UE en 2018 para el tratamiento, en perfusión intravenosa única, de pacientes adultos con LBDCG refractario o en recaída y linfoma B primario mediastínico de células grandes, tras dos o más líneas de tratamiento sistémico.

Se dispone de una comparación indirecta entre tisagenlecleucel y axicabtagén ciloleucel (y

lisocabtagén maraleucel, aprobado en la UE pero aún no comercializado en España) mediante una revisión sistemática y metaanálisis (Meng *et al.*, 2021), en la que se analizaron 33 estudios que involucraron a 2172 pacientes. Los resultados de este estudio indican que las tasas globales de respuesta (TGR) para tisagenlecleucel y axicabtagén ciloleucel son similares (69 % vs. 77 %, respectivamente) y también las TRC (57 % vs. 52 %).

El uso de estas dos terapias CAR-T se asocia a un marcado perfil de toxicidad. Entre los efectos adversos, destaca el riesgo de *síndrome de liberación de citocinas*, una reacción caracterizada por fiebre, taquipnea, cefalea, taquicardia, hipotensión, *rash* e hipoxia causada por una liberación masiva de citocinas (Delgado *et al.*, 2020). La toxicidad neurológica también es considerable con ambos tratamientos (encefalopatía, cefalea, mareos), así como el aumento del riesgo de infecciones.

El último medicamento de terapia génica en incorporarse al arsenal terapéutico en España ha sido **brexucabtagén autoleucel** (Tecartus®), disponible desde febrero de 2024. Se trata asimismo de una inmunoterapia de células T autólogas genéticamente modificadas dirigida contra CD19. La eficacia del fármaco se evaluó en un estudio de fase 2 multicéntrico, abierto y de un solo grupo, en pacientes refractarios o en recaída y previamente tratados con quimioterapia, un anticuerpo anti-CD20 y un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton. Tras una mediana de seguimiento de 36,6 meses, la supervivencia global estimada a los 54 meses fue del 38,7 % (AEMPS, 2024).

Medicamentos de terapia génica autorizados por la Comisión Europea

Transcurridos tan solo 12 años desde la autorización en Europa del primer medicamento de terapia génica, Glybera® (alipogén tiparvovec), son ya 18 los que han llegado a encontrarse aprobados (Tabla 2), observándose una tendencia creciente en los últimos tres años. De ellos, aproximadamente el 40 % cuenta con

una indicación frente a algún tipo de cáncer, principalmente neoplasias hematológicas. De los 14 medicamentos que actualmente disponen de una autorización de comercialización en el marco de la UE, únicamente 5 (36 %) están comercializados en España.

Tabla 2. Medicamentos de terapia génica que han recibido una autorización de comercialización en la UE.

Principio activo	Medicamento®	Indicación	Fecha de autorización (UE)	Disponible en España
Alipogén tiparvovec	Glybera	Deficiencia de lipoproteína lipasa hereditaria	25/10/2012	No*
Talimogén laherparepvec	Imlygic	Melanoma irresecable metastásico	16/12/2015	No
Células CD34+ transducidas con un vector retroviral que codifica la secuencia de ADNc de adenosina desaminasa (ADA) humana	Strimvelis	Inmunodeficiencia combinada grave debida a la deficiencia de ADA	26/05/2016	No
Axicabtagén ciloleucel	Yescarta	<ul style="list-style-type: none"> • Linfoma B difuso de células grandes. • Linfoma B de alto grado. • Linfoma B primario mediastínico de células grandes. • Linfoma folicular. 	23/08/2018	Sí
Tisagenlecleucel	Kymriah	<ul style="list-style-type: none"> • Leucemia linfoblástica aguda. • Linfoma B difuso de células grandes. • Linfoma folicular. 	23/08/2018	Sí
Voretigén neparvovec	Luxturna	Distrofia retiniana asociada a la mutación <i>RPE65</i> .	22/11/2018	Sí
Betibeglogén autotemcel	Zynteglo	β-talasemia.	29/05/2019	No*
Onasemnogén abeparvovec	Zolgensma	Atrofia muscular espinal en 5q.	18/05/2020	Sí
Brexucabtagén autoleucel	Tecartus	<ul style="list-style-type: none"> • Linfoma de células del manto. • Leucemia linfoblástica aguda. 	14/12/2020	Sí
Atidarsagén autotemcel	Libmeldy	Leucodistrofia metacromática.	17/12/2020	No
Elivaldogén autotemcel	Skysona	Adrenoleucodistrofia cerebral.	16/07/2021	No*
Idecabtagén vicleucel	Abecma	Mieloma múltiple.	18/08/2021	No
Lisocabtagén maraleucel	Breyanzi	<ul style="list-style-type: none"> • Linfoma B difuso de células grandes. • Linfoma B de alto grado. • Linfoma B primario mediastínico de células grandes. • Linfoma folicular de grado 3B. 	04/04/2022	No
Ciltacabtagén autoleucel	Carvykti	Mieloma múltiple.	25/05/2022	No
Eladocagén exuparvovec	Upstaza	Deficiencia de L-aminoácido aromático descarboxilasa.	18/07/2022	No
Valoctocogén roxaparvovec	Roctavian	Hemofilia A.	24/08/2022	No**
Etranacogén dezaparvovec	Hemgenix	Hemofilia B.	20/02/2023	No
Exagamglogén autotemcel	Casgevy	β-talasemia y anemia falciforme	09/02/2024	No

* Autorización de comercialización revocada.

** Solicitud de autorización de comercialización retirada por el laboratorio titular.

AVANCES EN EDICIÓN GENÉTICA Y VACUNAS DE ADN

La investigación relativa a las potenciales aplicaciones terapéuticas de la edición genética se encuentra actualmente centrada de manera casi hegemónica en las posibilidades que ofrece la tecnología CRISPR-Cas9. El único tratamiento farmacológico comercializado hasta la fecha que ha empleado esta técnica es el ya comentado **exagamglogén autotemcel**, con indicación en anemia de células falciformes y β -talasemia –enfermedades en las cuales se encuentra mutado el gen de la β -globina–, las dos enfermedades monogénicas de mayor incidencia (Frangoul *et al.*, 2021).

Además, la edición genética con CRISPR-Cas9 ha tenido recientemente aplicaciones terapéuticas que podrían cambiar el paradigma de los trasplantes de órgano sólido. Concretamente, se ha llevado a cabo el primer xenotrasplante a un humano vivo a partir de un riñón de cerdo sobre el cual se realizaron 10 ediciones genéticas con el objetivo de prevenir el rechazo y otras 59 para reducir el riesgo de infección por virus que pudieran estar presentes en el órgano (Mallapaty *et al.*, 2024). Así, la edición genética del órgano incluyó la eliminación de tres genes asociados a la producción de tres carbohidratos presentes en la superficie de las células del órgano animal y que podrían contribuir a la inmunogenicidad del injerto, mientras que otros siete genes humanos fueron agregados con el objetivo de prevenir el rechazo. Dos semanas después del trasplante, el paciente continuaba vivo y fue dado de alta.

En cualquier caso, la investigación en el ámbito de la edición genética se encuentra todavía en sus albores, debido a que su aplicación en seres humanos se está llevando a cabo – como corresponde a la investigación basada en estándares éticos y de calidad– con amplias reservas, dadas las graves consecuencias que pequeños fallos en el proceso de edición podrían implicar, como un riesgo incrementado de desarrollo de neoplasias y posible toxicidad celular. Actualmente se están desarrollando ensayos clínicos con la aplicación de esta técnica en el tratamiento de enfermedades como el VIH, en la cual la modificación sobre el receptor de quimiocinas CCR5 podría constituir

una estrategia eficaz para evitar la entrada del virus a las células. También se han realizado ya estudios preclínicos con una terapia destinada a modificar una única base del gen *PCSK9*, produciendo un silenciamiento epigenético con el objetivo de frenar la producción de la proteína del mismo nombre, asociada a la hipercolesterolemia y al riesgo cardiovascular por su papel en el metabolismo del colesterol; los resultados de un estudio en primates indican una reducción de alrededor del 70 % de los niveles de colesterol LDL, sostenidos hasta 476 días tras una única administración (Lee *et al.*, 2023).

Del mismo modo, se encuentra en estados incipientes la investigación relativa a las **vacunas de ADN**. Aunque el concepto de este tipo de vacunas surgió ya en la década de los 90 del pasado siglo, ha sido el éxito de las vacunas de ARNm frente a la COVID-19 lo que ha generado un mayor impulso para la investigación en este ámbito y, de hecho, la primera vacuna a base de ADN en ser autorizada –en la India– fue una vacuna frente a la COVID-19 denominada Zy-CoV-D, con una eficacia reportada del 67 % frente a la infección de cualquier gravedad y del 100 % frente a la infección grave (Khobragade *et al.*, 2022). Como ocurre con cualquier otra vacuna, el mecanismo de las vacunas de ADN se basa en la estimulación de una respuesta inmunitaria adaptativa, en este caso liberando ADN plasmídico dentro de las células que permite la producción del antígeno de interés (Kozak *et al.*, 2024). El mayor riesgo de seguridad asociado a este tipo de vacunas es que, para ser eficaces, deben llegar hasta el núcleo celular, pudiendo insertarse en el genoma y activar oncogenes o inactivar genes represores de tumores, aunque la evidencia actual indica que este riesgo es muy bajo (Pagliari *et al.*, 2023). La principal ventaja de este tipo de vacunas frente a las de ARNm es la estabilidad a temperatura ambiente, por lo que pueden ser más fácilmente almacenadas y transportadas, al no requerir condiciones especiales de refrigeración. Por ello, cabe esperar un crecimiento en los próximos años de los estudios que evalúen la eficacia y la seguridad de las vacunas de ADN en múltiples indicaciones.

EL PAPEL DEL FARMACÉUTICO

Por lo general, la dispensación y administración de medicamentos de terapia génica se encuentra restringida al ámbito hospitalario, motivo por el cual la participación de los farmacéuticos hospitalarios en los equipos multidisciplinares dedicados a la evaluación de estos medicamentos con carácter previo a su utilización dota a estos profesionales de una función decisiva.

En cualquier caso, la calificación de estos medicamentos como *de uso hospitalario* no obsta para que el farmacéutico comunitario todavía cuente con un papel asistencial relevante, habida cuenta de que muchos pacientes tratados con este tipo de medicamentos de terapia avanzada serán dados de alta y desarrollarán su vida diaria en el ámbito ambulatorio, y muy probablemente acudirán con frecuencia a la farmacia comunitaria para retirar la medicación para otras comorbilidades u otros problemas de salud. Por este motivo, la **coordinación asistencial** sigue siendo un factor importante para garantizar la calidad de la atención ofrecida a los pacientes en tratamiento con una terapia génica, siendo necesario mantener actualizados los conocimientos sobre el perfil beneficio-riesgo de estos medicamentos relativamente “nuevos”.

En este sentido, se debe tener en cuenta que algunos medicamentos de terapia génica, especialmente las terapias CAR-T (como tisagenlecleucel, axicabtagén ciloleucel o brexucabtagén autoleucel, que son tres de las cinco terapias génicas disponibles en España), se asocian con un marcado **perfil de toxicidad**, destacando el riesgo del síndrome de liberación de citocinas, que se produce como

consecuencia de una activación del sistema inmunitario, con una intensa liberación de interleucinas como IL-1, IL-2 o IL-6 e interferón gamma, y que se caracteriza por la aparición de fiebre, taquicardia, hipotensión, disnea, con fallo renal y hepático en algunos casos, que puede llegar a conducir a la muerte del paciente. Por este motivo, los pacientes tratados con estas terapias deben permanecer en el hospital un mínimo de 10 días tras la administración del fármaco, permaneciendo en observación por el equipo clínico –en el que se incluyen hematólogos, intensivistas, neurólogos y también farmacéuticos hospitalarios, entre otros profesionales–, para reconocer y manejar estas toxicidades de manera temprana.

Estos pacientes se pueden beneficiar igualmente de la colaboración entre distintos niveles asistenciales, entre los que se incluye la farmacia comunitaria. Como parte del programa de gestión de riesgos, el paciente recibe una tarjeta que le identifica como receptor de un fármaco CAR-T (**Tabla 3**). De esta forma, cualquier otro profesional sanitario podrá realizar una mejor identificación de un efecto adverso que aparezca repentinamente y además facilitará el contacto inmediato con sus profesionales de referencia. Así, se ha propuesto, por ejemplo, incluir alertas en los sistemas de prescripción y dispensación asociadas a estos pacientes a lo largo de todo el sistema de salud (atención primaria y especializada, farmacia comunitaria), de forma que se haga una doble verificación previa a la utilización de determinados fármacos, como los corticoides, que están contraindicados en estos pacientes (**Figura 6**).

Tabla 3. Información que debe incluirse en las tarjetas de información para el paciente.

<p>Datos del paciente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Identificación del paciente. • Trazabilidad: lote del fármaco infundido y fecha de administración. <p>Datos del equipo asistencial:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hospital y equipo responsable. • Números de teléfono para el contacto directo con el equipo. <p>Información para el paciente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Necesidad de mantenerse en un lugar cercano al hospital donde se administró el fármaco CAR-T al menos durante 4 semanas después. • Indicación de no conducir o manejar maquinaria pesada hasta 8 semanas después de la administración del fármaco. <p>Cómo reconocer los efectos adversos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de liberación de citoquinas: síntomas de alerta (fiebre, dificultad para respirar, náuseas y vómitos, diarrea, etc.) e indicación de acudir al hospital urgentemente si se presentan. • Toxicidad neurológica: síntomas de alerta (confusión, temblor, dificultades para hablar, etc.) e indicación de acudir urgentemente al hospital si se presentan. <p>Información para profesionales sanitarios:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Contraindicación del uso de corticoides y vacunas con virus vivos. • Datos de contacto de los profesionales responsables del tratamiento a nivel hospitalario para continuidad asistencial. <p>Farmacovigilancia:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Notificación de RAMS a través del Sistema Español de Farmacovigilancia (para profesionales sanitarios y pacientes).



Figura 6. Oportunidades para la colaboración de los farmacéuticos en el manejo de los pacientes tratados con terapias CAR-T. Tomada de (Revuelta Herrero *et al*, 2019).

Además de las funciones asistenciales, cabe resaltar de manera especial el papel de los farmacéuticos en la **investigación** en este tipo de terapias avanzadas. Como profesionales sanitarios expertos en el medicamento, los farmacéuticos pueden participar a cualquier nivel en la investigación clínica de nuevas opciones farmacoterapéuticas, con una particular perspectiva integradora.

A nivel de investigación básica, los farmacéuticos que se desempeñan en el ámbito de la docencia y la investigación en la Academia están capacitados y familiarizados con la identificación y aislamiento de principios activos de distintas fuentes, la síntesis química, la química analítica, la biotecnología y los estudios farmacológicos a diferentes escalas. Desde el ámbito de la farmacia industrial y galénica, especialización propia de la profesión, los farmacéuticos contribuyen al desarrollo de novedosas formas de administración, mejorando e ideando formas farmacéuticas y optimizando procesos de obtención.

En el área de la investigación en estudios clínicos, los farmacéuticos especialistas participan con frecuencia en el desarrollo experimental desde la farmacia hospitalaria, ya que el investigador principal delega habitualmente las tareas relacionadas con la gestión de los medicamentos en investigación, siendo los farmacéuticos los encargados de la recepción, custodia y preparación de los mismos. Entre sus tareas se encuentran las de registrar todos los movimientos del producto en investigación, su entrada, dispensación, devolución o gestión de los residuos, incluyendo su posible destrucción; también es habitual que el farmacéutico lleve una contabilidad de la medicación.

Por otra parte, dentro de la industria farmacéutica, ejercen farmacéuticos en aquellos

departamentos implicados en investigación clínica, a los que acceden por lo general tras formaciones específicas de posgrado. El departamento comúnmente llamado *de operaciones clínicas* es el encargado de iniciar y desarrollar un ensayo, y en él se pueden encontrar farmacéuticos en puestos de coordinación y como monitores, fundamentalmente. También trabajan farmacéuticos dentro del *departamento de gestión de datos*, principalmente en tareas de coordinación, encargados de asegurar que los datos procedentes del ensayo son completos y exactos; participan también en el diseño del cuaderno de recogida de datos y de la base de datos, transmiten las consultas para su resolución y se encargan de unificar la terminología médico-científica para que todas las entradas a la base de datos sean iguales para el mismo concepto (por ejemplo, *cefalea* para dolor de cabeza, jaqueca, cefalalgia, etc.). Otro campo de actuación del farmacéutico dentro de la industria tiene lugar en los departamentos médicos, colaborando en el diseño de protocolos, la elaboración de informes, enmiendas y cualquier otro documento relacionado con un ensayo clínico de carácter técnico.

En definitiva, el perfil profesional del farmacéutico se ha ido especializando en distintos campos, si bien el conocimiento de los medicamentos es la esencia de la profesión en todos ellos. Por ello, la participación de los farmacéuticos en los procesos relacionados con el desarrollo, distribución, dispensación de los medicamentos, así como en el seguimiento de los resultados de la farmacoterapia, contribuye a garantizar la calidad asistencial para los pacientes, un elemento que cobra especial relevancia en el caso de los medicamentos de terapia génica debido a los múltiples aspectos de innovación que incorporan.

BIBLIOGRAFÍA

- **Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).** Ficha técnica de Tecartus® (brexucabtagén autoleucel). 2024. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1201492001/FT_1201492001.html.
- **Charpentier E, Doudna JA.** Biotechnology: Rewriting a genome. *Nature*. 2013; 495(7439): 50-1. DOI: 10.1038/495050a.
- **Colella P, Ronzitti G, Mingozi F.** Emerging Issues in AAV-Mediated *In Vivo* Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017; 8: 87-104. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.11.007.
- **Cuellar Rodríguez S.** Investigación y desarrollo de fármacos biológicos. En: *Medicamentos biológicos. Innovadores y biosimilares*. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 2019. p. 21-66.
- **Cuellar Rodríguez S.** Tendencias en el registro de nuevas terapias avanzadas. *Panorama Actual Med*. 2024; 48(470): 34-47.
- **Day JW, Finkel RS, Chiriboga CA, Connolly AM, Crawford TO, Darras BT et al.** Onasemnogene abeparvovec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy in patients with two copies of SMN2 (STRIVE): an open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2021; 20(4): 284-93. DOI: 10.1016/S1474-4422(21)00001-6.
- **Delgado J, Ortiz-Maldonado V.** Complicaciones de la terapia celular CAR-T. En: *Terapia celular con linfocitos CAR-T: presente y futuro*. Sant Just Desvern: Medical Media SCP; 2020. p. 57-88.
- **Di Felice F, Micheli G, Camilloni G.** Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview. *J Biosci*. 2019; 44(2): 38.
- **European Medicines Agency (EMA).** Kymriah®. European Public Assessment Report (EPAR). 2018. EMA/485563/2018. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/kymriah-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- **Fernández Moriano C.** Axicabtagén ciloleucel (Yescarta®) en linfoma difuso y linfoma primario mediastínico de células grandes B. *Panorama Actual Med*. 2019b; 43(426): 913-21.
- **Fernández Moriano C.** Onasemnogen abeparvovec (Zolgensma®) en atrofia muscular espinal. *Panorama Actual Med*. 2022; 46(450): 54-62.
- **Fernández Moriano C.** Tisagenlecleucel (Kymriah®) en leucemia linfoblástica aguda de células B y linfoma difuso de células grandes B. *Panorama Actual Med*. 2019a; 43(422): 339-51.
- **Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen YS, Domm J, Eustace BK et al.** CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *N Engl J Med*. 2021; 384(3): 252-60. DOI: 10.1056/NEJMoa2031054.
- **Henderson ML, Zieba JK, Li X, Campbell DB, Williams MR, Vogt DL et al.** Gene Therapy for Genetic Syndromes: Understanding the Current State to Guide Future Care. *BioTech (Basel)*. 2024; 13(1): 1. DOI: 10.3390/biotech13010001.
- **Hindi SM, Petrany MJ, Greenfeld E, Focke LC, Cramer AAW, Whitt MA et al.** Enveloped viruses pseudotyped with mammalian myogenic cell fusogens target skeletal muscle for gene delivery. *Cell*. 2023; 186(10): 2062-77.e17. DOI: 10.1016/j.cell.2023.03.033. Errata en: *Cell*. 2023; 186(16): 3520.
- **Khobragade A, Bhat S, Ramaiah V, Deshpande S, Giri K, Phophle H et al.** Efficacy, safety, and immunogenicity of the DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): the interim efficacy results of a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study in India. *Lancet*. 2022; 399(10332): 1313-21. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00151-9.
- **Kozak M, Hu J.** DNA Vaccines: Their Formulations, Engineering and Delivery. *Vaccines (Basel)*. 2024; 12(1): 71. DOI: 10.3390/vaccines12010071.
- **Lee RG, Mazzola AM, Braun MC, Platt C, Vafai SB, Kathiresan S et al.** Efficacy and Safety of an Investigational Single-Course CRISPR Base-Editing Therapy Targeting *PCSK9* in Nonhuman Primate and Mouse Models. *Circulation*. 2023; 147(3): 242-53. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.062132.
- **Liu C, Zhang L, Zhu W, Guo R, Sun H, Chen X et al.** Barriers and Strategies of Cationic Liposomes for Cancer Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020; 18: 751-64. DOI: 10.1016/j.omtm.2020.07.015.
- **Mallapaty S, Kozlov M.** First pig kidney transplant in a person: what it means for the future. *Nature*. 2024; 628(8006): 13-4. DOI: 10.1038/d41586-024-00879-y.
- **Meng J, Wu X, Sun Z, Xun R, Liu M, Hu R et al.** Efficacy and Safety of CAR-T Cell Products Axicabtagene Ciloleucel, Tisagenlecleucel, and Lisocabtagene Maraleucel for the Treatment of Hematologic Malignancies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2021; 11: 698607. DOI: 10.3389/fonc.2021.698607. Errata en: *Front Oncol*. 2021; 11: 768128.
- **Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E.** Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 2005; 60(2): 174-82. DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3.
- **Nelson DL, Cox MM.** *Lehninger principles of biochemistry*. 7ª ed. Barcelona: Omega. 2017.
- **Olive M, Eisenlohr L, Flomenberg N, Hsu S, Flomenberg P.** The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4+ T-cell epitope. *Hum Gene Ther*. 2002; 13(10): 1167-78. DOI: 10.1089/104303402320138952.
- **Pagliari S, Dema B, Sanchez-Martínez A, Montalvo Zurbia-Flores G, Rollier CS.** DNA Vaccines: History, Molecular Mechanisms and Future Perspectives. *J Mol Biol*. 2023; 435(23): 168297. DOI: 10.1016/j.jmb.2023.168297.
- **Pipe SW, Leebeek FWG, Recht M, Key NS, Castaman G, Miesbach W et al.** Gene Therapy with Etranacogene Dezaparvovec for Hemophilia B. *N Engl J Med*. 2023; 388(8): 706-18. DOI: 10.1056/NEJMoa2211644.
- **Ronzitti G, Gross DA, Mingozi F.** Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. *Front Immunol*. 2020; 11: 670. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00670.
- **Schnell MA, Zhang Y, Tazelaar J, Gao GP, Yu QC, Qian R.** Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors. *Mol Ther*. 2001; 3(5 Pt 1): 708-22. DOI: 10.1006/mthe.2001.0330.
- **Schuster SJ, Tam CS, Borchmann P, Worel N, McGuirk JP, Holte H et al.** Long-term clinical outcomes of tisagenlecleucel in patients with relapsed or refractory aggressive B-cell lymphomas (JULIET): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2021; 22(10): 1403-15. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00375-2.
- **Strachan T, Read AP.** *Human Molecular Genetics*. 5ª ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2019.
- **Strauss KA, Farrar MA, Muntoni F, Saito K, Mendell JR, Servais L et al.** Onasemnogene abeparvovec for presymptomatic infants with three copies of SMN2 at risk for spinal muscular atrophy: the Phase III SPR1NT trial. *Nat Med*. 2022; 28(7): 1390-7. DOI: 10.1038/s41591-022-01867-3.
- **Tecalco-Cruz A, Macías-Silva M, Ramírez J, Ríos D, Zepeda-Cervantes J.** Mecanismos básicos en la modulación de la expresión génica: algunas implicaciones en el envejecimiento del cerebro. *TIP Rev Esp Cienc Quím Biol*. 2021; 24: 1-15. DOI: 10.22201/fesz.23958723e.2021.0.295.
- **Wang L, Wang G, Mao W, Chen Y, Rahman MM, Zhu C et al.** Bioinspired engineering of fusogen and targeting moiety equipped nanovesicles. *Nat Commun*. 2023; 14(1): 3366. DOI: 10.1038/s41467-023-39181-2.