Sobre la terapia génica para enfermedades de la retina

M. Dominik Fischer

University Eye Hospital, Centro de Oftalmología, Universidad de Tubinga, Tubinga, Alemania; Laboratorio de Oftalmología Nuffield, Departamento de Neurociencias Clínicas, Universidad de Oxford, Oxford, Reino Unido

Palabras clave

Terapia génica · Distrofia retiniana · Cirugía vitreoretiniana

Resumen

Las mutaciones en un gran número de genes provocan degeneración de la retina y ceguera sin que exista actualmente cura alguna. En las últimas décadas, la terapia génica para enfermedades de la retina ha evolucionado y se ha convertido en un nuevo y prometedor paradigma terapéutico para estas enfermedades poco comunes. Este artículo refleja las ideas y los conceptos que parten de la ciencia básica hacia la aplicabilidad de la terapia génica en el ámbito clínico. Se describen los avances y las reflexiones actuales 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.

© 2017 S. Karger AG, Basel

Introducción

La terapia génica puede definirse como la aportación de una secuencia terapéutica de nucleótidos, tales como el ADN, a las células afectadas de un paciente. De este modo, la molécula ayuda a las células a que se ayuden a sí mismas proporcionándoles nueva información que

podrán utilizar para contrarrestar un mecanismo importante de la enfermedad. A modo de ejemplo se encuentra la introducción de una copia sana de la secuencia codificante *RPGR* en pacientes con retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X de tipo 3, provocada por mutaciones en el gen *RPGR*. Tras proporcionarles una copia sana del gen, los fotorreceptores transducidos son capaces de producir el producto génico normal y restablecer un estado de equilibrio fisiológico.

Esta sencilla pero elegante idea nació después de que, a partir de los estudios realizados por Avery et al. [1] en los años 40, se hiciera evidente (1) que los nucleótidos (no proteínas) contienen nuestro código genético y (2) que esa transferencia de nucleótidos en una célula permite a la célula receptora utilizar esta novedosa información y desempeñar nuevas funciones. Tras el descubrimiento de que la transferencia de genes era ya una parte establecida del repertorio de la naturaleza y era llevado a cabo de forma habitual por partículas virales [2], Rogers y Pfunderer [3] fueron los primeros en promover la idea de la transferencia de un gen viral con fines terapéuticos a finales de los años 60. Después de que se planteara la idea principal, se definieron inmediatamente varios obstáculos. Se con-

The Spanish version should be cited as DOI: 10.1159/000477516. The original version is in English and should be cited as DOI: 10.1159/000445782.

sideraron como áreas clave de la investigación la tecnología del ADN recombinante (cómo crear la secuencia nucleotídica terapéutica) y la eficacia de la transferencia de genes (cómo introducirla en la célula diana). Estas áreas de la investigación básica fueron más exitosas a finales del siglo XX y fueron relacionadas por los rápidos avances que se llevaron a cabo en la caracterización clínica y molecular de las enfermedades hereditarias de la retina (EHR). Por ejemplo, el *RPGR* fue el primer gen de EHR que se clonó y se caracterizó a comienzos de los años 90. Desde entonces, más de 250 genes y locus repartidos por los 22 cromosomas autosómicos, el cromosoma X y el genoma mitocondrial se han asociado a una o varias EHR. Como consecuencia, existe una enorme y claramente definida necesidad no cubierta de desarrollar tratamientos para estas alteraciones que producen ceguera.

Avances en el campo del diagnóstico

La oftalmología ha desempeñado una función pionera en términos de comprender las enfermedades hereditarias desde los inicios de la genética médica por dos importantes razones: los defectos genéticos que conllevan disfunción visual provocan una incapacidad considerable, que los pacientes rápidamente detectan e informan y que el médico vincula fácilmente al órgano afectado incluso cuando los recursos diagnósticos son relativamente limitados y antes de que se dispusiera de un conocimiento detallado de los mecanismos genéticos. En segundo lugar, el ojo y sus estructuras afectadas podían investigarse en detalle en una fase temprana. Desde que Hermann von Helmholtz introdujo el oftalmoscopio en 1850, Frans Cornelis Donders (1818–1889), en Utrecht, Albrecht von Graefe (1828–1870), en Berlín, Robert Walter Doyne (1857–1916), en Oxford, y otros pioneros triunfadores en el campo de la oftalmología han utilizado el exclusivo privilegio de observar directamente el tejido neurorretiniano in vivo y con una precisión microscópica para describir los cambios patológicos relacionados con patrones de herencia. Así, la primera descripción de pigmentación en espícula ósea (un distintivo clínico de las EHR) la proporcionó Donders [4] en *Graefe's Archives* ya en 1857. Hoy en día, una amplia gama de herramientas diagnósticas ayuda a describir con detalle los cambios morfológicos y funcionales de las enfermedades de la retina [5–7]. No obstante, la baja incidencia de las EHR a menudo complica la realización de ensayos observacionales prospectivos útiles por parte de centros individuales al intentar definir los criterios de valoración y

diseños de estudio más adecuados para un ensayo intervencional. Esta situación requiere que se acuda a la antigua colaboración entre centros clínicos y nuevos modelos para incluir colaboradores no universitarios, tales como asociaciones de pacientes y entidades financiadoras con el objetivo común de coordinar los esfuerzos y reunir datos de pacientes con enfermedades poco habituales. Las bases de datos internacionales con datos clínicos normalizados ayudarían enormemente a identificar criterios de valoración relevantes y diseños de ensayo inteligentes para estudios intervencionales.

Las pruebas genéticas moleculares, junto con las pruebas clínicas, representan un requisito indispensable para la terapia génica. La secuenciación de Sanger se considera el criterio de referencia para diagnosticar mutaciones en regiones diana. Sin embargo, resulta complicado y costoso cubrir áreas genómicas amplias mediante este enfoque de secuenciación directo, y todos los análisis son por hipótesis: determinados genes se investigan según el tipo en función de cuadros clínicos inequívocos (por ejemplo, la distrofia de conos frente a la distrofia de bastones primaria o la macular). Como resultado, los «sospechosos habituales» se recogen de forma eficiente, pero las mutaciones que van más allá del catálogo conocido permanecen sin detectar en los análisis diagnósticos rutinarios. Esto cambió con el avance de la secuenciación de siguiente generación, que aceleró la identificación de las mutaciones patógenas novedosas. No obstante, la calidad sin hipótesis conducida de este análisis a menudo conlleva una amplia cantidad de datos que resulta complicado interpretar. Por ejemplo, cada vez existen más pruebas de mutaciones múltiples en diferentes loci en pacientes con EHR, lo que desafía la concepción de que las EHR son defectos por un único gen [8]. Esto puede explicar en parte la heterogeneidad de su presentación fenotípica: pacientes con la misma mutación diagnosticada pueden tener defectos genéticos adicionales o modificadores polimorfos que explican las diferencias en la gravedad de la enfermedad o el índice de evolución de la enfermedad, por ejemplo. Además de provocar un impacto en la correlación genotipo-fenotipo, esto también afecta a los ensayos de terapias génicas, en los que la selección de pacientes debe confeccionarse con mucho cuidado para no incluir a pacientes con mutaciones patógenas adicionales. Por ejemplo, los pacientes con acromatopsia con dos mutaciones homocigotas en *CNGA3* y *CNGB3* probablemente no obtendrían beneficio terapéutico mediante terapia génica por aumento de *CNGA3* pues todavía faltaría la subunidad β del canal CNG incluso después de haber aplicado una terapia génica satisfactoria. El con-

cepto de causas multigenéticas de EHR también resulta de interés para el desarrollo de futuros tratamientos para enfermedades tales como la generación macular relacionada con la edad, en la que una gran multitud de loci genéticos (*ABCA4*, *ARMS2*, *C2*, *C3*, *CFB*, *CFH*, *ERCC6*, *FBLN5*, *HMCN1*, *HTRA1*, *RAX2*, *TLR3* y *TLR4*) determinan el riesgo genético de desarrollar la enfermedad.

Instrumentos para la terapia génica en enfermedades de la retina

Las primeras terapias génicas virales se llevaban a cabo con diversas clases de virus que se integraban en el genoma de las células diana. En la división celular, las células hijas heredarán el genoma «tratado», provocando así un efecto terapéutico continuo, por ejemplo, en la médula ósea u otros tejidos mitóticos diana. Esto evita un lavado de la terapia génica en las generaciones posteriores de, por ejemplo, los linfocitos de médula ósea. El riesgo potencial de integración se encuentra en las posibilidades que existen de que la información genética importante se vea afectada, como por ejemplo un gen supresor de tumores. Como el tejido de la retina es posmitótico, el beneficio de integración es menos relevante, favoreciendo el riesgo-beneficio de vectores virales no integradores, tales como el virus adenoasociado (AAV, por sus siglas en inglés).

Los virus adenoasociados pertenecen al género *Dependovirus* de la familia de los *Parvoviridae* [9]. *Parvus* significa en latín «pequeño», indicando de este modo el tamaño de los *Parvoviridae*. Los AAV miden aproximadamente 20 nm de diámetro y poseen una capacidad de empaquetamiento de aproximadamente 4,8 kb de ADN monocatenario. No poseen estructuras con envoltura y son menos inmunógenos que, por ejemplo, el adenovirus [10]. El VAA recombinante (rAAV, por sus siglas en inglés) utilizado en todos los ensayos clínicos manifiesta elementos del serotipo 2 VAA de origen humano. Los ensayos dirigidos a la amaurosis congénita de Leber (LCA, por sus siglas en inglés) y la coroideremia utilizaron proteínas de la cápside VAA2 para empaquetar el transgén terapéutico. Las proteínas de la cápside son las primeras en interactuar con células diana y no diana y en determinar el tropismo tisular y la eficiencia de infección. Los viriones del rAAV2 consiguen entrar en las células diana utilizando el receptor intracelular de proteoglicanos de heparán sulfato. La interiorización aumenta por las interacciones con uno o más de los hasta ahora seis conocidos correceptores, incluyendo la integrina $\alpha_5\beta_1$, el receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos, el

receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, la integrina $\alpha_5\beta_1$ y el receptor de la laminina [11–13]. La unión del rAAV2 a un receptor de superficie celular inicia la interiorización (endocitosis mediada por receptor) mediante estructuras recubiertas de clatrina. Una vez interiorizado, el virus enseguida se mueve hacia el núcleo de la célula y aumenta de forma perinuclear en un intervalo de 30 minutos tras el comienzo de la endocitosis. Entonces, las partículas virales penetran lentamente en el núcleo, posiblemente a través del complejo del poro nuclear [14]. En un intervalo de 2 horas, las partículas virales pueden detectarse en el núcleo celular, indicando que el rAAV entra en el núcleo antes de dejar el recubrimiento, aunque la expresión completa del transgén tarda de días a semanas en función del tejido, el tipo celular y el serotipo del AAV. Como tal, la liberación del nucleótido monocatenario terapéutico y la posterior síntesis de la segunda cadena y configuración como estructuras cromatínicas monoméricas y/o concatémicas ayudan a dirigir la dinámica de la expresión [15, 16]. Las integraciones se han hecho muy poco probables debido a la eliminación de los genes salvajes de virus para Rep78 y Rep68, que son elementos cruciales para la integración del genoma vector, lo que ha hecho que el riesgo de mutagénesis por inserción sea insignificante [17, 18]. Este hecho también se ve respaldado por la observación de que los rAAV se han utilizado durante más de 20 años en estudios de transferencia genética ocular en modelos animales y durante más de 10 años en ensayos clínicos con humanos sin que se obtenga ningún signo de transformación maligna [19].

Un tema que ha suscitado interés entre científicos y médicos es el desarrollo de distintas «sutilezas» de vectores de AAV, que podría optimizarse para la ruta de aplicación y/o población celular destinataria. El vector ideal sería altamente específico al tipo celular diana (por ejemplo, fotorreceptores de conos) y llegar a él de la forma menos invasiva posible. Esto se puede conseguir mediante un diseño selectivo o evolución dirigida entre otras estrategias [20, 21]. Además, los elementos reguladores en la secuencia terapéutica pueden diseñarse para aumentar la especificidad de la expresión [22] e incluso permitir la regulación de los niveles de expresión en el transcurso de la enfermedad [23].

¿Funciona la terapia génica?

En aquellos años, la comunidad investigadora tuvo un éxito extraordinario con el desarrollo (pre)clínico de los vectores de AAV para EHR [24–32]. Este hito condujo a

la realización de ensayos clínicos de referencia con aplicaciones de terapias génicas oculares realizados por primera vez en seres humanos [28, 29, 33] para tratar la amaurosis congénita de Leber de tipo 2 (OMIM 204100) con AAV2.RPE65. La RPE65 es una isomerasa que se encuentra en el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y que es responsable de reciclar los derivados de la vitamina A, que a su vez son necesarios para detectar la luz en los fotorreceptores. Las mutaciones en la RPE65 provocaron una reducción drástica de la sensibilidad de la retina a los estímulos de luz, degeneración del EPR y los fotorreceptores y finalmente ceguera. Estos ensayos en fase I/II fueron mostraron con éxito la seguridad de la adición de genes en pacientes con mutaciones de aminoácidos, así como mutaciones anuladoras [34, 35]. Este hallazgo resultó relevante, pues hasta entonces no quedaba claro si los pacientes con mutaciones anuladoras darían una respuesta inmunitaria contra el producto terapéutico transgénico pues este sería nuevo para el sistema inmunitario. Bennett et al. [36] fueron los primeros en demostrar la ausencia de una respuesta inmunitaria clínicamente significativa tras una segunda administración de AAV2.RPE65 en el ojo contralateral después de haber pasado años tras la primera inyección. Sobre la base de este estudio pionero, se pudieron extraer varias conclusiones:

- Se puede administrar un gran número de partículas de AAV en el espacio subretiniano sin que ello provoque efectos tóxicos clínicamente evidentes.
- La presencia de AAV en el espacio subretiniano no conlleva una respuesta inmunitaria clínicamente significativa.
- La adición de genes a células del EPR puede reparar la actividad metabólica a niveles clínicamente relevantes.

No obstante, no se alcanzaron en estos ensayos algunas de las expectativas más optimistas, tales como reparar la visión en pacientes con LCA2. Esta expectativa había sido alimentada por los resultados excepcionales que se habían obtenido a partir de estudios preclínicos en modelos animales de LCA2, siendo Lancelot el receptor más destacado que visitó el Senado estadounidense [37]. Lancelot fue uno de los pastores de Brie con mutación en el RPE65 (habitual en esta raza) que fueron tratados con AAV2.RPE65. El efecto del tratamiento fue notable, mostrando una sólida evidencia electrofisiológica de eficacia y un cambio de comportamiento muy claro. Aunque la mayoría de los pacientes de los primeros ensayos mostraron algún tipo de mejora en las pruebas psicofísicas que miden la sensibilidad de la retina en condiciones mesópicas o escotópicas, ningún paciente demostró haber

conseguido una respuesta electrofisiológica. Esto se considera complicado dada la naturaleza desenmascarada del diseño del ensayo.

El seguimiento a largo plazo de los pacientes de los primeros ensayos apunta además hacia un posible descenso de la mejora funcional inicial [34, 35]. Se postularon varias posibles explicaciones sobre por qué el beneficio terapéutico no resultaba más obvio y por qué existía una indicación de degeneración continuada. Una de ellas mantiene que la intervención se había hecho demasiado tarde para detener de forma efectiva la degeneración del tejido retiniano restante. Esto viene respaldado por observaciones en modelos animales, en los que el éxito terapéutico dependía en gran medida del momento de la intervención [38, 39]. El tratamiento realizado en estadios tempranos de la enfermedad mostró un rescate funcional y estructural, mientras que una intervención tardía mostraba solo mejoras funcionales transitorias con una degeneración estructural continua que finalmente desemboca en una ceguera completa. Algunos autores sostienen que el estadio de la enfermedad de pacientes reclutados equivalía al segundo grupo y, por ello, solo fue posible obtener un beneficio funcional transitorio. Los datos publicados por Maguire et al. [30] respaldan este argumento mediante un efecto terapéutico mucho mayor observado en pacientes más jóvenes. No obstante, Bainbridge et al. [35] y Jacobson et al. [34] no pudieron encontrar una correlación clara entre la edad del participante y la respuesta al tratamiento. De hecho, Bainbridge et al. [35] presentaron las mayores mejoras en participantes de mayor edad.

De manera indirecta, esto conduce al segundo argumento: puede ser que la dosis aplicada no haya alcanzado el umbral terapéutico requerido. El éxito superior conseguido en pacientes de mayor edad podría estar relacionado con el hecho de contar con una menor cantidad de tejido en un estadio de la enfermedad más tardío, aumentando así la proporción de partículas de AAV aplicadas a las células disponibles para la transducción (es decir, aumentando la multiplicidad de infección). Este argumento se encuentra respaldado por estudios caninos, que demuestran que las dosis de AAV2.REP65 por debajo del umbral pueden conllevar un rescate funcional limitado sin mejoras en la electrorretinografía (observado en pacientes), mientras que una dosis superior provocaba sólidas respuestas medidas mediante electrorretinografía, lo que también estaba asociado con una protección frente a la degeneración continua [35, 39].

Existe una tercera hipótesis que se centra en los cambios estructurales secundarios en el tejido de la retina de pacientes con LCA2: Cideciyan et al. [40] indicaron que

el efecto terapéutico del reciclado restaurado de todo el éster de *-trans-retinyl* en *11-cis-retinal* por la isomerasa transgénica RPE65 se podría limitar mediante una alteración patológica del tejido de la retina en degeneración, como por ejemplo segmentos externos de los fotorreceptores desorganizados y la acumulación de gotas lipídicas que forman una «barrera de resistividad».

Una cuarta posible explicación del rescate funcional limitado es la pérdida extensa y prolongada del área visual en pacientes con LCA2, que normalmente experimentan pérdidas graves de visión desde su nacimiento (de ahí el nombre «congénito»). De este modo, se podría argumentar que incluso con el mejor restablecimiento posible de la actividad de reciclado de la RPE65 y la fototransducción en los receptores restantes, la percepción de luz a nivel cognitivo podría verse determinada por una plasticidad cortical limitada. Un ejemplo que a menudo se cita es el desarrollo de ambliopía en pacientes en los que no se trató el estrabismo al menos hasta su primera década de vida. La corrección de dicho estrabismo en adultos normalmente no logra una mejora significativa de la visión del ojo ambliópico. No obstante, Ashtari et al. [41] demostraron un aumento significativo de la actividad en el área visual en pacientes con LCA2 tras someterse a terapia génica. La actividad se encontró en particular en la zona de la corteza que corresponde al área de tratamiento en la retina y se relacionó con una mejoría en otros criterios de valoración clínicos. Quizá lo que destacó en mayor medida fue que la mejora se hizo claramente evidente incluso 3 años después de la terapia génica, lo que indicaba un efecto positivo prolongado.

Otro ensayo clínico también muestra un panorama más optimista. Con AAV2.REP1, MacLaren et al. [42] trataron con éxito a 14 pacientes con coroideremia hasta la fecha. Los datos preliminares mostraron una buena seguridad y un aumento inesperado de la función visual en algunos de los pacientes. Estas evidencias fueron notables, pues la mayoría de los informes previos sobre coroideremia enfatizaban la conservación de la agudeza visual hasta los últimos estadios [43], y la mayoría de los pacientes del ensayo se sometieron a operación con una agudeza visual (casi) normal. Por consiguiente, el objetivo inicial era demostrar la seguridad y la eficacia en términos de prevenir un mayor deterioro de la visión. Por razones éticas, se trató el ojo que se encontraba en peor estado. Los últimos datos de seguimiento de los participantes del ensayo indican ahora que el ojo tratado (el que inicialmente se encontraba en peor estado) de la mayoría de los pacientes es el que actualmente posee una mejor funcionalidad. Teniendo en cuenta que el seguimiento se ha

realizado durante más de 3 años, este hecho indica que la terapia génica puede generar un efecto terapéutico prolongado en pacientes humanos del mismo modo que hemos observado en modelos animales.

En conjunto, existen varias razones que podrían explicar la razón por la que algunos de los primeros ensayos «solo» conseguían mostrar la seguridad de la terapia génica subretiniana con AAV pero el alcance de su eficacia era limitado. Cabe señalar las enormes contribuciones realizadas por estos grupos en el ámbito de la terapia génica para enfermedades de la retina. Como resultado de su labor, se ha comenzado o diseñado un gran número de ensayos de terapia génica, y una inversión sin precedentes por parte del sector financiero en entidades centradas en terapia génica, tales como Oxford BioMedica plc., Spark Therapeutics, NightstarRx Ltd., Avalanche Bio-technologies, etc., ha convertido los programas (pre)clínicos de terapia génica actuales en un tratamiento aprobado con mayores probabilidades.

Posibles obstáculos y soluciones de la terapia génica en el futuro

Pueden identificarse algunos posibles obstáculos que probablemente retrasen el desarrollo de la terapia génica para enfermedades de la retina. Estos pueden dividirse en aspectos prácticos y cuestiones más abstractas.

Una barrera práctica de la terapia génica para enfermedades de la retina es la aplicación quirúrgica de la suspensión vectorial para transducir la población celular de destino de forma eficiente. La mayoría de las terapias génicas para enfermedades de la retina se dirigen al fotorreceptor y/o las células del EPR. Ambas poblaciones celulares se encuentran inmediatamente contiguas al posible espacio subretiniano, que puede rellenarse con soluciones salinas equilibradas con agujas finas produciendo un daño mínimo. Esta vía de administración tiene varias ventajas sobre las inyecciones intravítreas o intracamerales, entre las que se destaca una mayor eficiencia de transducción y un mayor control de la biodistribución. Además, se ha demostrado que el espacio subretiniano presenta una respuesta inmunitaria desviada similar a la desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior [10, 44]. Anulando de forma activa las respuestas inmunitarias potencialmente dañinas, la desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior podría haber participado en el éxito de la terapia génica subretiniana en el segundo ojo 1,7–3,3 años después del tratamiento del ojo contralateral [36].

La administración subretiniana de agentes terapéuticos es un procedimiento establecido en la cirugía Vitreoretiniana, y un ejemplo son las soluciones que contienen un activador tisular del plasminógeno recombinante para el tratamiento de hemorragias submaculares en pacientes con degeneración macular neovascular asociada con la edad [45, 46]. De este modo, se dispone de procedimientos e instrumentos microquirúrgicos para llevar a cabo la administración subretiniana; sin embargo, deben tenerse en cuenta ciertos factores específicos, tales como los pequeños volúmenes de inyección (~100–500 µl) y la solución excedente mínima para purgar e irrigar, así como las alteraciones biomecánicas del tejido ocular debido a la enfermedad subyacente.

Hasta la fecha, los distintos ensayos de terapia génica retiniana han aplicado la suspensión del vector en el espacio subretiniano, utilizando cada uno protocolos con pequeñas pero importantes diferencias: Bainbridge et al. [28] utilizaron 1.000 µl con intercambios de gas-líquido para inyectar de forma lenta la ampolla en la zona de destino. Maguire et al. [29] inyectaron 150 µl suspensión del vector con un 0,001% de PF-68 directamente en el espacio subretiniano de la zona diana, y un enfoque similar fue el que se utilizó en el ensayo realizado por Hauswirth et al. [33] con un volumen de 150–300 µl administrado directamente utilizando una aguja del calibre 39. Bennicelli et al. [47] han señalado que sin la adición del 0,001% de PF-68, el 90% de las partículas de AAV2 se queda retenido en el sistema de inyección. Por ello, la dosis real que se administró en el ensayo de Bainbridge et al. [28] (que no usó PF-68) fue probablemente de una unidad logarítmica por debajo de lo que nominalmente se informa.

Sorprendentemente, otra barrera puede ser la falta de datos clínicos sólidos sobre la evolución natural de la enfermedad, el grado de simetría, la variabilidad test/re-test y/o comparación de análisis de criterios de valoración relevantes. La mayoría de las publicaciones actuales presentan estudios clínicos retrospectivos con serie de casos, en los que la cohorte puede estar definida únicamente en función del diagnóstico clínico. No obstante, los datos procedentes de ensayos prospectivos son mucho más adecuados para diseñar un ensayo intervencional válido con criterios de inclusión/exclusión adecuadamente definidos, calendarios de seguimiento y criterios de valoración primarios y secundarios. También es más probable que estos datos ayuden a identificar los posibles marcos de tratamiento para EHR; no obstante, cabe la posibilidad de que ensayos intervencionales actuales y futuros proporcionen datos más relevantes.

Un riesgo más abstracto en la evolución de la terapia génica es el esfuerzo que se requiere para conseguir realmente la aprobación de un ensayo (para su introducción en el mercado) por parte de organismos reguladores en relación con los recursos financieros y humanos disponibles para el investigador universitario. Los programas Designación de Medicamento Huérfano de la FDA y la EMA tan solo conforman una parte de la solución. Parece ser necesaria una mayor presión por parte de asociaciones de pacientes para mejorar los procedimientos y hacer las aplicaciones de productos en fase de investigación clínica más económicos para los investigadores universitarios. A modo de ejemplo, sería posible proporcionar datos de biodistribución sobre, por ejemplo, el vector AAV8 después de su aplicación subretiniana en primates no humanos y utilizar estos datos en ensayos con diferentes sistemas transgénicos en tanto que la cápside, la solución del vector y los métodos de administración sean idénticos. Tendría mucho sentido que se consolidasen los requisitos normativos a nivel internacional (por ejemplo, en la UE), especialmente a la hora de lidiar con enfermedades huérfanas, en las que los ensayos de gran tamaño se beneficiarían de los múltiples centros que participarían debido a la baja prevalencia que hay en cada país. Los organismos reguladores y asociaciones de pacientes son partes implicadas clave, pero la responsabilidad de señalar las formas de mejorar la práctica actual recae sobre el investigador.

Agradecimientos

El autor desea agradecer el importante apoyo recibido de sus profesores en el laboratorio y las instalaciones clínicas. Tejvir S. Khurana, Johannes Fleischhauer y Daniel Barthelmes fueron mis primeros maestros, seguidos de Mathias Seeliger, Eberhart Zrenner y Karl Ulrich Bartz-Schmidt. Robert E. MacLaren, Alun Barnard y Michelle McClements me proporcionaron un asesoramiento y orientación excelentes durante mi doctorado en terapia génica para enfermedades de la retina. Ahora mis profesores son los pacientes a los que trato con terapia génica.

Declaración de situación

El autor no tiene ningún conflicto de interés que declarar.

Referencias bibliográficas

- Avery OT, Macleod CM, McCarty M: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med* 1944;79: 137–158.
- Sambrook J, Westphal H, Srinivasan PR, Dulbecco R: The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968;60:1288–1295.
- Rogers S, Pfuderer P: Use of viruses as carriers of added genetic information. *Nature* 1968;219:749–751.
- Donders FC: Beiträge zur pathologischen Anatomie des Auges: Pigmentbildung in der Netzhaut. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1857;3:139–150.
- Birch DG, Locke KG, Felius J, Klein M, Wheaton DK, Hoffman DR, Hood DC: Rates of decline in regions of the visual field defined by frequency-domain optical coherence tomography in patients with *RPGR*-mediated X-linked retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 2015;122:833–839.
- Zahid S, Khan N, Branham K, Othman M, Karoukis AJ, Sharma N, Moncrief A, Mahmood MN, Sieving PA, Swaroop A, Heckenlively JR, Jayasundera T: Phenotypic conservation in patients with X-linked retinitis pigmentosa caused by *RPGR* mutations. *JAMA Ophthalmol* 2013;131:1016–1025.
- Seitz IP, Zhou A, Kohl S, Llavona P, Peter T, Wilhelm B, Zrenner E, Ueffing M, Bartz-Schmidt KU, Fischer MD: Multimodal assessment of choroideremia patients defines pretreatment characteristics. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015;253:2143–2150.
- Chiang JP, Trzupke K: The current status of molecular diagnosis of inherited retinal dystrophies. *Curr Opin Ophthalmol* 2015;26:346–351.
- Samulski RJ, Berns KI, Tan M, Muzyczka N: Cloning of adeno-associated virus into PBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:2077–2081.
- Willett K, Bennett J: Immunology of AAV-mediated gene transfer in the eye. *Front Immunol* 2013;4:261.
- Buning H, Bolyard CM, Hallek M, Bartlett JS: Modification and labeling of AAV vector particles. *Methods Mol Biol* 2011;807:273–300.
- Lux K, Goerlitz N, Schlemminger S, Perabo L, Goldnau D, Endell J, Leike K, Kofler DM, Finke S, Hallek M, Buning H: Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. *J Virol* 2005;79:11776–11787.
- Perabo L, Goldnau D, White K, Endell J, Boucas J, Humme S, Work LM, Janicki H, Hallek M, Baker AH, Buning H: Heparan sulfate proteoglycan binding properties of adeno-associated virus retargeting mutants and consequences for their in vivo tropism. *J Virol* 2006; 80:7265–7269.
- Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ: Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 2000; 74:2777–2785.
- Penaud-Budloo M, Le Guiner C, Nowrouzi A, Toromanoff A, Cherel Y, Chenuaud P, Schmidt M, von Kalle C, Rolling F, Moullier P, Snyder RO: Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *J Virol* 2008;82:7875–7885.
- Schnepp BC, Jensen RL, Chen CL, Johnson PR, Clark KR: Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol* 2005;79:14793–14803.
- Bell P, Wang L, Lebherz C, Flieder DB, Bove MS, Wu D, Gao GP, Wilson JM, Wivel NA: No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice. *Mol Ther* 2005;12:299–306.
- Li H, Malani N, Hamilton SR, Schlachterman A, Bussadori G, Edmonson SE, Shah R, Arruda VR, Mingozi F, Wright JF, Bushman FD, High KA: Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood* 2011;117:3311–3319.
- Balaggan KS, Duran Y, Georgiadis A, Thang C, Barker SE, Buch PK, MacNeil A, Robbie S, Bainbridge JW, Smith AJ, Ali RR: Absence of ocular malignant transformation after subretinal delivery of rAAV2/2 or integrating lentiviral vectors in p53-deficient mice. *Gene Ther* 2012;19:182–188.
- Marsic D, Zolotukhin S: Altering tropism of rAAV by directed evolution. *Methods Mol Biol* 2016;1382:151–173.
- Buchholz CJ, Friedel T, Buning H: Surface-engineered viral vectors for selective and cell type-specific gene delivery. *Trends Biotechnol* 2015;33:777–790.
- Ye GJ, Budzynski E, Sonnentag P, Nork TM, Sheibani N, Gurel Z, Boye SL, Peterson JJ, Boye SE, Hauswirth WW, Chulay JD: Cone-specific promoters for gene therapy of achromatopsia and other retinal diseases. *Hum Gene Ther* 2016;27:72–82.
- Chen SJ, Johnston J, Sandhu A, Bish LT, Hovhannisyan R, Ino-Charles O, Sweeney HL, Wilson JM: Enhancing the utility of adeno-associated virus gene transfer through inducible tissue-specific expression. *Hum Gene Ther Methods* 2013;24:270–278.
- Bennett J: My career path for developing gene therapy for blinding diseases: the importance of mentors, collaborators, and opportunities. *Hum Gene Ther* 2014;25:663–670.
- Ali RR, Reichel MB, Thrasher AJ, Levinsky RJ, Kinnon C, Kanuga N, Hunt DM, Bhattacharya SS: Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector. *Hum Mol Genet* 1996;5:591–594.
- Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, Aleman TS, Cideciyan AV, Bannicelli J, Dejneka NS, Pearce-Kelling SE, Maguire AM, Palczewski K, Hauswirth WW, Jacobson SG: Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther* 2005;12: 1072–1082.
- Jacobson SG, Acland GM, Aguirre GD, Aleman TS, Schwartz SB, Cideciyan AV, Zeiss CJ, Komaromy AM, Kaushal S, Roman AJ, Windsor EA, Sumaroka A, Pearce-Kelling SE, Conlon TJ, Chiodo VA, Boye SL, Flotte TR, Maguire AM, Bennett J, Hauswirth WW: Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection. *Mol Ther* 2006;13:1074–1084.
- Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR: Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008;358:2231–2239.
- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN Jr, Mingozzi F, Bannicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'Osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zelenia O, Shindler KS, Maguire MG, Wright JF, Volpe NJ, McDonnell JW, Auricchio A, High KA, Bennett J: Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008;358:2240–2248.
- Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F, Mingozzi F, Bannicelli JL, Ying GS, Rossi S, Fulton A, Marshall KA, Banfi S, Chung DC, Morgan JI, Hauck B, Zelenia O, Zhu X, Raffini L, Coppieters F, De Baere E, Shindler KS, Volpe NJ, Surace EM, Acerra C, Lyubarsky A, Redmond TM, Stone E, Sun J, McDonnell JW, Leroy BP, Simonelli F, Bennett J: Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2009;374:1597–1605.
- Michalakakis S, Muhlfriedel R, Tanimoto N, Krishnamoorthy V, Koch S, Fischer MD, Becirovic E, Bai L, Huber G, Beck SC, Fahl E, Buning H, Paquet-Durand F, Zong X, Gollisch T, Biel M, Seeliger MW: Restoration of cone vision in the CNGA3-/- mouse model of congenital complete lack of cone photoreceptor function. *Mol Ther* 2010;18:2057–2063.
- Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, Peden MC, Aleman TS, Boye SL, Sumaroka A, Conlon TJ, Calcedo R, Pang JJ, Erger KE, Olivares MB, Mullins CL, Swider M, Kaushal S, Feuer WJ, Iannaccone A, Fishman GA, Stone EM, Byrne BJ, Hauswirth WW: Gene therapy for Leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Arch Ophthalmol* 2012;130:9–24.

- 33 Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, Conlon TJ, Boye SL, Flotte TR, Byrne BJ, Jacobson SG: Treatment of Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 2008;19:979–990.
- 34 Jacobson SG, Cideciyan AV, Roman AJ, Sumaroka A, Schwartz SB, Heon E, Hauswirth WW: Improvement and decline in vision with gene therapy in childhood blindness. *N Engl J Med* 2015;372:1920–1926.
- 35 Bainbridge JW, Mehat MS, Sundaram V, Robbie SJ, Barker SE, Ripamonti C, Georgiadis A, Mowat FM, Beattie SG, Gardner PJ, Feathers KL, Luong VA, Yzer S, Balaggan K, Viswanathan A, de Ravel TJ, Casteels I, Holder GE, Tyler N, Fitzke FW, Weleber RG, Nardini M, Moore AT, Thompson DA, Petersen-Jones SM, Michaelides M, van den Born LI, Stockman A, Smith AJ, Rubin G, Ali RR: Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2015;372:1887–1897.
- 36 Bennett J, Ashtari M, Wellman J, Marshall KA, Cyckowski LL, Chung DC, McCague S, Pierce EA, Chen Y, Bennicelli JL, Zhu X, Ying G-S, Sun J, Wright JF, Auricchio A, Simonelli F, Shindler KS, Mingozzi F, High KA, Maguire AM: AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Sci Transl Med* 2012;4:120ra15.
- 37 Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett J: Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 2001;28:92–95.
- 38 Cideciyan AV, Jacobson SG, Beltran WA, Sumaroka A, Swider M, Iwabe S, Roman AJ, Olivares MB, Schwartz SB, Komaromy AM, Hauswirth WW, Aguirre GD: Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:E517–E525.
- 39 Mowat FM, Breuwer AR, Bartoe JT, Annear MJ, Zhang Z, Smith AJ, Bainbridge JW, Petersen-Jones SM, Ali RR: RPE65 gene therapy slows cone loss in RPE65-deficient dogs. *Gene Ther* 2013;20:545–555.
- 40 Cideciyan AV, Aleman TS, Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S, Roman AJ, Pang JJ, Sumaroka A, Windsor EA, Wilson JM, Flotte TR, Fishman GA, Heon E, Stone EM, Byrne BJ, Jacobson SG, Hauswirth WW: Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:15112–15117.
- 41 Ashtari M, Cyckowski LL, Monroe JF, Marshall KA, Chung DC, Auricchio A, Simonelli F, Leroy BP, Maguire AM, Shindler KS, Bennett J: The human visual cortex responds to gene therapy-mediated recovery of retinal function. *J Clin Invest* 2011;121:2160–2168.
- 42 MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, Cottrill CL, Tolmachova T, Seymour L, Clark KR, During MJ, Cremers FP, Black GC, Lotery AJ, Downes SM, Webster AR, Seabra MC: Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet* 2014;383:1129–1137.
- 43 Roberts MF, Fishman GA, Roberts DK, Hecklively JR, Weleber RG, Anderson RJ, Grover S: Retrospective, longitudinal, and cross sectional study of visual acuity impairment in choroideraemia. *Br J Ophthalmol* 2002;86:658–662.
- 44 Bennett J: Immune response following intraocular delivery of recombinant viral vectors. *Gene Ther* 2003;10:977–982.
- 45 Treumer F, Roeder J, Hillenkamp J: Long-term outcome of subretinal coapplication of rTPA and bevacizumab followed by repeated intravitreal anti-VEGF injections for neovascular AMD with submacular haemorrhage. *Br J Ophthalmol* 2012;96:708–713.
- 46 Vander JF: Tissue plasminogen activator irrigation to facilitate removal of subretinal hemorrhage during vitrectomy. *Ophthalmic Surg* 1992;23:361–363.
- 47 Bennicelli J, Wright JF, Komaromy A, Jacobs JB, Hauck B, Zelenia O, Mingozzi F, Hui D, Chung D, Rex TS, Wei Z, Qu G, Zhou S, Zeiss C, Arruda VR, Acland GM, Dell'Osso LF, High KA, Maguire AM, Bennett J: Reversal of blindness in animal models of Leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Mol Ther* 2008;16:458–465.