

Teràpia gènica: per fi una opció en clínica

Fàtima Bosch

La teràpia gènica consisteix en la transferència de material genètic a cèl·lules o teixits per prevenir o curar una malaltia. En aquest moment, és sens dubte l'àrea més emocionant de la biomedicina, tant pels avenços recents com per les possibilitats a l'horitzó. En els darrers anys, s'han desenvolupat nombroses teràpies gèniques d'èxit centrades en malalties monogèniques minoritàries (també anomenades malalties rares). A mesura que la teràpia gènica arriba finalment a l'edat madura, els coneixements adquirits en aquests primers tractaments representen un enorme potencial per ampliar el camp i aplicar la teràpia gènica a malalties complexes, no hereditàries i d'alta prevalença que afecten grans poblacions de pacients.

Les malalties genètiques minoritàries no es poden curar mitjançant les teràpies que utilitzen medicaments convencionals. En principi, amb la restauració d'una còpia correcta del gen mutat, la teràpia gènica permetria que molts pacients sense cap esperança de millora poguessin tenir una vida llarga i en condicions

de normalitat. Després de superar molts dels reptes que van dificultar l'èxit de la teràpia gènica en els seus primers anys, la tecnologia de transferència genètica s'ha començat a utilitzar amb èxit per tractar diferents tipus de càncer i també malalties cardiovasculars, l'Alzheimer o la diabetis mellitus.

En aquest sentit, s'ha de ressaltar l'enorme potencial que ha demostrat la teràpia gènica per prevenir la gran pandèmia de COVID-19 a nivell global. Actualment, la majoria de la població mundial ha rebut les vacunes basades en gens transferits mitjançant adenovirus (AstraZeneca, Jansen) o en àcid ribonucleic (RNA) terapèutic en nanopartícules (Moderna, BioNTech-Pfizer) que permeten expressar una de les proteïnes virals per així poder desenvolupar immunitat contra el virus. Aquest ha estat un èxit extraordinari pel camp de la teràpia gènica que ha obert les portes a nombrosos desenvolupaments futurs en moltes altres àrees, no només per combatre malalties infeccioses.

Principals característiques de la teràpia gènica

Es poden distingir dos grans tipus d'aproximacions de teràpia gènica: 1) *in vivo*, basada en la introducció d'un gen/RNA terapèutic en un vector (viral o no viral) que s'administra directament al pacient, i 2) *ex vivo*, basada en la transferència del vector que porta el gen terapèutic a cèl·lules en cultiu, generalment obtingudes del mateix pacient, que posteriorment es re-introdueixen i produeixen la proteïna terapèutica (Fig. 1).

En el nostre grup ens hem centrat a desenvolupar teràpies gèniques *in vivo* tant per malalties minoritàries com d'alta prevalença. Per això, presentaré els aspectes claus d'aquest camp i uns exemples de les nostres recerques que ja estan avançant cap a la clínica.

Per tal de dissenyar una nova aproximació de teràpia gènica *in vivo*, s'ha de seleccionar en primer lloc el gen o el RNA terapèutic per tractar/prevenir la malaltia. Després, aquest àcid nucleic ha de ser transportat

mitjançant un vehicle o vector fins a la cèl·lula diana que serà l'encarregada d'expressar la proteïna terapèutica. Un aspecte clau per assolir la transferència del gen terapèutic a la cèl·lula diana, és la via d'administració mitjançant la qual el vector s'introduirà al pacient per tal d'arribar a la seva destinació. Finalment, cal disposar de models animals de les malalties humanes que s'han de tractar, en els quals es pugui assajar l'eficàcia i la seguretat de l'aproximació de teràpia gènica (Fig. 2). Els models animals més

Figura 1. Representació esquemàtica de les teràpies gèniques in vivo i ex vivo.

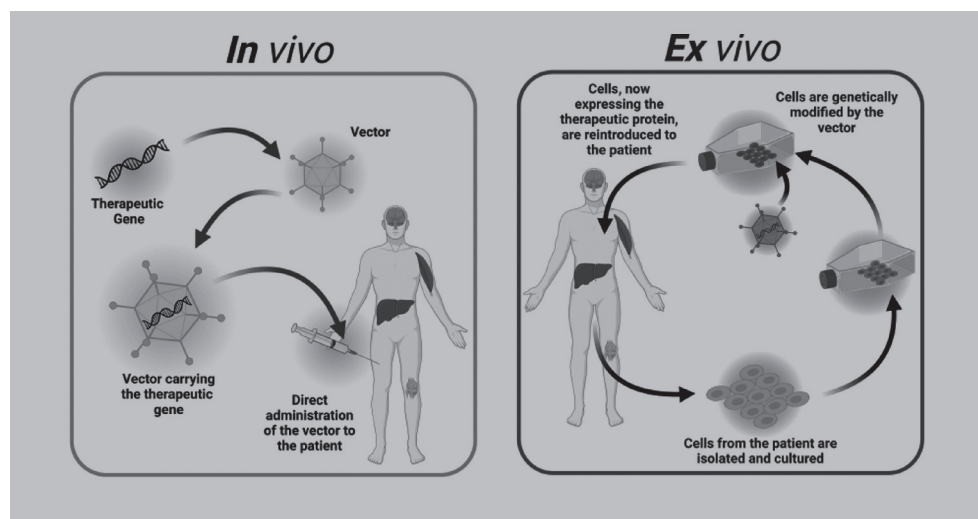
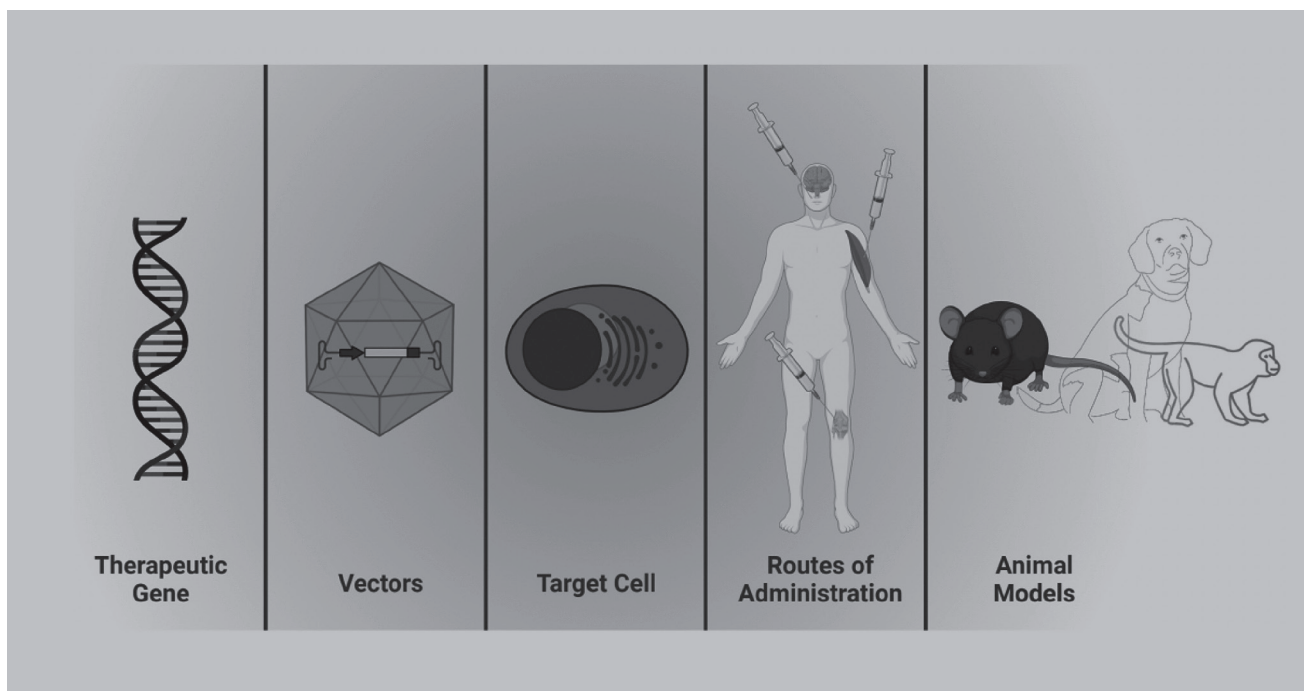


Figura 2. Aspectes clau que cal tenir en compte al dissenyar una estratègia de teràpia gènica in vivo. En primer lloc, s'ha d'escollir el gen terapèutic que es transferirà, que dependrà de la malaltia, i, a continuació, el vector que transportarà aquest gen d'interès a un teixit diana. Així mateix, serà molt important la via d'administració seleccionada (intravenosa, intramuscular, intralíquid cefalorraquidi, etc.) per arribar al teixit o cèl·lules diana d'una manera eficient. Finalment, és clau poder disposar d'un model animal de la malaltia en el qual assajar les noves estratègies de teràpia gènica.



emprats són ratolins manipulats genèticament perquè siguin deficitaris per al gen causant d'una malaltia genètica (ratolins *knock-out* o *knock-in*). En fases avançades dels estudis preclínic, abans d'arribar a la clínica amb pacients humans, s'assagen les estratègies terapèutiques en models animals grans, com, per exemple, primats no humans o gossos.

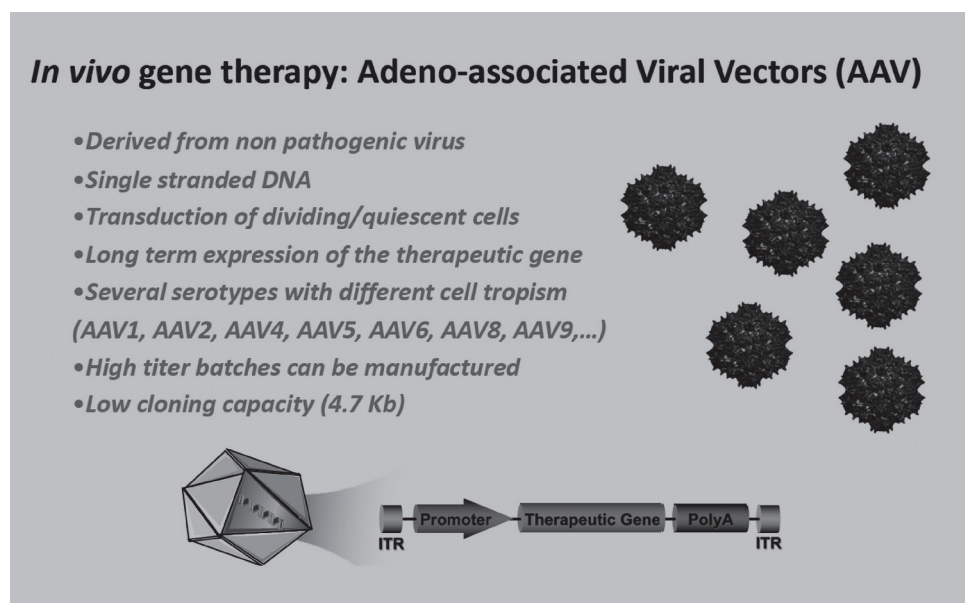
En els darrers anys, s'han desenvolupat un gran nombre de vectors per transportar el gen terapèutic. L'elecció d'un vector o un altre depèn de factors com el teixit

diana que es manipularà o el tipus de tractament –crònic o a curt termini– que pot requerir la malaltia. Segons l'origen dels vectors, es poden distingir dos grans grups: vectors virals i vectors no virals.

Els vectors virals deriven de virus. Els virus són altament eficients en la transferència del seu material genètic a les cèl·lules hoste. La teràpia gènica aprofita aquesta característica i els gens virals són substituïts pel gen terapèutic, de manera que el virus esdevé un vector viral. Entre els diferents vectors virals que s'han utilitzat per introduir gens d'interès a

les cèl·lules, els vectors virals adenoassociats (AAV) són els més emprats en les aproximacions de teràpia gènica *in vivo*¹). Aquests vectors AAV deriven de virus que no causen malalties ni en animals ni en humans i, per tant, es consideren vectors molt segurs. El genoma dels virus adenoassociats està format per DNA de cadena senzilla. Després d'entrar a la cèl·lula per endocitosi, la partícula viral allibera la molècula de DNA al nucli cel·lular, on es converteix en una molècula de DNA de cadena doble, que persisteix com a DNA episòmic en el nucli de les cèl·lules que no es divideixen. Aquests vectors AAV són capaços de produir alts nivells de proteïna terapèutica a la cèl·lula diana, i aquesta expressió es pot mantenir a molt llarg termini (anys) en teixits amb una taxa de divisió cel·lular baixa, com el fetge en adults, el múscul esquelètic o el cervell. S'han descrit diversos serotips d'AAV que mostren variacions en el seu tropisme per a diferents cèl·lules i teixits. La principal limitació d'aquests vectors és la seva mida petita, ja que només poden empaquetar un gen terapèutic de fins a 4,5 kb (Fig. 3). Els vectors AAV presenten també excel·lents perfils de seguretat en estudis clínics, pel fet de tenir una baixa toxicitat i immunogenicitat, que permet l'expressió a llarg termini del gen terapèutic¹.

Figura 3. Característiques principals dels vectors adenoassociats (AAV). A la part inferior es mostra de manera esquemàtica la composició bàsica del genoma d'un vector AAV, on el gen terapèutic està sota el control d'un promotor específic que es troba entre les dues seqüències ITR (inverted terminal repeats) del virus.



Teràpia gènica per al tractament de les malalties minoritàries

Les malalties rares suposen un important problema de salut pública, ja que la majoria d'elles són molt discapacitants, disminueixen l'esperança de vida i redueixen dràsticament la qualitat de vida dels pacients. Moltes causen la mort dels pacients a edats molt primerenques. A la Unió Europea hi ha més de trenta milions d'individus afectats per una de les més de sis mil malalties rares descrites fins ara. Actualment, hi ha un nombre molt limitat de medicaments orfes comercialitzats, i la gran majoria d'aquestes malalties no tenen cap tractament eficaç.

La major part de les malalties rares són hereditàries i, per tant, la transferència gènica de la seqüència codificadora correcta de la proteïna alterada als teixits afectats seria per si mateixa curativa. La teràpia gènica in vivo mitjançada per vectors AAV ofereix la possibilitat d'un tractament puntual, amb la possibilitat d'efectes beneficiosos per a tota la vida. Nombroses «proves de concepte» en models animals i en pacients humans demostren l'eficaç transferència de gens mitjançant vectors AAV a diversos òrgans com el cervell, el fetge, el múscul esquelètic, l'ull o el cor pel tractament de gran nombre de malalties.

Tot i els resultats prometedors que sorgeixen dels assajos clínics de productes de teràpia gènica, el repte continua sent enorme, ja que les malalties hereditàries rares es compten a milers i totes juntes representen un cost social i econòmic immens, així com una gran necessitat mèdica. Actualment, ja han obtingut l'aprovació per a ser comercialitzades, per part dels organismes reguladors d'Europa (Agència Europea del Medicament, EMA) o dels Estats Units (Food and Drug Administration, FDA), cinc aproximacions de teràpia gènica per a malalties hereditàries que es basen en vectors AAV.

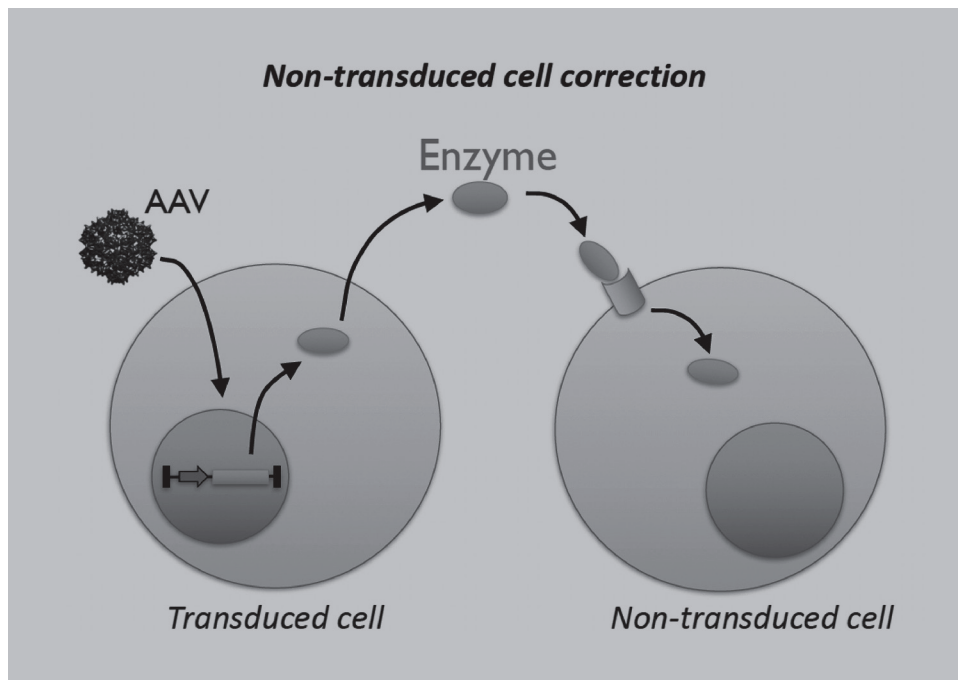
Malalties minoritàries d'emmagatzematge lisosòmic

Les malalties d'emmagatzematge lisosòmic (LSD, *lysosomal storage disorders*) són un grup d'aproximadament cinquanta malalties rares que tenen com a resultat alteracions de la funció dels lisosomes². Els lisosomes són orgànuls cel·lulars que presenten un lumen àcid (pH de 4,5-5,0) i que digereixen proteïnes, àcids nucleics, hidrats de carboni i alguns lípids, ja que contenen una gran quantitat d'hidrolases àcides. Aquestes alteracions dels lisosomes són causades per defectes genètics en gens que codifiquen per enzims lisosòmics, els seus cofactors o per proteïnes que participen en el

transport de proteïnes al lisosoma. Molècules parcialment digerides o substrats sencers s'acumulen progressivament a l'interior d'aquests orgànuls, provocant la seva distensió i un dany cel·lular progressiu que finalment dona lloc a la mort cel·lular³. La majoria dels pacients amb LSD neixen aparentment sans i els símptomes es presenten d'una manera progressiva. La velocitat i la severitat d'aparició dels símptomes depenen de factors com el substrat que s'acumula, el tipus cel·lular en què es produeix aquest dipòsit o la mutació genètica causant de la malaltia.

El tipus de substrat que s'acumula (mucopolisacàrids, esfingolípid, glicogen, colesterol, etc.) s'utilitza per a classificar els diferents tipus de LSD³. A més, algunes de les LSD es classifiquen en subtipus en funció sobretot del gen mutat encarregat de la degradació seqüencial d'un mateix substrat. Per a la majoria de malalties d'emmagatzematge lisosòmic no hi ha cura. La teràpia gènica in vivo és una eina atractiva per al tractament de les LSD causades per deficiències d'enzims lisosòmics que són secretables⁴. Això és així perquè, d'una banda, no és necessària la restauració completa de l'activitat enzimàtica normal d'una cèl·lula, ja que s'ha observat que la restauració d'un 10-20 % de l'activitat enzimàtica

Figura 4. Teràpia gènica in vivo per a LSD. Es basa en el principi de correcció encreuada per aconseguir corregir la manca d'activitat enzimàtica de totes les cèl·lules d'un òrgan afectat. Gràcies a la distribució pels fluids corporals (sang, líquid cefalorraquidi, etc.) dels enzims secretats per les cèl·lules manipulades genèticament (transduïdes pel vector AAV), es pot arribar a obtenir una correcció de tot l'organisme d'un pacient.



ja pot revertir les alteracions patològiques. A més, a diferència d'altres malalties minoritàries, en les LSD no es requereix la transducció de totes les cèl·lules de l'òrgan afectat. Aquestes estratègies de teràpia gènica es basen en la correcció encreuada: un enzim lisosòmic soluble present al compartiment extracel·lular produït i secretat per una cèl·lula que ha estat modificada genèticament per un AAV pot ser captat per endocitosis quan s'uneix als

receptors de mannanosa-6P presents a la membrana plasmàtica i permet la correcció d'altres cèl·lules que no han estat transduïdes (cèl·lules veïnes, altres cèl·lules de l'òrgan diana o, fins i tot, d'altres òrgans del cos, en el cas que l'enzim arribi als fluids principals, com el sèrum i el líquid cefalorraquidi [LCR])⁵ (Fig. 4).

En el nostre grup ens hem centrat sobretot en el desenvolupament de teràpies gèniques per al tractament per a quatre LSD neurodegeneratives

molt severes, les mucopolisacàridosis de tipus II (MPSII) (síndrome de Hunter), tipus III (MPSIIIA, IIIB, IIIC o IIID; síndrome de Sanfilippo A, B, C o D) i per a una LSD que afecta el sistema esquelètic, la de tipus IV (MPSIVA; malaltia de Morquio A). Aquestes malalties resulten de deficiències enzimàtiques que causen l'acumulació intracel·lular de glicosaminoglicans (GAG) parcialment degradats.

Aquest projecte es va iniciar gràcies a la interacció amb l'Associació Espanyola de famílies afectades de MPS (MPS España; <https://www.mpssp.org/>). La nostra relació amb les famílies ens ha inspirat i motivat a treballar molt activament per tal de trobar una solució per a aquestes malalties tan greus.

Teràpia gènica per a les mucopolisacàridosis

La MPSIII és el tipus més freqüent de MPS, sobretot a Europa, amb una herència autosòmica recessiva⁶. La síndrome de Sanfilippo es classifica en quatre subtipus segons l'enzim deficient implicat en la degradació del GAG heparan sulfat (HS): la deficiència en N-sulfoglucosamina-sulfohidrolasa o sulfamidasa (SGSH) provoca el tipus IIIA; en α -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU), el tipus IIIB; en acetil-CoA α -glucosaminidasa-acetiltransferasa (HGSNAT), el tipus IIIC, i en N-acetilglucosamina-6-sulfatasa

(GNS), el tipus IIID. Els quatre subtipus comparteixen mecanismes fisiopatològics comuns, així com signes clínics i un pronòstic similars. La MPSIII es caracteritza per ser una malaltia neurodegenerativa greu i progressiva però amb una afectació somàtica lleu. La malaltia progressa amb l'edat i provoca la mort dels pacients, durant la seva segona dècada de vida^{6,7}.

La MPSII és una LSD recessiva lligada al cromosoma X que afecta només els nens, causada per la deficiència d'iduronat-2-sulfatasa⁸. Aquest enzim lisosòmic és essencial per a la degradació conjunta dels GAG HS i dermatan sulfat. Es tracta també d'un altre tipus molt comú de MPS, i és la més freqüent a l'Àsia^{9,10}.

La MPSII és un trastorn variable, progressiu i multisistèmic, amb un deteriorament neurològic sever que també implica l'obstrucció de les vies respiratòries, deformitats esquelètiques i cardiomiopatia.

El sistema nerviós central (SNC), l'òrgan més afectat en les MPSII i MPSIII, està aïllat anatòmicament de la resta del cos per la barrera hematoencefàlica. Aquest fet fa que aconseguir un grau suficient de correcció gènica d'aquest òrgan sigui més complicat.

En el nostre grup hem desenvolupat per a aquests trastorns neurodegeneratius aproximacions de teràpia gènica que es basen en

l'administració local al cervell de vectors AAV mitjançant la injecció directa al líquid cefalorraquidi (intra-LCR) que banya tot el SNC (Fig. 5). Així, vam demostrar que l'administració de vectors AAV9 directament al LCR a través de la cisterna magna, un gran espai subaracnoidal ple de LCR, facilita la distribució dels vectors a tot el SNC. D'aquesta manera, amb una dosi de vectors AAV molt baixa, s'aconsegueix la transducció generalitzada del SNC, des de les parts més rostrals a les més caudals de l'encèfal i per tota la medul·la espinal. A més, els vectors penetren des de la superfície fins a zones més profundes del SNC. Posteriorment, les cèl·lules transduïdes secreten

també les proteïnes al LCR, augmentant l'eficàcia gràcies a la distribució de la proteïna terapèutica per tot el SNC.

També vam observar que després de l'administració intra-LCR una part del vector AAV9 passa del LCR a la circulació sanguínia i transdueix molt eficientment el fetge que expressa llavors el gen terapèutic i secreta la proteïna terapèutica que pot ser captada de la sang i corregeix així la resta d'òrgans somàtics (el cor, els pulmons, els ronyons, etc.) gràcies al principi de correcció encreuada.

El nostre grup va ser el primer a demostrar, mitjançant aquesta estratègia de teràpia gènica, la correcció completa de la MPSIII en

Figura 5. Administració dels vectors AAV directament al líquid cefalorraquidi (intra-LCR). El LCR banya el SNC i s'hi pot accedir a través de la cisterna magna o del ventricle lateral. L'administració dels vectors AAV al LCR permet transduir eficientment tot el SNC.

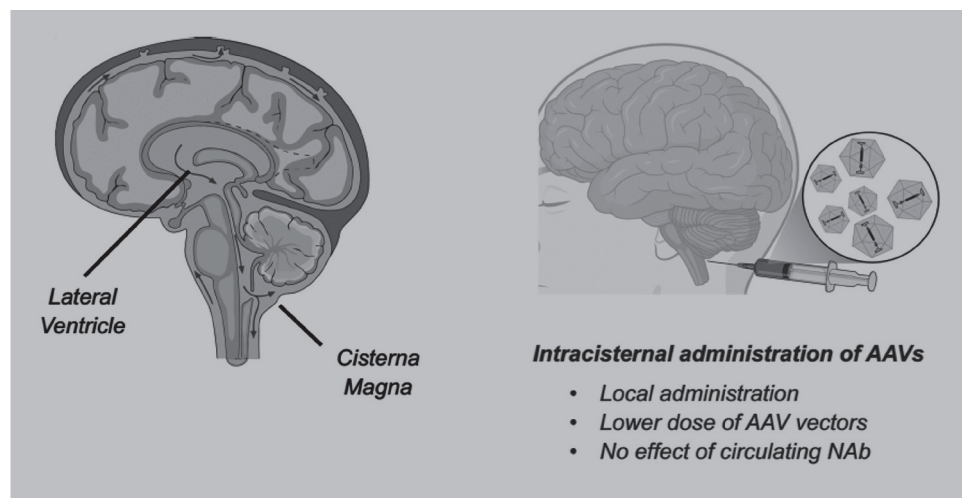
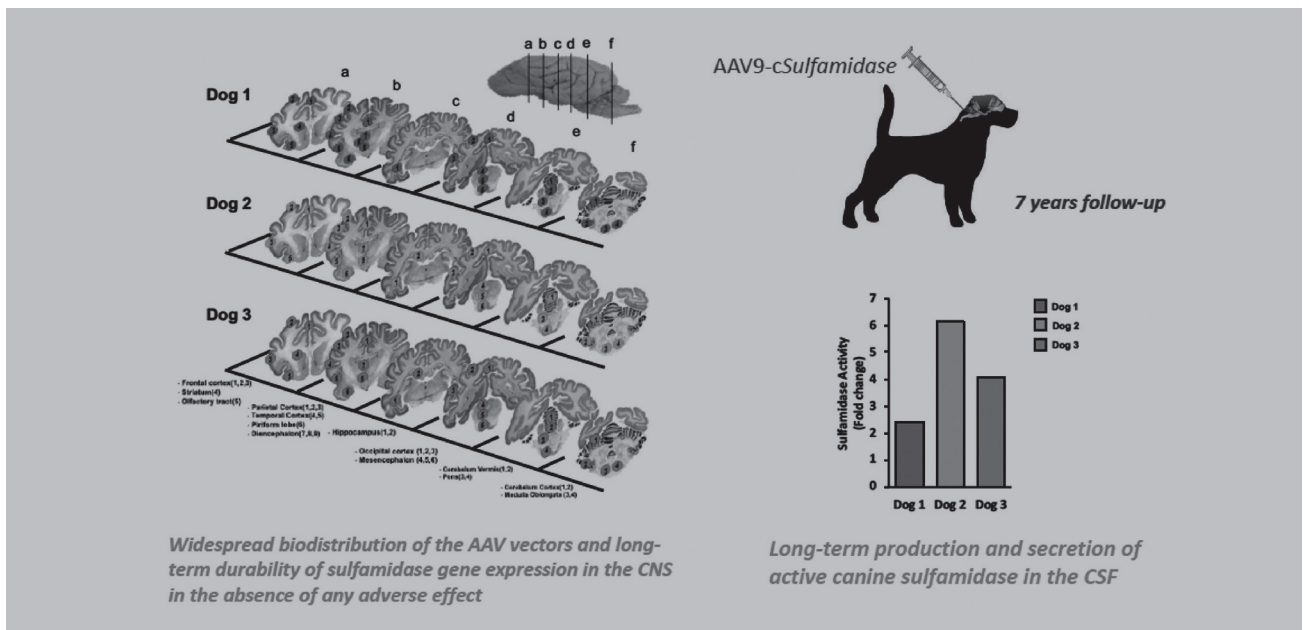


Figura 6. Expressió i activitat sulfamidasa a llarg termini al SNC després de la transferència gènica mitjançada per vectors AAV9 al LCR de gossos. Tots els animals tractats van mostrar uns nivells d'activitat de sulfamidasa molt augmentats al LCR més de set anys després d'una administració del vector AAV. A més, presentaven nivells molt elevats de genomes virals i d'expressió del gen de la sulfamidasa, com també d'activitat de l'enzim en biòpsies obtingudes de tot el cervell i de la medul·la espinal set anys després del tractament.



un model animal de la malaltia amb afectació neurològica greu. L'administració intra-CSF de vectors AAV9 que codificaven per al gen de la sulfamidasa aconseguia nivells d'activitat més elevats de la proteïna terapèutica que el que s'assolia en estudis previs en els quals utilitzàvem l'administració sistèmica del vector¹¹⁻¹³. En aquests ratolins MPSIIIA tractats intra-LCR amb l'AAV9-sulfamidasa es va observar l'eliminació dels GAG acumulats, la resolució de la patologia lisosòmica i de la neuroinflamació al

cervell i la correcció dels dèficits conductuals¹¹. També es va obtenir un increment de l'activitat enzimàtica al sèrum, amb el fetge com la font de l'enzim circulant, que va permetre revertir la patologia lisosòmica a tots els òrgans perifèrics¹¹. En conjunt, el tractament amb AAV9-sulfamidasa va resultar en la prolongació de la supervivència dels animals tractats. Així, el nostre estudi va ser el primer a demostrar la correcció a nivell de tot l'organisme d'una malaltia d'emmagatzematge lisosòmic després del tractament amb una

teràpia gènica. També vam demostrar que aquesta aproximació era eficaç per al tractament d'altres MPS, tant la MPSIIIB com la MPSIIID, així com la MPSII¹⁴⁻¹⁶.

Una vegada demostrats els resultats positius en ratolins model de MPS, també hem demostrat que l'administració intra-LCR de vectors AAV9-sulfamidasa és factible i segura en models animals grans, com els gossos Beagle, en els quals hem observat la producció i secreció de la proteïna terapèutica durant molts anys (>7 anys) després d'una sola

administració de vector a través de la cisterna magna. Aquestes observacions constitueixen el seguiment a més llarg termini d'un model animal gran després de l'administració dels vectors AAV al LCR.

Els gossos injectats van tolerar molt bé el tractament i no van desenvolupar cap signe clínic que suggerís efectes nocius associats a la presència del vector o a l'expressió contínua del transgèn al cervell o a la medul·la espinal al llarg de tots aquests anys. El més important és que tots els animals tractats van mostrar uns nivells d'activitat sulfamidasa molt augmentats al LCR més de set anys després d'una sola administració del vector AAV. A més, vam detectar uns nivells molt elevats de genomes virals i d'expressió del gen de la sulfamidasa, com també d'activitat de l'enzim, en biòpsies obtingudes de tot el cervell i de la medul·la espinal (Fig. 6). Tots aquests resultats indiquen també l'excel·lent perfil de seguretat a llarg termini d'aquesta teràpia en animals grans.

Amb aquestes aproximacions per les MPS hem pogut demostrar que l'administració del vector terapèutic podia provocar un augment de l'activitat enzimàtica a tot l'encèfal, el fetge i el sèrum, que al seu torn va resultar en: 1) la correcció dels GAG acumulats al SNC i als teixits i els òrgans perifèrics, 2) la resolució de la patologia lisosòmica i la

neuroinflamació al SNC, 3) la correcció dels dèficits de comportament, i 4) la prolongació de la supervivència a llarg termini. Aquests estudis han permès l'establiment d'una Plataforma per al tractament de malalties minoritàries que presenten neurodegeneració, centrada en l'administració al LCR de vectors AAV9 que codifiquen per als enzims deficients^{11,14-19} (Fig. 7).

Els estudis dels tractaments de MPSII i MPSIII (A, B i D) per teràpia gènica mitjançada per vectors AAV9 en models animals petits i grans de les malalties han proporcionat proves que donen suport a l'eficàcia i la seguretat d'aquestes estratègies en la seva translació cap a la clínica, i s'espera que seran predictius de la possible eficàcia en pacients humans.

Per tal de poder portar aquestes teràpies cap a la clínica, el nostre grup a la UAB va establir el 2010 un partenariat públic-privat amb la companyia farmacèutica Esteve Pharmaceuticals. Aquesta col·laboració ha estat clau i ha permès avançar aquestes aproximacions terapèutiques gràcies a la combinació de l'expertesa en recerca bàsica preclínica del nostre grup juntament amb l'expertesa d'Esteve en l'àmbit regulador (interacció amb les agències del medicament), toxicològic i de disseny d'assaigs clínics. Actualment, ja s'han obtingut tres denominacions

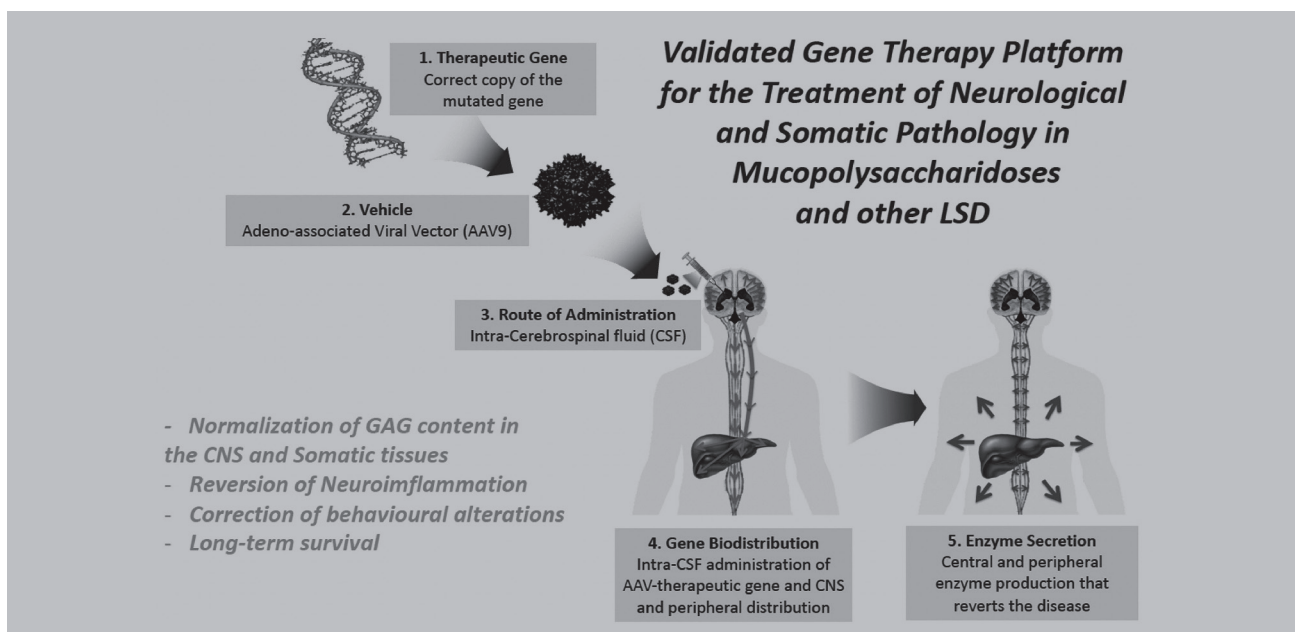
de medicaments orfes per part de l'EMA i de la FDA per als productes de teràpia gènica desenvolupats al nostre laboratori per al tractament de la MPSII, de la MPSIII A i de la MPSIII B. Recentment, Esteve ha iniciat un assaig clínic de fase I/II per al tractament de pacients amb MPSIII A (2015-000359-26, www.ClinicalTrialsregister.eu).

Els resultats de tots aquests estudis de teràpia gènica, mitjançada per vectors AAV administrats al LCR, seran també molt útils i de gran interès per al desenvolupament de nous tractaments d'altres malalties neurodegeneratives, no només minoritàries sinó també de trastorns del SNC d'alta prevalença fins ara no tractables.

Teràpia gènica per a malalties d'alta prevalença: la diabetis mellitus de tipus 1

La diabetis mellitus (DM) és la principal malaltia metabòlica que afecta la població a escala mundial. Actualment, s'ha convertit en un important problema de salut pública tant en països desenvolupats com en via de desenvolupament. La seva prevalença creix a un ritme alarmant i ara ja afecta >530 milions de persones a escala global i s'espera que arribi a >780 milions l'any 2045 (2021 International Diabetes Federation (IDF); <https://www.idf.org/>).

Figura 7. Esquema representatiu de la plataforma de teràpia gènica mitjançada per vectors AAV administrats intra-LCR per al tractament de les MPS i altres malalties lisosòmiques. L'administració de vectors AAV9 al LCR, a través del ventricle lateral o de la cisterna magna, porta a una distribució generalitzada i uniforme de vectors AAV a tot el cervell i la medul·la espinal, ja que el LCR banya tot el SNC. A més, part del vector AAV9 arriba a la circulació, cosa que condueix a la transducció del fetge. Com a resultat d'aquesta distribució dels vectors AAV, l'activitat enzimàtica augmenta a tot el SNC, al LCR i al sèrum, en què el fetge és la font més important d'enzim circulant. També, hem demostrat en estudis en models animals seropositius que l'eficàcia terapèutica al SNC, després de l'administració dels vectors al LCR, no es veuria compromesa per la presència d'anticossos neutralitzadors anti-AAV9 al sèrum, ja que aquests no poden creuar la barrera hematoencefàlica.



Les dues formes principals de diabetis mellitus són la diabetis de tipus 1 (DT1) i la diabetis de tipus 2 (DT2). La DT1 i la DT2 són una de les principals causes de morbiditat i mortalitat arreu del món. Principalment a causa d'un mal control glucèmic, ambdues diabetis s'associen a complicacions secundàries molt severes responsables d'una pobra qualitat i esperança de vida dels pacients.

Actualment no hi ha cura per a la diabetis.

La DT1 només representa un 5-10% de la població diabètica i és el resultat de la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules beta del pàncrees productores d'insulina. Els pacients desenvolupen hiperglucèmia i necessiten una teràpia substitutòria amb insulina per a sobreviure. No obstant això, aquesta teràpia és imperfecta, ja que

la glucèmia no sempre es regula adequadament i la hiperglucèmia crònica porta al desenvolupament de les greus complicacions microvasculars (retinopatia i nefropatia), macrovasculars (ictus i infart de miocardi) i neurològiques d'aquesta malaltia. La normalització dels nivells de glucosa en sang és fonamental per prevenir aquestes complicacions devastadores. La teràpia intensiva amb insulina pot

retardar l'inici i la progressió de les complicacions secundàries, però els pacients que reben aquesta teràpia presenten un risc elevat de desenvolupar episodis d'hipoglucèmia. Per això, cal desenvolupar noves aproximacions terapèutiques que permetin obtenir un millor control de la glucèmia.

Nosaltres des de fa anys estem treballant perquè considerem que la teràpia gènica podria proporcionar millors beneficis clínics a llarg termini. En especial, hem dissenyat i assajat noves estratègies per tractar aquesta malaltia mitjançant la manipulació genètica *in vivo* de diferents teixits utilitzant vectors AAV. No obstant, s'ha de tenir en compte que tant la DT1 com la DT2 són malalties poligèniques amb un fort component ambiental com a causa del seu desenvolupament. Aquest fet fa que el disseny de noves aproximacions de teràpia gènica sigui molt més complex.

En el cas de les malalties monogèniques, com a gen terapèutic a transferir s'utilitzava una còpia correcta del gen mutat. En el cas de la DM, no és clar quin pot ser un possible gen terapèutic a transferir i, per tant, es requereixen molts estudis sobre la fisiopatologia de la malaltia per tal d'identificar el possible gen o gens terapèutics candidats. També s'ha d'estudiar i seleccionar quin és el teixit diana sobre el qual s'hauria d'actuar per

contrarestar les alteracions metabòliques. A més, en el cas d'aquestes malalties tampoc no existeix un model animal que reproduïxi perfectament la patologia humana. Hi ha diversos models animals de DT1 acceptats en el camp. Per exemple, animals tractats amb estreptozotocina (destrueix cèl·lules beta pancreàtiques) o ratolins NOD (*non-obese diabetic*) com a models de DT1. Aleshores, per tal de demostrar que una teràpia gènica pot ser efectiva per contrarestar aquesta malaltia caldrà assajar-la en diversos models, cosa que complica molt els experiments a realitzar a fi de validar una nova aproximació terapèutica.

A continuació, es presenta una teràpia gènica que hem desenvolupat per a la DT1 que ja s'està avançant per portar-les cap a la clínica per tractar pacients humans.

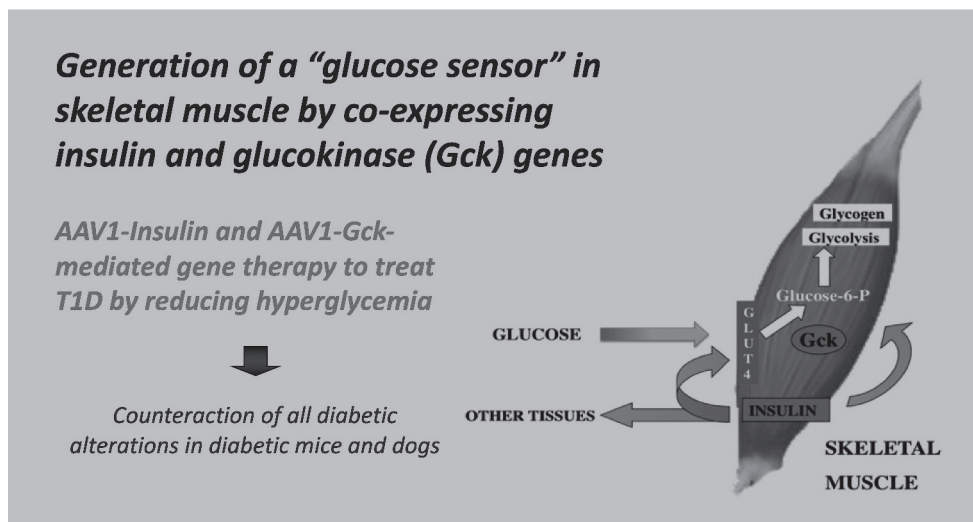
Teràpia gènica per a la diabetis de tipus 1 centrada en la generació d'un «sensor a la glucosa» en el múscul esquelètic, mitjançant la coexpressió dels gens de la insulina i la glucoquinasa

La regulació precisa de l'homeòstasi de la glucosa és un repte important en el control de la DT1. Per això, la manipulació genètica del múscul esquelètic per a combatre la hiperglucèmia és una estratègia atractiva per corregir la DT1. El múscul esquelètic és responsable

de l'eliminació del 70% de la glucosa que circula després d'un àpat. En els músculs, la utilització de la glucosa es controla mitjançant el transport de glucosa estimulat per la insulina, a través del transportador de glucosa tipus 4 (GLUT4)²⁰, i la fosforilació per l'hexoquinasa II (HKII), que té una Km baixa per a la glucosa i és inhibida pel seu producte, la glucosa-6-fosfat, i limita així la captació de glucosa²¹. En el múscul diabètic, a causa de la manca d'insulina, la translocació GLUT4 a la membrana plasmàtica i l'activitat HKII es troben disminuïdes. A diferència de l'HKII, l'enzim hepàtic glucoquinasa (Gck) té una elevada Km per a la glucosa, no és inhibida per la glucosa-6-fosfat i mostra cooperativitat cinètica amb la glucosa²². Quan vam expressar la Gck al múscul esquelètic de ratolins transgènics, vam observar que aquest enzim facilita la captació de glucosa només quan la glucosa en sang és elevada²³. No obstant això, durant la diabetis, es requereixen també nivells basals constants d'insulina per garantir la presència de GLUT4 a la membrana cel·lular i així permetre l'entrada de la glucosa.

Aquestes observacions ens van portar a la hipòtesi que la regulació de la glucèmia es podria aconseguir mitjançant la coexpressió al múscul esquelètic de la Gck, que incrementaria la fosforilació i el metabolisme de la glucosa, i de nivells baixos d'insulina (Ins), que

Figura 8. Esquema representatiu de la teràpia gènica per a la DT1 centrada en la captació de glucosa pel múscul esquelètic. Expressió conjunta del gen de la insulina i el de la glucoquinasa al múscul esquelètic mitjançada per vectors AAV. Durant la diabetis, en presència d'hiperglucèmia, el múscul produiria nivells basals d'insulina, que incrementarien el transport de glucosa cap a l'interior de les fibres. Un cop dins, l'enzim Gck incrementaria la fosforilació i el metabolisme de la glucosa gràcies a la seva elevada Km. Treballant en concert, tots dos gens permetrien restablir la normoglucèmia.



permetria la presència de GLUT4 a la membrana de les fibres musculars. En aquest sistema, la captació de glucosa es regula mitjançant els nivells de glucosa en la circulació sanguínia, de manera que permet la captació de glucosa només quan hi ha hiperglucèmia. D'acord amb això, vam demostrar que l'administració intramuscular conjunta de vectors AAV de serotip 1 (AAV1) que expressen Ins i Gck a ratolins

diabètics tenia com a resultat la correcció de totes les alteracions de la malaltia²⁴. Per tant, això demostrava que es podia generar un «sensor de la glucosa» al múscul esquelètic, mitjançant l'acció de la producció basal d'insulina conjuntament amb l'activitat Gck, que augmentava la captació de glucosa i portava a la correcció de la hiperglucèmia en ratolins diabètics (Fig. 8). A continuació, vam demostrar

l'eficàcia a llarg termini d'aquesta aproximació en un model animal gran de diabetis, gossos Beagle als quals havíem induït diabetis experimental com un pas necessari abans de poder aplicar-ho en pacients humans.

Una única administració intramuscular en gossos diabètics de vectors AAV del serotip 1 (AAV1) que codificaven per a Gck i Ins va resultar en la normalització de la glucèmia en dejú i l'eliminació ràpida de la glucosa després d'una sobrecàrrega oral del sucre (test de tolerància oral a la glucosa). A més, en els animals tractats amb la teràpia gènica no es van observar episodis d'hipoglucèmia durant l'exercici. Això es va associar amb la recuperació del pes corporal, la reducció dels nivells de proteïnes plasmàtiques glicosilades i la supervivència a llarg termini sense desenvolupar complicacions secundàries. Per contra, la transferència només del gen de la Ins o el de la Gck per separat no va aconseguir la correcció completa de la diabetis, cosa que indica que l'acció sinèrgica dels dos gens, Ins i Gck, és necessària per a obtenir un efecte terapèutic complet²⁵.

En realitzar un seguiment a llarg termini (aproximadament 8 anys) després d'una única administració de vectors terapèutics a gossos


diabètics, es va aconseguir un control de glucèmia al llarg dels anys sense la necessitat de suplementar-ho amb injeccions d'insulina exògena. La correcció metabòlica també es va demostrar mitjançant la normalització dels nivells sèrics de fructosamina, triglicèrids i colesterol. A més, es va observar, 8 anys després de l'administració dels vectors, la persistència de genomes virals i l'expressió dels transgens terapèutics en múltiples mostres obtingudes dels músculs tractats, el quals també mostraven una morfologia completament normal^{25,26}. Per tant, aquest estudi demostra l'eficàcia i la seguretat a llarg termini de la transferència dels gens de la insulina i la glucoquinasa en gossos diabètics i, especialment, la capacitat del sistema per a respondre als canvis en les necessitats metabòliques a mesura que els animals envelleixen (Fig. 9).

Aquest estudi proporciona la primera prova de concepte d'una aproximació de transferència de gens segura i eficaç a llarg termini per a tractar la DT1, i posa les bases per a la translació clínica d'aquesta aproximació a pacients humans en un futur. En aquest sentit, recentment, el 2020, la UAB ha llicenciat aquest projecte a una nova empresa de teràpia gènica dels

Figura 9. Tractament amb la teràpia gènica de la DT1 centrat en la manipulació genètica del múscul esquelètic perquè expressi el gen de la insulina i el de la glucoquinasa. Els resultats dels nostres estudis demostren que, després d'una única injecció intramuscular dels vectors, els transgens *Ins* i *Gck* actuen sinèrgicament per aconseguir un control estret de la glucèmia i prevenir les alteracions metabòliques característiques de la DT1.

AAV1-Ins+Gck gene therapy for Type 1 Diabetes

- Safe
- Long-term survival
- Recovery body weight
- Normal physical performance
- Normal serum parameters
- Normalization fasting glycemia
- Normal glucose tolerance
- No secondary complications



The system responds to the changes in metabolic needs as animals grow older

Estats Units, Kriya Therapeutics (<https://kriyatherapeutics.com/>), que ja ha iniciat tots els passos per portar a la clínica aquesta aproximació en un futur proper.

En resum, en aquesta presentació hem mostrat, amb uns pocs exemples, que actualment, si bé s'han desenvolupat nombroses teràpies gèniques pel tractament de malalties monogèniques minoritàries, a mesura que aquest camp arriba finalment a l'edat

madura, els coneixements adquirits en aquests primers tractaments representen un enorme potencial per millorar/revertir malalties complexes, no hereditàries i d'alta prevalença que afecten grans poblacions de pacients, com ara la diabetis mellitus. Les expectatives d'aquests desenvolupaments són enormes i representaran un nou paradigma en el tractament de moltes malalties humanes en un futur proper.

Referències

1. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18:358-78.
2. Leal AF, Espejo-Mojica AJ, Sánchez OF, Ramírez CM, Reyes LH, Cruz JC, et al. Lysosomal storage diseases: current therapies and future alternatives. *J Mol Med.* 2020;98:931-46.
3. Platt FM. Emptying the stores: lysosomal diseases and therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17:133-50.
4. Parenti G, Andria G, Ballabio A. Lysosomal storage diseases: from pathophysiology to therapy. *Annu Rev Med.* 2015;66:471-86.
5. Nagree MS, Scalia S, Mckillop WM, Medin JA. An update on gene therapy for lysosomal storage disorders. *Expert Opin Biol Ther.* 2019;19:655-70.
6. Valstar MJ, Ruijter GJ, Van Diggelen OP, Poorthuis BJ, Wijburg FA. Sanfilippo syndrome: a mini-review. *J Inherit Metab Dis.* 2008;31:240-52.
7. Fedele A. Sanfilippo syndrome: causes, consequences, and treatments. *Appl Clin Genet.* 2015;8:269.
8. Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer OA, De Meirleir L, Guffon N, et al. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur J Pediatr.* 2008;167:267-77.
9. Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, et al. Japan Elaprase® Treatment (JET) study: idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis II, MPS II). *Mol Genet Metab.* 2010;99:18-25.
10. Yamada Y, Tomatsu S, Sukegawa K, Suzuki Y, Kondo N, Hopwood JJ, et al. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter disease): 13 gene mutations in 52 Japanese patients and carrier detection in four families. *Hum Genet.* 1993;92:110-4.
11. Haurigot V, Marcó S, Ribera A, García M, Ruzo A, Villacampa P, et al. Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *J Clin Invest.* 2013;123:3254-71.
12. Ruzo A, García M, Ribera A, Villacampa P, Haurigot V, Marcó S, et al. Liver production of sulfamidase reverses peripheral and ameliorates CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Mol Ther.* 2012;20:254-66.

13. Ruzo A, Marcó S, García M, Villacampa P, Ribera A, Ayuso E, et al. Correction of pathological accumulation of glycosaminoglycans in central nervous system and peripheral tissues of MPSIIIA mice through systemic AAV9 gene transfer. *Hum Gene Ther.* 2012;23:1237-46.
14. Ribera A, Haurigot V, García M, Marcó S, Motas S, Villacampa P, et al. Biochemical, histological and functional correction of mucopolysaccharidosis Type IIIB by intra-cerebrospinal fluid gene therapy. *Hum Mol Genet.* 2015;24:2078-95.
15. Motas S, Haurigot V, García M, Marcó S, Ribera A, Roca C, et al. CNS-directed gene therapy for the treatment of neurologic and somatic mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *JCI Insight.* 2016;1:e86696.
16. Roca C, Motas S, Marcó S, Ribera A, Sánchez V, Sánchez X, et al. Disease correction by AAV-mediated gene therapy in a new mouse model of mucopolysaccharidosis type IIID. *Hum Mol Genet.* 2017;26:1535-51.
17. Haurigot V, Bosch F. Toward a gene therapy for neurological and somatic MPSIIIA. *Rare Dis.* 2013;1:e27209.
18. Marcó S, Haurigot V, Bosch F. In vivo gene therapy for mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome): a new treatment horizon. *Hum Gene Ther.* 2019;30:1211-21.
19. Marcó S, Haurigot V, Jaén ML, Ribera A, Sánchez V, Molas M, et al. Seven-year follow-up of durability and safety of AAV CNS gene therapy for a lysosomal storage disorder in a large animal. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2021;23:370-89.
20. Kahn BB. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes.* 1996;45:1644-54.
21. Printz RL, Koch S, Potter LR, O'Doherty RM, Tiesinga JJ, Moritz S, et al. Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution. *J Biol Chem.* 1993;268:5209-19.
22. Printz RL, Magnuson MA, Granner DK. Mammalian glucokinase. *Annu Rev Nutr.* 1993;13:463-96.
23. Otaegui PJ, Ferre T, Pujol A, Riu E, Jiménez R, Bosch F. Expression of glucokinase in skeletal muscle: a new approach to counteract diabetic hyperglycemia. *Hum Gene Ther.* 2000;11:1543-52.
24. Mas A, Montané J, Anguela XM, Muñoz S, Douar AM, Riu E, et al. Reversal of type 1 diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle. *Diabetes.* 2006;55:1546-53.
25. Callejas D, Mann CJ, Ayuso E, Lage R, Grifoll I, Roca C, et al. Treatment of diabetes and long-term survival after insulin and glucokinase gene therapy. *Diabetes.* 2013;62:1718-29.
26. Jaén ML, Vilà L, Elias I, Jiménez V, Rodó J, Maggioni L, et al. Long-term efficacy and safety of insulin and glucokinase gene therapy for diabetes: 8-year follow-up in dogs. *Mol Ther. Methods Clin Dev.* 2017;6:1-7.