

# TERAPIA GÉNICA PARA LAS HEMOFILIAS

**Tercera edición**

**David Lillicrap**

Queens University  
Ontario, Canadá

**Arthur R. Thompson**

University of Washington and the Puget Sound Blood Center  
Washington, Estados Unidos

Publicado por la Federación Mundial de Hemofilia (FMH), 1999; revisado 2004, 2008.

© World Federation of Hemophilia, 2008

La FMH alienta la redistribución de sus publicaciones por organizaciones de hemofilia sin fines de lucro con propósitos educativos. Para obtener la autorización de reimprimir, redistribuir o traducir esta publicación, por favor comuníquese con el Departamento de Comunicación a la dirección indicada abajo.

Esta publicación se encuentra disponible en la página Internet de la Federación Mundial de Hemofilia, **www.wfh.org**. También pueden solicitarse copias adicionales a:

Federación Mundial de Hemofilia  
1425 René Lévesque Boulevard West, Suite 1010  
Montréal, Québec H3G 1T7  
CANADA  
Tel.: (514) 875-7944  
Fax: (514) 875-8916  
Correo electrónico: [wfh@wfh.org](mailto:wfh@wfh.org)  
Página Internet: [www.wfh.org](http://www.wfh.org)

El objetivo de la serie *Tratamiento de la hemofilia* es proporcionar información general sobre el tratamiento y manejo de la hemofilia. La Federación Mundial de Hemofilia no se involucra en el ejercicio de la medicina y bajo ninguna circunstancia recomienda un tratamiento en particular para individuos específicos. Las dosis recomendadas y otros regímenes de tratamiento son revisados continuamente, conforme se reconocen nuevos efectos secundarios. La FMH no reconoce, de modo explícito o implícito alguno, que las dosis de medicamentos u otras recomendaciones de tratamiento en esta publicación sean las adecuadas. Debido a lo anterior, se recomienda enfáticamente al lector buscar la asesoría de un consejero médico y/o consultar las instrucciones impresas que proporciona la compañía farmacéutica, antes de administrar cualquiera de los medicamentos a los que se hace referencia en esta monografía.

Las afirmaciones y opiniones aquí expresadas no necesariamente representan las opiniones, políticas o recomendaciones de la Federación Mundial de Hemofilia, de su Comité Ejecutivo o de su personal.

Serie monográfica Tratamiento de la hemofilia  
Editor de la serie:  
Dr. Sam Schulman

## Índice

Resumen.....	1
Introducción .....	1
Vectores para transferencia de genes.....	2
Vectores retrovirales .....	2
Cuadro 1: Vectores virales usados para la transferencia preclínica de genes de factores VIII ó IX .....	2
Vectores adenovirales .....	3
Vectores virales adenoasociados (VVA).....	4
Vectores no virales.....	4
Tipos alternos de células.....	4
Reparación de genes.....	5
Pruebas de transferencia de genes para la hemofilia en humanos .....	5
Hemofilia A .....	5
Cuadro 2: Pruebas clínicas de transferencia de genes para hemofilia A y B.....	6
Hemofilia B.....	7
Consideraciones para la seguridad humana con los vectores virales .....	8
Vectores retrovirales .....	8
Vectores adenovirales .....	8
Vectores virales adenoasociados .....	9
Participación de los pacientes .....	9
Conclusión.....	10
Referencias citadas.....	11
Referencias generales .....	13



---

---

# Terapia génica para las hemofilias

David Lillicrap, Arthur R. Thompson

---

---

## Resumen

Las pruebas clínicas de transferencia de genes en las hemofilias han evolucionado luego de una década de estudios en células cultivadas y posteriormente en modelos animales. El éxito limitado de los experimentos iniciales en humanos apunta hacia la necesidad de mejoras o alternativas a los sistemas de transferencia mediante vectores virales usados en sujetos con hemofilia A ó B. Varios laboratorios han modificado vectores a fin de mejorar la expresión de estos factores de coagulación, al tiempo que se realizan considerables esfuerzos para mejorar la seguridad. Si bien hay una serie de técnicas prometedoras, todavía no ha surgido una estrategia claramente mejorada.

La incorporación del intrón y otros elementos al transgen del factor VIII ó IX mejora la expresión de la cantidad de factor en cada célula. Los promotores de tejidos específicos limitan la expresión en otros tejidos, incluyendo células inmunes, a fin de reducir el riesgo de desarrollo de inhibidores. Los vectores retrovirales, introducidos originalmente para la transferencia de genes, tienen más éxito en ratones neonatos; los vectores lentivirales relacionados transducirán células que no están en división, aunque la seguridad a largo plazo de ambos sigue siendo motivo de preocupación. Los vectores adenovirales a los que se han retirado sus genes virales tienen menos complicaciones, pero todavía es necesario desarrollar una envoltura de inserción más segura. Serotipos diferentes y vectores virales adenoasociados incrementan la expresión y permiten la inclusión de genes de factor VIII que son más grandes. Es necesario desarrollar sistemas de inserción eficaces para vectores no virales *in vivo*; no obstante, un modelo de roedor demuestra que la expresión a largo plazo de niveles terapéuticos de factor VIII ó IX puede lograrse sin un vector viral. Si bien la principal célula diana para la transferencia de genes sigue siendo la hepática, hay avances con la expresión en otros tejidos diversos. Para mejorar el perfil de seguridad, están surgiendo estrategias de inducción de

tolerancia o de prevención de respuestas inmunes a los factores VIII y IX expresados y los avances en la comprensión de la respuesta inmune, particularmente al factor VIII, se están ocupando de esta potencialmente grave complicación. Por último, los esfuerzos en la reparación de genes presentan avances iniciales, particularmente con una técnica de "corte y empalme" (*trans-splicing*) que corrige el ARN mensajero mutante del propio anfitrión, permitiendo la síntesis de una proteína normal, aun en ausencia de la secuencia génica normal.

## Introducción

Para un paciente con hemofilia, la terapia génica permitiría la síntesis continua de una proteína normal para corregir la deficiencia *in vivo*. En cierto sentido, la síntesis de la proteína resultante sería comparable a una "cura", como se ha observado en los casos raros de un paciente con hemofilia que ha recibido un trasplante de hígado. Una diferencia con el trasplante de órganos es que en la terapia génica las propias células son transducidas (proceso por el cual se agrega un gen funcional a una célula). Por ende, la inmunosupresión, la cual es necesaria para evitar el rechazo del órgano trasplantado y su correspondiente toxicidad, no es necesaria. Los estudios iniciales generaron considerable optimismo en cuanto a que la hemofilia podía curarse [1]. Los elementos básicos para la transferencia de genes, incluyendo diferentes vectores, sistemas de inserción y células dianas usadas con los factores VIII ó IX ya han sido estudiados [2, 3, 4].

Debe distinguirse entre terapia génica para modificar las células somáticas de un anfitrión y otras técnicas altamente experimentales que dan por resultado animales transgénicos. Dichos animales (por ejemplo, "Dolly") son capaces de transmitir la modificación genética a la siguiente generación puesto que todas sus células están involucradas, incluyendo las germinales (óvulos y espermatozoides). Se crearon ovejas transgénicas para sintetizar factor IX y éstas

contenían el ADN del factor IX humano en todos sus tejidos [5]. Esta técnica puede ser útil para crear animales hembras, tales como cerdos, que secreten factores VIII y IX humanos en su leche [6, 7].

Hay una segunda distinción entre transferencia de genes y reparación de genes. Todos los estudios en humanos y la mayoría de los estudios preclínicos en animales se han enfocado a la transferencia de genes, donde copias adicionales del ADN de codificación normal (cADN) de los factores VIII y IX se insertan en células que anteriormente no podían sintetizar un factor de coagulación normal. Para la reparación de genes, hasta ahora ha habido éxitos relativamente limitados, ya sea en el cultivo de células o de modelos animales, aunque se están desarrollando algunas nuevas técnicas prometedoras que probablemente valdrá la pena probar en animales.

Los modelos animales de transferencia de genes para la hemofilia con vectores derivados de virus han sido los más confiables al ofrecer niveles terapéuticos sostenidos de factores de coagulación. Estos modelos animales incluyen mutaciones ocurridas naturalmente en perros (luego criados para formar colonias hemofílicas) o en ratones a los que se ha hecho deficientes en factor VIII ó IX mediante disrupción génica dirigida, conocidos como ratones con "genes noqueados" [8].

## Vectores para transferencia de genes

La transferencia de ADN a células para la terapia génica se logra por transducción, un proceso controlado que es mediado por vectores o vehículos que se adhieren a la superficie de la célula y facilitan la penetración en ella. Esto contrasta con la transfección, donde las membranas celulares se rompen y la inserción del ADN ocurre por medios físicos o electroquímicos. Comúnmente, los vectores para transducción se derivan de los nucleótidos del ácido nucleico viral, puesto que éstos son más eficientes que las preparaciones no virales actuales. Se retiene la porción del ácido nucleico viral que dirige la adherencia y penetración celular. En el cuadro 1, se resumen los sistemas de vectores con estudios animales preclínicos prometedores relevantes para la terapia génica en las hemofilias. La sección final de este estudio señala las consideraciones para su uso en pruebas clínicas.

### Vectores retrovirales

Una de las primeras estrategias de la terapia génica era usar vectores retrovirales (gamma-retrovirus u onco-retrovirus) para transducir las células en división de tejidos en cultivo y retornar las células transducidas al animal anfitrión mediante trasplante [9]. No obstante, los niveles de expresión transgen en varios tipos de células fueron considerablemente mayores en cultivo que *in vivo*, luego de que el gen se

**Cuadro 1: Vectores virales usados para la transferencia preclínica de genes de factores VIII ó IX**

Vector	Ácido Nucleico	Ventajas	Limitaciones	Referencia
Retroviral (RV)	ARN	<ul style="list-style-type: none"> <li>transducción eficiente</li> <li>integración genómica</li> <li>expresión persistente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>derivación oncogénica</li> <li>inserción al azar</li> <li>dependiente de células en división (excepto lentiviral)</li> </ul>	Van Damme et al, 2004
Adenoviral (AV)	ADN	<ul style="list-style-type: none"> <li>transducción de células que no están en división</li> <li>aloja grandes cADN</li> <li>alto nivel de expresión</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>respuestas inmunes al AV</li> <li>episomal (no integración)</li> <li>expresión transitoria</li> </ul>	Thorrez et al, 2004
Viral adeno-asociado (VAA)	ADN	<ul style="list-style-type: none"> <li>integración (parcial)</li> <li>expresión persistente</li> <li>serotipos diferentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>tamaño limitado de cADN</li> <li>posibles reacomodos</li> </ul>	Couto, 2004

silenciara después del trasplante. Estos problemas fomentaron esfuerzos para mejorar los métodos de administración de vectores directamente a animales y transducir las células *in vivo*. El principio de una expresión a largo plazo (sostenida) después de la administración *in vivo* de un vector retroviral fue establecido cuando perros con hemofilia B expresaron factor IX canino normal durante más de dos años, aunque los niveles fueron insuficientes para corregir la tendencia hemorrágica. Además, debido a que el vector retroviral requiere células en división, a estos perros se les realizó una hepatectomía parcial (extirpación quirúrgica de hasta dos tercios del hígado) a fin de incrementar el número de células en división al momento de la infusión venosa de la estructura vectorial.

Otras estrategias usadas para generar la expresión sostenida de factor IX *in vivo* a partir de vectores retrovirales incluyen transferencia de genes a anfitriones neonatos o a los hígados de animales adultos estimulados por factores de crecimiento a fin de inducir la proliferación de hepatocitos.

En cuanto al factor VIII, los estudios mostraron un aumento retardado en la expresión de factor VIII humano en conejos a los que se administró por vía intravenosa cADN con supresión del dominio B a través de un vector retroviral. La expresión persistió durante al menos varias semanas, aunque no se pudo evaluar la actividad debido a la presencia de anticuerpos neutralizantes de conejo contra el factor VIII humano. Debido a una limitación en el tamaño de la secuencia que puede insertarse en vectores retrovirales, se han usado estructuras de factor VIII con supresión del dominio B, ya que el tamaño de éstas sólo es alrededor de dos tercios del tamaño de la cADN completo. Todavía es necesario aclarar el grado en que las respuestas inmunes en animales, incluyendo perros con hemofilia A, reflejan el uso de transgenes de otras especies (factor VIII humano, por ejemplo), o constituyen una respuesta autoinmune al mismo factor VIII.

Se han hecho intentos por usar diferentes vectores retrovirales que transducirán tanto células en reposo como células en división a fin de mejorar la eficacia de la transducción. Los lentivirus son una clase de retrovirus capaces de

infectar células en reposo. Los vectores lentivirales más ampliamente estudiados se basan en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Éstos son derivados retrovirales más complejos capaces de penetrar la membrana nuclear y por lo tanto integrarse al ADN de la célula en cualquier etapa del ciclo celular. Los estudios iniciales sobre la seguridad y eficacia de estos vectores en modelos de ratones para hemofilia son prometedores [9, 10].

### **Vectores adenovirales**

Los vectores adenovirales tienen la ventaja de poder incorporar grandes fragmentos de ADN en secuencias virales de ADN convertidas en no patógenas mediante supresiones del genoma viral. Ellos también transducen fácilmente células con grandes cantidades de partículas virales e infectan a células tanto en reposo como en división. No obstante, todavía expresan varias proteínas virales que son inmunogénicas, induciendo una eliminación más rápida del vector y las células transducidas. Además, la transducción repetida generalmente no tiene éxito, a no ser que la exposición inicial haya sido acompañada de modulación inmune a fin de suprimir una respuesta a las proteínas del cápside (recubrimiento) adenoviral. La transducción repetida sería provechosa ya que el vector adenoviral permanece episomal dentro del núcleo; es decir, no se integra al ADN cromosómico del anfitrión. Se ha tenido éxito en modelos animales con expresión prolongada de factor VIII o factor IX [11], particularmente usando estructuras vectoriales que contienen interrupciones en varios genes adenovirales y cuando los vectores se administran a animales anfitriones cuya respuesta inmune ha sido suprimida. Se ha logrado mayor éxito con un tipo de vector adenoviral al que se han retirado todos los genes adenovirales (vectores cobardes, dependientes de un auxiliar o "mini-Ad"). La inserción de estas estructuras vectoriales en ratones y perros hemofílicos ha dado por resultado la expresión de niveles terapéuticos de factor de coagulación hasta por varios meses [12, 13]. En estas últimas generaciones de vectores adenovirales no hay producción de proteínas virales que pudieran mejorar la eliminación del vector en las células. No obstante, todavía hay efectos adversos agudos transitorios por la inserción del vector adenoviral relacionados con las respuestas inmunes innatas, incluyendo trombocitopenia y daño a las células hepáticas.

Las administraciones múltiples sin modulación inmune en el anfitrión seguirían siendo problemáticas debido a la respuesta de los anticuerpos contra las proteínas cápsidas del vector. Sin embargo, debido a que todavía no hay integración del vector, es probable que los niveles de proteína expresados disminuyan con el transcurso del tiempo, aun en tejidos en los que la división celular es poco frecuente, tales como el hígado.

### **Vectores virales adenoasociados (VAA)**

Los vectores VAA son capaces de transducir varios tipos de células en división y que no se encuentran en división y permanecer al interior del núcleo de dichas células durante periodos prolongados [14]. La mayoría del vector administrado permanece en una forma extra-cromosómica estable, pero una pequeña porción del vector (menos del 5%) parece integrarse al genoma celular del anfitrión. Cuando los vectores VAA se administran a cepas "permisivas" de ratones (aquellas con bajo potencial de desarrollo de anticuerpos contra la proteína humana) cruzados con otros ratones con gene "noqueado" del factor IX, la expresión de niveles terapéuticos de factor IX humano ha sido sostenida durante varios meses. La corrección fenotípica (ausencia de hemorragias) y la expresión del factor IX en estos ratones con gene "noqueado" han permanecido en niveles de 15% durante más de un año; además, con una mayor dosis de vector se han logrado niveles de factor IX cercanos al 100%. Los hepatocitos también pueden ser transducidos por infusión de vectores VAA en venas periféricas, aunque una inyección en la vena porta (la vena que fluye directamente de la circulación intestinal al hígado) permite una transducción más eficaz. La administración a perros con hemofilia B severa de un vector VAA portador de cADN de factor IX canino, ya sea a través de múltiples inyecciones intramusculares o infusiones en la vena porta, ha dado por resultado una expresión de niveles terapéuticos de factor IX durante más de cinco años. Una cADN de factor VIII con supresión del dominio B canino también ha sido insertada en un vector VAA y la inyección de dicho vector en la vena porta ha dado por resultado la expresión de niveles terapéuticos de factor VIII en perros y ratones hemofílicos [15, 16]. Nuevamente, la expresión del transgen de factor VIII en perros se ha mantenido durante más de 5 años.

### **Vectores no virales**

La ventaja de un sistema de inserción no viral es evitar la potencial toxicidad que causan los vectores virales, ya sea por integración o respuestas inflamatorias y/o inmunes a las proteínas cápsidas virales. No obstante, como sistemas que no se integran, no se anticiparía una expresión prolongada. Además, una dificultad importante reside en la estabilización del ADN y su inserción eficaz en las células *in vivo* [17]. No obstante, ha habido una sorprendente expresión a largo plazo de factores IX y VIII en ratones hemofílicos inmunodeficientes, lo que indica que la expresión episomal puede permanecer siempre que se cuente con una estructura vectorial altamente eficaz. Sin embargo, en ratones normales con deficiencia de factor VIII, ocurrió aloinmunización aun cuando se utilizó un factor VIII murino específico de la especie [18]. Todavía queda por evaluarse el grado en que la respuesta inmune se ve afectada por altos niveles iniciales de expresión del gene y/o las respuestas citoquinas ocurridas durante la inserción. Una nueva técnica alterna es el uso de vectores no virales que contienen transposones (una pieza de ADN que puede moverse de un lugar a otro en el gen y reinsertarse en otro sitio) derivados de secuencias génicas ancestrales. Si son insertados de manera concomitante con la enzima transposasa, los vectores con transposones pueden integrarse al ADN genómico de la célula anfitriona. Recientemente se demostró que un vector transposón que contiene cADN de factor IX es capaz de integrarse a células hepáticas de ratones y dirigir expresión génica a largo plazo, así como corrección fenotípica parcial de ratones con hemofilia B [19].

### **Tipos alternos de células**

El hepatocito ha quedado bien establecido como el lugar donde se realiza la síntesis del factor IX y el hígado es el principal órgano de síntesis del factor VIII. En este último caso, bien podrían contribuir tanto los hepatocitos como las células endoteliales sinusoidales. Las células endoteliales cultivadas a partir de la sangre podrían cosecharse, transducirse *in vitro* con factor VIII y servir como fuente para la transferencia de genes [20, 21]. Las células hematopoyéticas han sido una diana durante mucho tiempo debido a la accesibilidad de células precursoras en la sangre periférica. Si bien los rendimientos han sido desalentadoramente bajos, ha habido un éxito temprano con el factor VIII usando un vector

lentiviral [22]. La expresión megacariocítica del factor VIII tendría una ventaja potencial de co-expresión de la proteína estabilizadora del factor von Willebrand. Esto se ha logrado en células cultivadas, usando un promotor específico para megacariocito [23] y ha demostrado resultados *in vivo* muy prometedores, aun frente a elevadas concentraciones de inhibidores del FVIII [24].

### Reparación de genes

Los oligonucleótidos híbridos de ARN/ADN se han usado para corregir mutaciones puntuales [25]. Si bien se ha informado de éxitos parciales en algunos sistemas animales, la eficacia, particularmente *in vivo*, constituye un problema importante con esta técnica. Hay cierta evidencia de que las mutaciones sin sentido pueden suprimirse de manera transitoria a nivel ribosomal usando antibióticos aminoglicósidos como la gentamicina. Esto tendría el potencial de convertir la hemofilia severa en un fenotipo moderadamente severo en pacientes selectos que presentaran este tipo de mutación hemofílica. No obstante, su uso en cinco sujetos hemofílicos con genotipos sin sentido fracasó en demostrar un efecto clínicamente importante [26]. El corte y empalme (*trans-splicing*) es otro mecanismo para la reparación de genes a nivel del ARN y tiene potencial para aplicarse a inversiones; los primeros estudios con factor VIII en ratones indican que ésta podría ser una técnica factible para las hemofilias [27] y, de tener éxito, evitaría las potenciales toxicidades de la transferencia de genes a través de vectores virales. Todavía quedarían por desarrollarse sistemas de inserción óptimos para este fin.

### Pruebas de transferencia de genes para la hemofilia en humanos

A medida que los sistemas vectoriales capaces de insertar cADN de factor IX ó VIII a células anfitrionas se han optimizado a fin de expresar suficientes cantidades de las proteínas de coagulación *in vivo*, un problema importante ha sido el diseño de pruebas terapéuticas en pacientes humanos. Los aspectos de seguridad son de suma importancia en la evaluación de los riesgos potenciales frente a la posibilidad de hacer a la hemofilia menos severa o aplicar una cura a largo plazo. En las siguientes secciones se resumen los resultados de las pruebas clínicas de terapia génica iniciales para la hemofilia en

humanos y se abordan las inquietudes potenciales relativas a la seguridad de cada sistema vectorial, seguidas de consideraciones en cuanto a qué pacientes serían los candidatos adecuados para estos estudios iniciales en humanos.

Hasta ahora se han completado cinco pruebas clínicas de terapia génica para la hemofilia en las que participaron un total de 41 pacientes (cuadro 2). Todos estos estudios han sido pruebas de fase I/II en las que el propósito principal ha sido evaluar la toxicidad potencial del tratamiento (fase I) y determinar si hay signos precoces de beneficio terapéutico (fase II). Debe señalarse que ningún paciente mostró evidencia alguna de desarrollo de inhibidores como respuesta a la transferencia de genes. Ninguno de los pacientes tratados en estas pruebas clínicas experimentó efectos adversos importantes de largo plazo, aunque dos personas tuvieron efectos secundarios transitorios relacionados con su tratamiento con vectores virales.

### Hemofilia A

Se han realizado tres pruebas de terapia génica de factor VIII administradas a 26 sujetos con hemofilia A. En dos de ellas se utilizaron vectores virales insertados *in vivo*, mientras que en la tercera se utilizó una inserción no viral a células autólogas cultivadas [28].

En el sistema vectorial no viral, se cosecharon fibroblastos autólogos de una biopsia de piel y durante el cultivo fueron transfectadas por electroporación con cADN de un gen de factor VIII desprovisto del dominio B que contenía un promotor de fibronectina para limitar el potencial de expresión en otros tipos de células [28]. La proteína de factor VIII desprovista del dominio B está disponible comercialmente, cosechada de cultivos de células transfectadas y parece ser comparable en recuperación, supervivencia y efecto clínico para el tratamiento o prevención de hemorragias con el factor VIII de longitud completa ("tipo silvestre"; provisto de dominio B). Después se seleccionaron los fibroblastos de estos sujetos por su habilidad para expresar factor VIII

**Cuadro 2: Pruebas clínicas de transferencia de genes para hemofilia A y B**

Vector/promotor (patrocinador del estudio)	Inserción/órgano principal	Sujetos (N)	Resultados	Complicaciones	Referencias
<b>Hemofilia A:</b>					
No viral/fibronectina con cADN de factor VIII desprovisto de dominio B (Transkaryotic Therapies)	implantación omental después de electroporación <i>ex vivo</i> , selección y crecimiento de fibroblastos autólogos cultivados	12	<ul style="list-style-type: none"> <li>no hubo respuestas sostenidas</li> <li>posibles niveles de factor VIII transitorios, pero a nivel de detección</li> <li>en algunos, posible requisito de menores infusiones</li> </ul>	no hubo efectos adversos de importancia; se requiere biopsia de piel y cirugía laparoscópica con factor VIII	Roth et al, 2001
Retroviral/viral-LTR con cADN de factor VIII desprovisto de dominio B (Chiron)	3 dosis intravenosas diarias/hígado	13	<ul style="list-style-type: none"> <li>no hubo respuestas sostenidas</li> <li>en algunos, posible supervivencia prolongada del factor VIII transfundido</li> <li>en algunos, posible requisito de menores infusiones</li> </ul>	no se observó ninguna	Powell et al, 2003
Adenoviral/albúmina con cADN de factor VIII de longitud completa (GenStar)	intravenosa/hígado	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>no hubo respuesta sostenida</li> <li>posibles niveles de factor VIII transitorios, pero a nivel de detección</li> </ul>	disfunción transitoria del hígado y trombocitopenia	White, 2003
<b>Hemofilia B:</b>					
Viral adenoasociado, VAA-2/CMV con cADN de factor IX e intrón parcial (Avigen)	intramuscular/múltiples inyecciones en el <i>vastus lateralis</i> de ambos lados	8	<ul style="list-style-type: none"> <li>no hubo respuestas sostenidas</li> <li>vector y expresión persistentes, demostrada hasta por 10 meses en biopsias musculares</li> </ul>	no hubo eventos adversos de importancia; se administró factor IX para evitar hemorragia intramuscular	Manno et al, 2003
Viral adenoasociado, VAA-2/ alfa-antitripsina con cADN de factor IX (Avigen)	intrahepática mediante un catéter con oclusión momentánea mediante globo del flujo a la arteria hepática	7	<ul style="list-style-type: none"> <li>no hubo respuestas sostenidas</li> <li>con la dosis más elevada, un paciente logró niveles transitorios de factor IX de 12%</li> <li>en algunos, posible requisito de menores infusiones</li> </ul>	disfunción transitoria del hígado en dos pacientes; se administró factor IX para evitar hemorragia durante procedimiento	High, 2004; High et al, 2004; Manno et al, 2006

secretarlo en el medio de cultivo. Estas células fueron luego implantadas mediante laparoscopia en la cavidad peritoneal, por inyección en depósitos lípidos omentales. Los pacientes recibieron concentrado de factor VIII para evitar hemorragias relacionadas con el procedimiento invasor. Sólo ocurrieron efectos adversos menores, de modo que el procedimiento parece ser bastante seguro y no se presentaron complicaciones a largo plazo. Después de la terapia se midieron los niveles de factor de coagulación y, en algunos sujetos, se encontraron en el límite de detección de 1% para la prueba de actividad coagulante o ligeramente arriba de éste. Sin embargo, en un lapso de varios días a unas cuantas semanas, todos los niveles volvieron a los niveles basales previos al tratamiento. Otro beneficio potencial observado en algunos de estos sujetos fue una reducción en los episodios hemorrágicos espontáneos que requerían infusiones exógenas de concentrados de factor VIII. No obstante, debe reconocerse que este último resultado podría ser difícil de distinguir de un efecto de placebo.

En otra prueba de transferencia de genes de factor VIII se utilizó un vector retroviral de generación temprana derivado de un virus de leucemia murina [29]. El vector contenía la secuencia viral promotora para expresar un factor VIII desprovisto de dominio B. Se administró mediante infusiones intravenosas simples durante tres días consecutivos. Las infusiones de vector y procedimientos subsiguientes fueron bien tolerados sin que se notaran complicaciones. La actividad coagulante del factor VIII post-terapia si bien resultó algo variable al igual que en el estudio del fibroblasto, no mostró elevaciones consistentes por arriba del límite de detección del 1%. Además, no se observó respuesta a la dosis. En un lapso de varios días a unas cuantas semanas, toda la actividad volvió a los niveles anteriores al tratamiento. Sin embargo, nuevamente algunos sujetos reportaron menos episodios hemorrágicos espontáneos en las semanas siguientes a la transferencia de genes. Si bien los datos son limitados, podría haberse dado una supervivencia prolongada del factor VIII transfundido que sugeriría un bajo nivel de factor VIII transgénico circulante (aunque éste no fuera detectable mediante las pruebas de rutina).

Un vector adenoviral dependiente de un auxiliar; es decir, desprovisto de sus genes virales y al que se le había insertado una cADN de factor VIII de longitud completa, se administró por vía intravenosa a un paciente [30]. Incluía un promotor de albúmina para limitar la expresión principalmente a los hepatocitos. Si bien cierta actividad de coagulación de factor VIII sugirió un posible efecto que era independiente del factor VIII infundido, necesario para tratar episodios hemorrágicos esporádicos rutinarios, no hubo una respuesta sostenida definitiva y los niveles encontrados fueron cercanos al nivel de detección, por lo que podrían haber sido espurios. El paciente experimentó una caída transitoria en su conteo plaquetario y mostró evidencia clínica transitoria de daño hepatocelular, presumiblemente como un efecto tóxico del cápside o proteína de recubrimiento del sistema vectorial transductor.

### **Hemofilia B**

Se han completado dos pruebas usando estructuras vectoriales virales adenoasociadas en 15 sujetos con hemofilia B [31, 32]. Si bien el factor IX por lo general se expresa en niveles más elevados que el factor VIII, es más pequeño que la albúmina y por lo tanto tiene un mayor volumen de distribución. Además, en una base molar, circula en cantidades 300 veces mayores que el factor VIII.

El objetivo de la primera prueba fue la transferencia de genes a las células musculares en sujetos con hemofilia B severa y, si bien se demostró la expresión del gene a largo plazo, los niveles sistémicos de factor IX no aumentaron considerablemente. En la segunda prueba, el hígado fue el órgano diana. Con la dosis mayor se demostró eficacia transitoria, aunque dos sujetos experimentaron toxicidad hepática retardada, relacionada con este vector.

La prueba del "músculo" utilizó un vector viral adenoasociado con un promotor viral que expresaba un "minigen" del factor IX que contenía cADN del factor IX con un intrón de secuencia parcial [33]. Conforme las dosis se incrementaban, se aplicaron inyecciones en múltiples puntos del área lateral de los muslos. Biopsias musculares, realizadas a los 2 y 10 meses, mostraron la persistencia del vector y, mediante inmunofluorescencia, expresión de la

proteína de factor IX. Las únicas complicaciones notables se relacionaron con los lugares en los que se realizó la biopsia. Cabe mencionar que no se desarrollaron inhibidores; se analizaron muestras de semen que resultaron negativas para secuencias virales, excluyendo una transmisión importante a las células germinales. No obstante, los resultados de la eficacia fueron desalentadores en comparación con las respuestas a las dosis observadas en estudios preclínicos, incluyendo los realizados en perros hemofílicos. Esto podría estar relacionado con una relativamente baja densidad de receptores celulares superficiales para el virus adenoasociado en el grupo muscular seleccionado para los estudios en humanos, el serotipo utilizado y el hecho de que miocitos y miotubos tienen una capacidad limitada para  $\gamma$ -carboxilar el factor IX. Por lo tanto, se necesitarían más puntos de inyección y no mayores cantidades de vector inyectadas en cada punto.

En la prueba del "hígado", el vector viral adenoasociado se diseñó para un mayor nivel de expresión y se utilizó un promotor hepatocelular específico [32, 34]. El vector se insertó a través de un catéter fluoroscópicamente ubicado en la arteria hepática como procedimiento radiológico. Se infló un globo para detener de manera momentánea la circulación hepática, como se hace para la infusión localizada de quimioterapia en caso de tumores malignos. La circulación de la vena porta evitó isquemia hepática. Se logró la transferencia hepática eficaz del gene ya que uno de los dos pacientes, tratado con la dosis vectorial más elevada, presentó actividad coagulante de factor IX que llegó a 12%, un incremento claramente debido a la transferencia del gene. No obstante, el éxito fue sólo temporal y la actividad decayó a niveles de base luego de cuatro semanas, periodo después del cual el paciente mostró evidencia clínica transitoria de toxicidad hepatocelular. Un paciente adicional, que recibió una dosis vectorial reducida, mostró una ligera disfunción química hepática que también podría reflejar una respuesta inmune a las proteínas cápsidas del vector insertado [35]. Dicha complicación llevó a discontinuar esta prueba [36]. Dos nuevas pruebas de VAA para el factor IX se encuentran actualmente en las etapas finales de planeación y es probable que inicien el reclutamiento de pacientes durante 2008.

## Consideraciones para la seguridad humana con los vectores virales

### Vectores retrovirales

Los vectores retrovirales están contenidos en células productoras por productos génicos virales, abastecidos en "trans" por estructuras auxiliares. Es necesario tomar precauciones a fin de garantizar que no ocurra la replicación de un virus competente a través de la recombinación de los genes del auxiliar y del vector. La mutagénesis por inserción constituye otro problema de seguridad porque los lugares de integración del vector retroviral no pueden ser controlados. Dado que el vector transporta su propio promotor que puede activar cualquier gen cercano, la integración a proximidad de un proto-oncógeno podría predisponer a esa célula y su progenie a desarrollar un patrón de crecimiento neoplástico, es decir, cáncer. Tomando en consideración el tamaño de todo el genoma, esta es una complicación muy poco probable aun si la integración no fuera completamente al azar. En los pacientes que han recibido vectores retrovirales antiguos con una variedad de cADN diferentes, hay considerable evidencia de que estos vectores retrovirales son seguros y bien tolerados, por lo menos a corto plazo. No obstante, el desarrollo de leucemia de células T en dos pacientes tratados durante una reciente prueba de terapia génica para inmunodeficiencia indica que, en ciertas y probablemente poco comunes instancias, dependiendo del tipo de gene que se inserta y de la selección de células para inserción, esta clase de complicación puede llegar a ocurrir [37]. Claramente, los vectores no virales serían preferibles para evitar cualquier riesgo de replicación, de generación de virus competentes o de mutagénesis por inserción. Sin embargo, los vectores no virales son mucho menos eficientes para penetrar células, de modo que la inserción y la estabilidad deben mejorarse considerablemente antes de que éstos puedan ser considerados como potencialmente terapéuticos.

### Vectores adenovirales

Los vectores adenovirales son seguros en el sentido de que no se integran. Varias copias pueden transducir la misma célula y es necesario mantener suficientemente bajo el número de copias para evitar toxicidad y muerte celulares. Debido a que son la causa del resfrío común, es probable que algunos individuos tengan títulos de anticuerpos suficientemente

altos contra el tipo matriz del vector adenoviral para evitar la entrada a la célula. Los vectores adenovirales también activan la fase precoz, innata del sistema inmune anfitrión que, en su forma más extrema, puede causar un estado de inflamación sistémica apabullante y muerte [38]. Para evitar las posteriores respuestas inmunes adaptables a proteínas adenovirales, los vectores cobardes que son dependientes de un auxiliar son particularmente atractivos; no obstante, aún queda por demostrarse su habilidad para permanecer durante periodos suficientemente largos a fin de brindar una producción de factor de coagulación sostenida, y necesitarán modificaciones adicionales para permitir transducciones repetidas. Un estudio en perros con hemofilia A indica que esto podría llegar a ser posible [13]. Se investiga una variedad de estrategias para limitar las respuestas inmunes a vectores adenovirales [39].

### **Vectores virales adenoasociados**

Los vectores virales adenoasociados (VAA) permanecen durante largos periodos de tiempo en el núcleo de la célula anfitriona, pero sólo una pequeña proporción del vector se integra al genoma. La pequeña cantidad del vector que se integra causa las mismas inquietudes respecto a la activación oncogénica que surgen con los vectores retrovirales. Esto podría ser problemático en la terapia génica hepática para un individuo portador de hepatitis C, dado que ese virus ya está causando un incremento en el cambio hepatocelular. La administración por vía muscular evita el riesgo relacionado con la hepatitis C, pero se sabe que esta ruta es más inmunogénica.

Aunque sólo uno de los pocos perros con hemofilia B a los que se inyectó por vía intramuscular un vector VAA con cADN de factor IX canino desarrolló una respuesta transitoria de anticuerpos contra el factor IX [40], la frecuencia podría ser mayor en pacientes humanos. La colonia canina original usada tiene una sola mutación de sentido único con antígeno plasmático de factor IX indetectable, aunque la presencia de una copia de factor IX en el ARN mensajero indica que pueden sintetizarse rastros de proteína de factor IX, por lo menos intracelularmente, y esto podría disminuir el riesgo general de que se desarrollaran anticuerpos contra el factor IX. Las alteraciones de genes importantes y las mutaciones sin sentido

comúnmente están más relacionadas con la aloinmunización en la hemofilia, tanto A como B.

No hubo prueba de aloinmunización en los ocho pacientes con hemofilia B severa, quienes habían sido transfundidos con anterioridad (todos con genotipos de sentido único), que recibieron un vector VAA por vía intramuscular [33]. La tasa de aloinmunización en la hemofilia A posterior a la terapia con concentrados es por lo menos un orden de magnitud mayor que en la hemofilia B. No obstante, debido a su mayor tamaño y a su distribución intravascular, el factor VIII administrado por vía intravenosa probablemente tendría acceso limitado a la circulación. Una preocupación inicial con la inserción de vectores VAA en el hígado era la aparición transitoria del vector en el semen humano [34]. Sin embargo, la presencia en las células espermatozoides ha sido esencialmente excluida. Además, en un modelo murino, el vector VAA no pudo transducir las células espermatozoides, aún cuando se le incubó directamente con espermatozoides a muy altos niveles [41]. Por lo tanto, aunque la transmisión a las células germinales es teóricamente posible para los vectores virales, ésta no parece ocurrir.

En un individuo que logró la primera respuesta inequívoca al factor IX de un vector VAA insertado en el hígado, hubo evidencia de una respuesta inmune retardada y toxicidad hepática transitoria [32, 34, 35]. Todavía queda por determinar el grado hasta el cual lo anterior representa un problema de serotipo con el vector y/o una respuesta del anfitrión no observada en estudios preclínicos.

### **Participación de los pacientes**

La selección de sujetos de estudio requiere de una cuidadosa consideración, particularmente cuando hay una tendencia hemorrágica que generalmente puede controlarse mediante terapia de infusión [42]. Es de suma importancia asegurarse de que los sujetos potenciales reciban asesoría en cuanto a los posibles riesgos. Las complicaciones que hasta la fecha han surgido en las pruebas clínicas deben presentárseles de manera imparcial. Además, la motivación potencial del sujeto debe evaluarse cuidadosamente en busca de altruismo por el avance de la ciencia y entendimiento de que hay pocas o nulas posibilidades de obtener un beneficio personal, particularmente en las fases I/II de las pruebas clínicas. Los protocolos

deben asegurarse de que los sujetos potenciales no están solamente tratando de complacer al investigador, especialmente cuando éste(a) es también el médico que atiende al paciente.

Existe un acuerdo general respecto a que para los estudios clínicos iniciales debe contarse con el consentimiento de pacientes con hemofilia adultos. Que individuos seropositivos al VIH sean elegibles o no es un tema debatible pero, si se eligieran, ciertos medicamentos antirretrovirales podrían interferir con los vectores retrovirales. Por otro lado, hay varios pacientes con hemofilia que han sobrevivido durante mucho tiempo a la infección por VIH, algunos de los cuales han permanecido saludables, aun sin terapia inhibidora de la proteasa, durante más de 20 años. Cualquier inclusión de adultos seropositivos al VIH requerirá que éstos sean actualmente asintomáticos, presenten cargas virales bajas y conteos razonables de linfocitos CD4.


Una preocupación adicional es el potencial de transducción de las células germinales. Si bien esto es muy poco probable en el caso de la mayoría de los vectores propuestos para pruebas clínicas, sería prudente que inicialmente se seleccionaran pacientes que no tendrán hijos o que están dispuestos a utilizar un método anticonceptivo de barrera alrededor de periodo en el que se administrará el vector. Un cuidadoso seguimiento con pruebas de detección como la amplificación de RCP en busca hasta de rastros de vector de ADN en muestras de esperma, por ejemplo, debería ayudar a resolver la cuestión de si la integración de las células germinales constituye siquiera un ligero riesgo.

En Estados Unidos, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) necesita estudiar los datos clínicos y aprobar cada protocolo para terapia génica antes de que el vector pueda ser considerado como un nuevo medicamento de investigación (IND por sus siglas en inglés) y los experimentos clínicos puedan proceder. Además, un comité nacional de asesoría sobre recombinantes de los Institutos Nacionales de Salud (NIH por sus siglas en inglés) proporciona directrices y supervisión adicionales para los protocolos de terapia génica. Una vez que se determinan las calificaciones para la inclusión en un estudio y que los protocolos se completen y se aprueben a

escala nacional, todavía se requiere que las juntas institucionales de revisión (IRB por sus siglas en inglés) evalúen y aprueben los protocolos y formatos de consentimiento para los sujetos humanos de cada institución participante. Se requieren rigurosas normas de seguridad para garantizar la fabricación segura y reproducible de los vectores virales.

Si bien posiblemente existen leves y probablemente imprevistos riesgos en la terapia génica para la hemofilia, los datos de modelos animales indican que puede ser eficaz y segura. La seguridad que hasta ahora han demostrado en otros grupos de pacientes apoya sólidamente el diseño cuidadoso de estudios clínicos a fin de determinar la capacidad de la terapia génica para disminuir la severidad de la tendencia hemorrágica y posiblemente curar las deficiencias de factores VIII ó IX en pacientes con hemofilia A y B, respectivamente.

## Conclusión

El trastorno de la hemofilia sigue siendo uno de los principales candidatos para la aplicación exitosa de la terapia génica. Durante la pasada década se realizaron impresionantes avances en la evaluación preclínica de la transferencia de genes en hemofilia y ahora hay muchos informes de éxitos a largo plazo en ratones hemofílicos y de cierto éxito, que ha durado varios años, en perros hemofílicos. Más recientemente, las pruebas iniciales de terapia génica para la hemofilia en humanos no han mostrado efectos adversos persistentes aunque, en el mejor de los casos, los incrementos en los niveles de factor de coagulación han sido mínimos y de corta duración. Parece probable que, para que se logren niveles terapéuticos de factor de coagulación a largo plazo en humanos, será necesario superar varios retos que todavía prevalecen, incluyendo prevención en el anfitrión de respuestas inmunes al vector y al producto transgen, mayor eficacia de transducción, así como desarrollo de estructuras de transgenes que mantengan una expresión persistente después de su administración. No obstante, a pesar de estos retos, todavía hay motivo de optimismo y el desarrollo de métodos seguros y eficaces para brindar una "cura" a la hemofilia sigue siendo factible. 

**Referencias citadas**

1. Verma IM. Gene therapy. *Sci Am* 1990; 263: 68-72, 81-84.
2. High KA. Gene transfer as an approach to treating hemophilia. *Sem Thromb Hemostas* 2003; 29: 107-119.
3. VandenDriessche T, Collen D, Chuah MKL. Gene therapy for the hemophilias. *J Thrombos Haemostas* 2003; 1: 1550-1558.
4. Walsh CE. Gene therapy progress and prospects: Gene therapy for the hemophilias. *Gene Ther* 2003; 10: 999-1003.
5. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KHS. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997; 278: 2130-2133.
6. Paleyanda RK, Velander WH, Lee TK, Scandella DH, Gwazdauskas FC, Knight JW, Hoyer LW, Drohan WN, Lubon H. Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nature Biotechnol* 1997; 15: 971-975.
7. Van Cott KE, Butler SP, Russell CG, Subramanian A, Lubon H, Gwazdauskas FC, Knight J, Drohan WN, Velander WH. Transgenic pigs as bioreactors: a comparison of gamma-carboxylation of glutamic acid in recombinant human protein C and factor IX by the mammary gland. *Genet Anal Biomol Eng* 1999; 15: 155-160.
8. Rawle FEM, Lillicrap D. Preclinical animal models of gene therapy for hemophilia: predictive value and limitations. *Sem Thrombos Hemostas* 2004; 30: 205-213.
9. Van Damme A, Chuah MKL, Collen D, VandenDriessche T. Onco-retroviral and lentiviral-based gene therapy for hemophilia: preclinical studies. *Sem Thrombos Hemostas* 2004; 30: 185-195.
10. Follenzi A, Battaglia M, Lombardo A, Annoni A, Roncarolo MG, Naldini L. Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. *Blood* 2004; 103: 3700-3709.
11. Thorrez L, VandenDriessche T, Collen D, Chuah MKL. Preclinical gene therapy studies for hemophilia using adenoviral vectors. *Sem Thrombos Hemostas* 2004; 30: 173-183.
12. Chuah MKL, Collen D, VandenDriessche T. Clinical gene transfer studies for hemophilia A. *Sem Thrombos Hemostas* 2004; 30: 249-256.
13. Brown BD, Shi CX, Powell S, Hurlbut D, Graham FL, Lillicrap D. Helper-dependent adenoviral vectors mediate therapeutic factor VIII expression for several months with minimal accompanying toxicity in a canine model of severe hemophilia A. *Blood* 2004; 103: 804-810.
14. Couto LB. Preclinical gene therapy studies for hemophilia using adeno-associated virus (AAV) vectors. *Sem Thrombos Hemostas* 2004; 30: 161-171.
15. Scallan CD, Lillicrap D, Jiang H, Qian X, Patarroyo-White SL, Parker AE et al. Sustained phenotypic correction of canine hemophilia A using an adeno-associated viral vector. *Blood* 2003; 102: 2031-2037.
16. Scallan CD, Liu T, Parker AE, Patarroyo-White SL, Chen H, Jiang H et al. Phenotypic correction of a mouse model of hemophilia A using AAV2 vectors encoding the heavy and light chains of FVIII. *Blood* 2003; 102: 3919-3926.
17. Gomez-Vargas A, Hortelano G. Nonviral gene therapy approaches to hemophilia. *Sem Thrombos Hemostas* 2004; 30: 197-204.
18. Ye P, Thompson AR, Sarkar R, Lillicrap DP, Kaufman RJ, Ochs HD, Rawlings DJ, Miao CH. Transgene-specific, species-independent immune response against factor VIII after naked DNA transfer. *Mol Ther* 2004; 10: 117-126.
19. Mikkelsen JG, Yant SR, Meuse L, Huang Z, Xu H, Kay MA. Helper-independent Sleeping Beauty transposon-transposase vectors for efficient nonviral gene delivery and persistent gene expression in vivo. *Mol Ther* 2003; 8: 654-665.
20. Lin Y, Chang LM, Solovey A, Healey JF, Lollar P, Hebbel RP. Use of blood outgrowth endothelial cells for gene therapy for hemophilia A. *Blood* 2002; 99: 457-462.

21. Matsui H, Shibata M, Brown B, Labelle A, Hegadorn C, Andrews C, Hebbel RP, Galipeau J, Hough C, Lillicrap D. Ex vivo gene therapy for hemophilia A that enhances safe delivery and sustained in vivo factor VIII expression from lentivirally engineered endothelial progenitors. *Stem Cells* 2007; 25(10):2660-9.
22. Tiede A, Eder M, vonDepka M, Battmer K, Luther S, Kiem HP, Ganser A, Scherr M. Recombinant factor VIII expression in hematopoietic cells following lentiviral transduction. *Gene Ther* 2003; 10: 1917-1925.
23. Shi Q, Wilcox DA, Fahs SA, Kroner PA, Montgomery RR. Expression of human factor VIII under control of the platelet-specific alpha IIb promoter in megakaryocytic cell line as well as storage together with VWF. *Mol Genetics Metabol* 2003; 79: 25-33.
24. Shi Q, Wilcox DA, Fahs SA, Weiler H, Wells CW, Cooley BC, Desai D, Morateck PA, Gorski J, Montgomery RR. Factor VIII ectopically targeted to platelets is therapeutic in hemophilia A with high-titer inhibitory antibodies. *J Clin Invest.* 2006; 116(7):1974-82.
25. Kren BT, Bandyopadhyay P, Steer CJ. In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature Med* 1998; 4: 285-290.
26. James PD, Rivard GE, Poon MC, Warner M, Raut S, McKenna S, Leggo J, Lillicrap DP. Aminoglycoside suppression of nonsense mutations in severe hemophilia. *Blood* 2003; 102: 53a (abstract #176).
27. Chao HJ, Mansfield SG, Bartel RC, Hiriyanna S, Mitchell LG, Garcia-Blanco M, Walsh CE. Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nature Med* 2003; 9: 1015-1019.
28. Roth DA, Tawa NE Jr, O'Brien JM, Treco DA, Selden RF. Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *N Engl J Med* 2001; 344: 1735-1742.
29. Powell JS, Ragni MV, White GC, Lusher JM, Hillman-Wiseman C, Moon TE, Cole V, Ramanathan-Girish S, Roehl H, Sajjadi N, Jolly DJ, Hurst D. Phase 1 trial of FVIII gene transfer for severe hemophilia A using a retroviral construct administered by peripheral intravenous infusion. *Blood* 2003; 102: 2038-2045.
30. White GC. Clinical study of a gutless adenovirus vector (MAXAD FVIII) for treatment of hemophilia A. Presented at the National Hemophilia Foundation's Workshop on Gene Therapy for the Hemophilias, La Jolla, CA, April, 2003.
31. High KA. Clinical gene transfer studies for hemophilia B. *Sem Thrombos Hemostas* 2004; 30: 257-267.
32. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* 2006; 12(3):342-7.
33. Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 2003; 101: 2963-2972.
34. High K, Manno C, Sabatino D, Hutchison S, Dake M, Razavi M et al. Immune responses to AAV and to factor IX in a phase I study of AAV-mediated, liver-directed gene transfer for hemophilia B. *Mol Ther* 2004; 9: abstract #1002.
35. Mingozzi F, Maus MV, Hui DJ, Sabatino DE, Murphy SL, Rasko JE et al. CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med.* 2007; 13(4):419-22.
36. Kaiser J. Gene therapy. Side effects sideline hemophilia trial. *Science* 2004; 304: 1423-1425.
37. Williams DA, Baum C. Gene therapy: new challenges ahead. *Science* 2003; 302: 400-401.
38. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 148-155.
39. Schagen FHE, Ossevoort M, Toes REM, Hoeben RC. Immune responses against

- adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50: 51-70.
40. Herzog RW, Dobrzynski E. Immune implications of gene therapy for hemophilia. *Sem Thrombos Hemostas* 2004; 30: 215-226.
  41. Couto L, Parker A, Gordon JW. Direct exposure of mouse spermatozoa to very high concentrations of a serotype-2 adeno-associated virus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction. *Hum Gene Ther* 2004; 15: 287-291.
  42. Ragni MV. Hemophilia gene transfer: comparison with conventional protein replacement therapy. *Sem Thrombos Hemostas* 2004; 30: 239-247.

## Referencias generales

1. Mamman EF. *Preface: Gene therapy in hemophilia A and B in animals and humans: Current status and perspectives.* *Sem Thrombos Hemostas* 2004; 30: 157-159.  
  
The issue, edited by VandenDriessche T & Chuah MKL, contains several reviews cited below that discuss much of the older primary literature on vector development and cellular and preclinical animal gene transfer.
2. Pierce GF, Lillicrap D, Pipe SW, Vandendriessche T. Gene therapy, bioengineered clotting factors and novel technologies for hemophilia treatment. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 901-6.
3. Hough C, Lillicrap D. Gene therapy for hemophilia: an imperative to succeed. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1195-205.





**1425 René Lévesque Blvd. W., Suite 1010 Montréal, Québec H3G 1T7 CANADA**  
**Tel.: (514) 875-7944 Fax: (514) 875-8916**  
**[www.wfh.org](http://www.wfh.org)**