



# **APLICACIÓN DE TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA POR MEDIO DEL USO DE VECTORES VIRALES, HÍBRIDOS Y NO VIRALES**

**Wendy Natalia Fernandez Velandia  
Diana Lucia Rodriguez Acosta**

**Universidad El Bosque  
Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica  
Bogotá DC. – Abril de 2022**

**APLICACIÓN DE TERAPIA GÉNICA PARA EL  
TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA POR MEDIO  
DEL USO DE VECTORES VIRALES, HÍBRIDOS Y NO  
VIRALES**

**Wendy Natalia Fernandez Velandia  
Diana Lucia Rodriguez Acosta**

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:**

**Químico Farmacéutico**

**Monografía**

**Yeimy Viviana Ariza Marquez**

**Revisión bibliográfica descriptiva**

**Universidad El Bosque  
Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica  
Bogotá DC. – Abril de 2022**

# Agradecimientos

Expresamos gratitud a todas aquellas personas que hicieron posible formarnos como profesionales y que nos motivaron a lo largo de este proceso.

También hacemos mención especial a las personas que hicieron posible culminar este proyecto. Agradecemos a la Doctora Yeimy Viviana Ariza Marquez por motivarnos a incursionar en el campo de la biotecnología, por darnos las pautas necesarias para presentar nuestro trabajo de grado y por expresarnos sentimientos de motivación y orgullo. Agradecemos al Doctor Ricardo Castaño Poveda por asesorarnos en la búsqueda de información relacionada con el ámbito legal y por ofrecernos su ayuda en la elaboración de nuestro proyecto.

# Tabla de contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>9</b>
<b>2. Problema de investigación</b>	<b>10</b>
<b>3. Pregunta de investigación</b>	<b>11</b>
<b>4. Justificación</b>	<b>12</b>
<b>5. Objetivos</b>	<b>13</b>
5.1 Objetivo general	13
5.2 Objetivos específicos	13
<b>6. Marco teórico</b>	<b>14</b>
6.1 Generalidades de terapia génica	14
6.2 Fisiopatología de la fibrosis quística	15
6.3 Mutaciones del CFTR en la fibrosis quística	16
6.4 Blanco y heterogeneidad celular	17
6.5 Internalización celular	18
6.6 Barreras anatómicas	19
6.7 Mutaciones de CFTR y medicamentos CFTR moduladores	20
<b>7. Metodología</b>	<b>21</b>
7.1. Tipo de estudio	21
7.2 Criterios de inclusión	21
7.3 Criterios de exclusión	21
7.4 Metodología de búsqueda de la literatura	21
7.5 Selección de la literatura	22
7.6 Recolección de datos	22
<b>8. Resultados</b>	<b>23</b>
8.1 Enfoque actual de la terapia génica de la fibrosis quística	23
8.2 Vectores víricos	24
8.2.1 Retrovirales	24
8.2.2 Lentivirus	24
8.2.3 Virus adenoasociados (AAV)	26
8.2.4 Adenovirus (Ad)	28
8.3 Vectores no virales	29
8.3.1 Nanopartículas	29
8.3.2 Liposomas	30
8.3.3 Niosomas	31
8.4 Vectores híbridos	32
8.4.1 rAAV2/HBoV1	32
8.4.2 PB/Ad	33
8.4.3 AAV/Ad	34
8.4.4 Nanopartículas híbridas	34
8.5 Estudios clínicos	35
<b>9. Discusión de Resultados</b>	<b>38</b>
9.1 Descripción del vector	38
9.2 Proceso de manufactura	38
9.2.1 Plásmido pGM169	38
9.2.2 Lípido catiónico GL67A	39
9.2.3 Preparación del vector final	39
9.3 Vías de administración y formas farmacéuticas	40
9.4 Panorama de la fibrosis quística en Colombia	42
9.5 Ámbito legal	43
<b>10. Conclusiones y recomendaciones</b>	<b>46</b>
<b>11. Referencias bibliográficas</b>	<b>47</b>

## Listado de tablas

		<b>Pág.</b>
Tabla 1	Criterios de inclusión de los referentes teóricos	<b>21</b>
Tabla 2	Criterios de exclusión de los referentes teóricos	<b>21</b>
Tabla 3	Listado de ensayos clínicos con vectores virales y no virales (sintéticos).	<b>36</b>
Tabla 4	Ventajas y limitaciones de vectores empleados en la terapia génica aplicada a la fibrosis quística.	<b>36</b>

## Lista de Símbolos y abreviaturas

**AAV** Virus adenoasociado

**Ad** Adenovirus

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**ARN** Ácido ribonucleico

**AVV** Virus adenoasociados

**BGH Poli A** Señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina

**CFBE41o** línea celular epitelial bronquial humana de fibrosis quística

**CFF** Fundación de fibrosis quística estadounidense

**CFTR** Regulador de la conductancia transmembrana de fibrosis quística

**DMPE**

1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

**DMPE-PEG5000** DMPE unido covalentemente con PEG 5000

**DOPE** Dioleoilfosfatidiletanolamina

**DPTA** Dietilentriaminopentaacetato

**DPPC** dipalmitoilfosfatidilcolina

**EMA** Agencia Europea de Medicamentos

**ENaC** Canales de sodio epitelial sensible a amilorida

**FDA** Administración de Medicamentos y Alimentos

**FEV1** Volumen espiratorio forzado en un segundo

**FQ** Fibrosis quística

**GFP** Proteína verde fluorescente

**GL67** N4 colesteril-espermina

**HBoV1** Bocavirus humano 1

**hCEFI** Potenciador del citomegalovirus humano/factor de elongación 1 alfa

**HD-Ad** Vectores adenovirales auxiliares dependientes

**HEK 293** células embrionarias de riñón humano

**Invima** Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

**ITR** Porción terminal invertida

**LPC** Lisofosfatidilcolina

**NHGRI** Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano

**NP** Nanopartículas

**MSPS** Ministerio de Salud y Protección Social

**ORCC** Canal de cloruro rectificador hacia el exterior

**PBAE** poli  $\beta$ -aminoésteres

**PBS** Plan de Beneficios en Salud

**pDNA** Plásmido de DNA

**PEG** polietilenglicol

**PER.C6** línea celular retiniana embrionaria humana

**PLGA** poliláctico-co-glicólico

**PMDA** Agencia de Productos Farmacéuticos y Dispositivos Médicos

**PNA** Ácido nucleico peptídico

**rAAV** Virus adenoasociado recombinante

**Sivigila** Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública

**UK CFGTC** Consorcio de Terapia Génica de Fibrosis Quística del Reino Unido

**VSV-G** virus de la estomatitis vesicular

**VIS** virus de la inmunodeficiencia de los simios

**Sev** virus sendai

**VIH-1** virus de la inmunodeficiencia humana-1

**VIF** virus de la inmunodeficiencia felina

## Resumen

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad huérfana incurable causada por la mutación del gen CFTR, cuyo tratamiento está enfocado en el manejo de la sintomatología y la reducción de las complicaciones. En este contexto, la terapia génica surge como una alternativa eficaz para tratar la enfermedad desde su causa raíz y evitar el progreso del daño tisular por medio del uso de vectores virales, no virales e híbridos; a partir de los cuales se han desarrollado estudios preclínicos y clínicos de fase I y II que han arrojado resultados significativos en términos de la transfección de células pulmonares y la transducción genética de la proteína CFTR *in vitro* e *in vivo*. No obstante, en Colombia no se cuenta con un documento que relacione la información previamente expuesta, los costos y la tasa de incidencia de la enfermedad, al igual que los mecanismos legales para acceder a éste tipo de terapia. Por ésta razón, es pertinente realizar una revisión bibliográfica que recopile la información anteriormente descrita en bases de datos como Scopus, Scielo y entidades estatales y de referencia internacional que brindan un panorama general de la FQ. Pudiendo concluir que a la fecha no se cuenta con un vector que garantice la implementación de la terapia génica en el tratamiento de la FQ de manera eficaz debido a las dificultades que se han presentado en la elección del blanco celular más idóneo, en lograr una expresión génica sostenida y baja inmunogenicidad; el diseño de sistemas de vehiculización que sobrepasen las barreras fisioanatómicas y los procesos de manufactura complejos. Pese a ésto, vectores como el GL67A/pGM169 han demostrado mejoras estadísticamente cuantificables al lograr una estabilización modesta de la tasa de deterioro de la función pulmonar en pacientes con FQ.

**Palabras Clave:** fibrosis quística, terapia génica, vector, CFTR.

## **Abstract**

Cystic fibrosis (CF) is an incurable orphan disease, caused by mutation of the CFTR gene whose treatment is focused on symptomatology control and the reduction of complications. In this context, gene therapy emerges as an effective alternative to treat the disease and prevent the progression of tissue damage through the use of viral, non-viral and hybrid vectors. Phase I and II clinical trials and preclinical studies with these vectors have had significant results in terms of lung cell transfection and genetic transduction of the CFTR protein. However, in Colombia, there is no document with this information and there is no information on costs, incidence rate of this disease and legal mechanisms to access this type of therapy. Therefore, it is pertinent to make a bibliographic review in databases such as Scopus, Scielo and state and international reference entities that provide a general overview of CF. Finally, we conclude that there is no vector that guarantees the effective implementation of gene therapy in the treatment of CF as a result of the difficulties of choosing the most suitable cellular target, achieving sustained gene expression and low immunogenicity, the design of delivery systems that overcome physioanatomical barriers and complex manufacturing processes. Despite this, vectors such as GL67A/pGM169 have demonstrated statistically measurable improvements in achieving modest stabilization of the rate of lung function decline in CF patients.

**Keywords:** cystic fibrosis, gene therapy, vector, CFTR.

# 1. Introducción

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad huérfana multisistémica causada por la mutación del gen regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) ubicado en el cromosoma 7 (Ringshausen *et al.*, 2020). Ésta enfermedad se caracteriza por provocar la retención de esputo o moco deshidratado en los pulmones y vías respiratorias principalmente (Ringshausen *et al.*, 2020). No obstante, puede afectar otros órganos como el hígado, páncreas, vías biliares e intestinales; causando inflamación, infecciones y destrucción gradual de tejidos sin importar el órgano que afecte (Ringshausen *et al.*, 2020).

La FQ al ser una enfermedad provocada por la mutación en el gen CFTR, se contempla como un modelo ideal para terapia génica, haciendo de ésta una opción funcional para los pacientes que la padecen, independientemente de la mutación que se presente (Bandara *et al.*, 2021). Desde 1989 con el descubrimiento del gen CFTR, hasta la actualidad, se han realizado grandes avances en la terapia génica aplicada a la FQ, haciendo uso de una gran variedad de vectores virales y no virales ó sintéticos (Cooney *et al.*, 2018). Sin embargo, hay pocas revisiones bibliográficas que recopilan el uso de vectores híbridos y adenoasociados a pesar de haber demostrado ser una buena alternativa al sobrepasar la placa mucociliar y lograr una buena transfección celular (Mitomo *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2002; Cooney *et al.*, 2015).

Por consiguiente, resulta pertinente realizar una revisión que reúna los aspectos más representativos de los avances en el uso de vectores virales, no virales e híbridos en la terapia génica aplicada a la FQ entre los años 1990 a 2022 publicados en bases de datos indexadas y revistas científicas como lo son Scopus, Pubmed, Sciencedirect, Springer, Scielo y Nature. Para presentar una perspectiva general de las ventajas y limitaciones de cada vector mientras se discute brevemente las vías de administración y formas farmacéuticas empleadas. Para finalmente, presentar el panorama actual de la FQ en Colombia y el mecanismo legal para acceder a la terapia génica en el país.

## 2. Problema de investigación

Con el descubrimiento del gen CFTR en 1989, causante de la FQ, se han establecido diversas terapias con el fin de reducir la sintomatología y complicaciones asociadas a la patología (Cooney *et al.*, 2018). No obstante, la FQ al ser una enfermedad multiorgánica que se caracteriza principalmente por generar un deterioro progresivo en la fisiología pulmonar, aún continúa siendo difícil de tratar puesto que, además de ser una enfermedad huérfana; los tratamientos existentes están enfocados en mejorar la sintomatología y no en atacar la causa de la misma (Cooney *et al.*, 2018). En éste orden de ideas, una de las terapias farmacológicas que ha obtenido buenos resultados son los fármacos CFTR moduladores, sin embargo, estos medicamentos no son una opción funcional para todos los pacientes debido a que no son útiles para todas las mutaciones que presenta el gen. Es por esto que aún se continúa con la búsqueda de una terapia eficaz que mejore la calidad de vida de los pacientes ó que cure ésta enfermedad (Jaffé *et al.*, 1999). A partir de ésto y con el avance de la investigación y la implementación de terapias avanzadas, la terapia génica surge como una opción funcional para cualquier tipo de mutación que presente el gen CFTR (Bandara *et al.*, 2021) y en la actualidad se adelantan ensayos clínicos de fase I y II.

En Colombia aún no están aprobados los CFTR moduladores (Invima, 2019) y con base en la revisión bibliográfica realizada, no se encuentra fácilmente un documento actualizado en el país que proporcione información relacionada con los costos de la enfermedad, la tasa de incidencia, tipos de tratamiento, los avances de las terapias avanzadas en éste campo con sus ventajas y limitaciones; así como la vía legal para acceder a la terapia génica.

### **3. Pregunta de investigación**

Considerando la problemática expuesta anteriormente, se evidencia la necesidad de realizar una investigación bibliográfica que proporcione información acerca de terapias no convencionales que sean capaces de proporcionar un tratamiento para la FQ y que vayan más allá de subsanar la sintomatología. Con base en lo anterior, surge el interrogante: ¿Es la terapia génica un buen tratamiento para curar la fibrosis quística? y en caso de ser afirmativo, ¿cuál podría ser el vector más adecuado para su implementación en la práctica clínica?.

## 4. Justificación

En la actualidad no existe una cura para la FQ y los tratamientos están dirigidos a controlar la sintomatología y reducir la incidencia en las complicaciones (Jarvis, 2020). Sin embargo, dichos tratamientos resultan ser ineficaces cuando la FQ se encuentra en un estadio agravado; teniendo como única alternativa el trasplante de pulmón (Jarvis, 2020). Pese a esto, con la terapia génica, al tratar la enfermedad desde su causa, se podría prevenir el deterioro agravado de los pulmones y la incidencia de infecciones bacterianas, lo que disminuiría la cantidad de tejido cicatrizal en estos órganos, preservando su funcionalidad (Jarvis, 2020).

Aunque la investigación de la industria farmacéutica a nivel internacional ha estado centrada en enfermedades con una alta tasa de incidencia, con la pérdida de algunas patentes y el fortalecimiento del mercado de medicamentos genéricos se ha producido un cambio gradual en el enfoque de las empresas farmacéuticas hacia “la caza de nichos”, entre los que se encuentran los medicamentos huérfanos, como resultado del interés de las compañías farmacéuticas por reducir el impacto de la pérdida de ingresos causado por el vencimiento de patentes (Sharma *et al.*, 2010) a través de una alta cantidad de incentivos y beneficios otorgados por agencias regulatorias de referencia internacional como la EMA (Agencia Europea de Medicamentos), FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos) y PMDA (Agencia de Productos Farmacéuticos y Dispositivos Médicos) como la exclusividad de mercado, procesos de aprobación ágiles, reducción de tarifas, entre otros (Sharma *et al.*, 2010). En Colombia, con la implementación de ley 1392 de 2010 se evidencian este tipo de iniciativas al fomentar la investigación científica para el desarrollo de terapias para el tratamiento de enfermedades huérfanas (Ley 1392, 2010).

Bajo este marco normativo y con el surgimiento de la terapia génica como una alternativa funcional para cualquier tipo de paciente, a diferencia de las terapias farmacológicas convencionales para el tratamiento de la FQ, se han logrado obtener resultados clínicos estadísticamente significativos por medio del uso de vectores virales, no virales, y más recientemente, vectores híbridos, con los cuales se ha buscado combinar las mejores propiedades de los vectores víricos y no virales para superar sus limitaciones y con ello reducir la inmunogenicidad, aumentar el tropismo celular, mejorar la capacidad de transfección y hacer más duradera la expresión génica; permitiendo evidenciar y probar que la investigación de la terapia génica para la búsqueda de un tratamiento para la FQ es altamente prometedor.

## 5. Objetivos

### *5.1 Objetivo general*

Realizar una revisión bibliográfica entre los años 1990 y 2022 con énfasis en los vectores empleados en terapia génica para el tratamiento de fibrosis quística, resaltando el uso de vectores híbridos, virales y no virales.

### *5.2 Objetivos específicos*

Describir los tipos de vectores empleados en terapia génica para el tratamiento de fibrosis quística abarcando ventajas y limitaciones de cada uno de ellos.

Presentar las formas farmacéuticas y vías de administración empleadas para la entrega de vectores en terapia génica para el tratamiento de fibrosis quística.

Determinar el vector más prometedor para la terapia génica en el tratamiento de la fibrosis quística con base en la eficacia clínica, otorgando una descripción del proceso de manufactura.

## 6. Marco teórico

### 6.1 Generalidades de terapia génica

La terapia génica puede ser definida como la inserción, modificación o eliminación del material genético para tratar una enfermedad, mejorar y/o controlar el estado clínico de un paciente (Wu, Chaudhary & Mahato, 2019). No obstante, su implementación en la práctica clínica es limitada debido a la baja eficiencia de transducción, expresión génica transitoria y la poca estabilidad del material genético desnudo (molécula hidrófila con carga negativa) (Thapa & Narain, 2016). Razón por la cual resulta útil administrar éste tipo de moléculas por medio de vectores sintéticos, biológicos ó híbridos que otorguen la capacidad de atravesar membranas biológicas de manera efectiva y mejoren la estabilidad (Thapa & Narain, 2016). Además, la gran variedad de virus y materiales existentes para el transporte de material genético brinda la posibilidad de elegir o crear diversos sistemas de vectores que satisfagan las necesidades de transfección y expresión génica, mientras se considera el blanco celular, la fisiopatología de la enfermedad, tropismo celular, manufactura y baja inmunogenicidad (Thapa & Narain, 2016).

Contemplando lo anterior, la FQ al tratarse de una enfermedad provocada por la mutación de un solo gen, resulta ser un modelo ideal para la terapia génica, haciendo de ésta una opción funcional para cualquier paciente independientemente de la mutación que presente el gen (Bandara *et al.*, 2021). Estimándose, que la corrección de solo uno de los dos alelos CFTR es suficiente para revertir la enfermedad (Villate-Beitia *et al.*, 2017) y que la expresión correcta del 5 al 15% del conductor proteico CFTR en las células epiteliales puede mejorar el transporte de los iones cloruro (Villate-Beitia *et al.*, 2017). Lo que permite inferir que un nivel modesto de expresión transgénica, puede brindar una respuesta clínica significativa (Bandara *et al.*, 2021; Dorin *et al.*, 1996; Ramalho *et al.*, 2002).

Aunque en la actualidad la terapia génica presenta limitaciones en términos de acceso, manufactura, seguridad, control de calidad, entre otros; ha permitido visualizar enfermedades que antes se consideraban incurables por medio de terapias convencionales en enfermedades tratables que incluso podrían llegar a ser curadas (Jaffé *et al.*, 1999). Es por esto que con la implementación de la terapia génica para el tratamiento de la FQ, se busca reducir los costos directos e indirectos de la enfermedad al disminuir los ingresos hospitalarios, el uso de medicamentos y tiempo médico mientras se mejora la calidad y esperanza de vida de los pacientes (Jaffé *et al.*, 1999).

## 6.2 Fisiopatología de la fibrosis quística

La FQ es una enfermedad monogénica autosómica recesiva provocada por la mutación del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), proteína que controla el transporte del cloro, agua, bicarbonato y otros canales iónicos relacionados con la secreción celular (Burney & Davies, 2012), como el canal de sodio sensible a la amilorida (EnaC), que puede disminuir la función mitocondrial y la inmunidad innata como resultado de una inflamación incontrolada generada por infecciones bacterianas crónicas (Rang, Kotsimbos & Wilson, 2020).

Se ha identificado que ésta enfermedad reduce la expectativa de vida de los pacientes a 33,4 años aproximadamente (Villate-Beitia *et al.*, 2017) y es la causa de muerte prematura del 90% de las personas que padecen esta enfermedad (Burney & Davies, 2012). En la actualidad, afecta alrededor de 70.000 personas a nivel mundial, presentando diferentes tasas de incidencia dependiendo de la procedencia étnica (Yan, McCray Jr, & Engelhardt, 2019), para ilustrar lo anterior, los caucasicos tienen una tasa de incidencia de 1 por cada 3000 a 4000 nacidos vivos, en afroamericanos de 1 por cada 15.000 a 20.000 nacidos vivos y finalmente, los latinoamericanos tienen una incidencia de 1 por cada 4.000 a 10.000 nacidos vivos (Sanders & Fink, 2016).

A nivel fisiológico, la FQ provoca un desequilibrio iónico por el aumento en la absorción del sodio que deshidrata la superficie de las vías respiratorias y aumenta la viscosidad del moco, lo que evita su drenaje a nivel celular y afecta los mecanismos de aclaramiento mucociliar (Burney & Davies, 2012). Lo anterior, causa una respuesta inflamatoria anormal al dificultar la eliminación de las bacterias inhaladas y degradar el tejido pulmonar; provocando así, insuficiencia respiratoria y un mayor riesgo de infecciones (Burney & Davies, 2012). Sin embargo, ésta enfermedad no solo se limita al tracto respiratorio sino también puede afectar el tracto digestivo, páncreas, sistema reproductor e hígado (Burney & Davies, 2012).

La mutación del gen CFTR puede traducirse en la ausencia, incorrecto funcionamiento o producción parcial del regulador proteico; siendo los fármacos CFTR moduladores una de las terapias más alentadoras para tratar la enfermedad puesto que corrigen el mal funcionamiento y/o mejoran la producción de éste regulador, favoreciendo la eliminación de la mucosidad pulmonar (Villate-Beitia *et al.*, 2017). No obstante, estos medicamentos no son efectivos para aquellos pacientes que presentan una ausencia total de la proteína CFTR (Villate-Beitia *et al.*, 2017) y sus indicaciones no incluyen la corrección de los daños tisulares y las exacerbaciones de infecciones causadas por la enfermedad (Jarvis, 2020).

### 6.3 Mutaciones del CFTR en la fibrosis quística

Se han reportado aproximadamente 2000 mutaciones en el gen CFTR ubicado en el cromosoma 7 (Velino *et al.*, 2019), siendo la mutación F508 (clase II) la de mayor prevalencia al estar presente en el 60% de los pacientes con FQ (Montier *et al.*, 2004). Las mutaciones del CFTR se han agrupado en un sistema de clasificación dependiendo de los efectos sobre la expresión y funcionamiento del regulador proteico (Montier *et al.*, 2004), presentándose en la actualidad 6 tipos de mutaciones:

Las mutaciones clase I que están relacionadas con un defecto en la producción o síntesis de la proteína debido a la presencia de codones de parada prematuros en el proceso de traducción, que van a causar una expresión ausente o reducida del CFTR (Montier *et al.*, 2004; Veit *et al.*, 2016; CFF, sf).

Las mutaciones de clase II, causan un defecto en la maduración proteica como resultado del mal plegamiento de la proteína CFTR, generando una reducción en la disponibilidad del regulador en la superficie celular (Montier *et al.*, 2004; Veit *et al.*, 2016; CFF, sf).

En las mutaciones clase III, el CFTR alcanza la superficie apical de la célula pero presenta alteraciones en la regulación de los canales de cloro, causando un bloqueo o apertura reducida de éste canal como resultado de la disminución de la unión de ATP (Montier *et al.*, 2004; Veit *et al.*, 2016; CFF, sf).

Las mutaciones clase IV son conocidas por causar defectos en la conductancia de los canales de cloro provocando un transporte de cloro reducido, a pesar de que el CFTR se expresa correctamente en la superficie celular (Montier *et al.*, 2004; Veit *et al.*, 2016).

Las mutaciones clase V son causadas por la sustitución de aminoácidos o el empalme alternativo en el proceso de transcripción del CFTR (Montier *et al.*, 2004; Veit *et al.*, 2016). En consecuencia, la cantidad del regulador proteico en la superficie celular es reducida. Causando una deficiencia en el transporte del cloro a nivel celular que está relacionada con la disponibilidad y defectos en la maduración del CFTR (Montier *et al.*, 2004; Veit *et al.*, 2016).

Por otra parte, las mutaciones clase VI van a alterar la estabilidad conformacional del regulador proteico maduro, causando un recambio acelerado de la membrana plasmática, que induce la degradación lisosomal de CFTR (Montier *et al.*, 2004; Veit *et al.*, 2016).

Finalmente, cabe resaltar que a partir del año 2016, Boeck y Amaral introdujeron dos nuevos tipos de clasificación, incluida la clase VI y la clase VII, en las cual la ausencia de la proteína no puede ser recuperada por medios farmacológicos tradicionales, por lo que se apunta a canales aniónicos alternativos no CFTR (Velino *et al.*, 2019, Boeck & Amaral, 2016).

#### 6.4 Blanco y heterogeneidad celular

Los avances científicos en la terapia génica para el tratamiento de la FQ han estado enfocados en células somáticas diferenciadas, siendo más específicos, células del epitelio respiratorio (Nayerossadat *et al.*, 2012). En éste sentido, la frecuencia y dosis de administración de los vectores son factores que deben contemplarse al momento de implementar éste tipo de terapias (Van Haasteren *et al.*, 2018). Considerando lo anterior, se ha estimado que la vida útil de las células traqueales y pulmonares es de 6 y 17 meses respectivamente (Van Haasteren *et al.*, 2018). Si bien, ésta estimación ha sido evaluada en ratones, la similitud a nivel fisiológico, anatómico e histológico permite hacer una correlación del modelo animal con el humano y predecir los valores aproximados de la tasa de recambio y vida útil celular (Van Haasteren *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2019).

En ese mismo contexto, la cantidad de células requeridas para lograr una transducción que traiga consigo beneficios clínicos sigue siendo controversial, dado que las células del epitelio respiratorio están en constante recambio (Van Haasteren *et al.*, 2018). En el caso de la FQ, lo ideal sería transfectar las células madre del epitelio pulmonar con el objetivo de transferir el material genético a las células hijas y con ello lograr un tratamiento persistente (Van Haasteren *et al.*, 2018). No obstante, el riesgo subyacente radica en la posibilidad de generar teratomas derivado al uso de vectores integrantes de ADN viral o recombinante en el material genético del huésped, trayendo como consecuencia mutagénesis por inserción. Adicionalmente, puede desregular los oncogenes o genes supresores de tumores causando una proliferación celular incontrolada o cáncer (Kustikova *et al.*, 2010; Ranzani *et al.*, 2013).

Por otra parte, la alta heterogeneidad celular de las vías respiratorias dificulta la fijación del blanco celular más idóneo en la FQ (Davis & Wypych, 2021). Actualmente se han identificado casi 2000 variantes de CFTR (Yan *et al.*, 2019), como resultado de la heterogeneidad del fenotipo, función y ubicación de las células que expresan esta proteína al contemplar células caliciformes, ciliadas, no ciliadas y células basales e intermedias del epitelio respiratorio (Jiang & Engelhardt, 1998). En síntesis, la heterogeneidad es el resultado de las diversas líneas celulares presentes en el tracto respiratorio y de las diferentes mutaciones que puede presentar el CFTR (Jiang & Engelhardt, 1998). Siendo las

células epiteliales no ciliadas, en especial los ionocitos, las que presentan una mayor expresión del regulador proteico (55% del total de transcripciones de CFTR detectadas) en comparación con la células ciliadas y caliciformes cuya expresión puede ser imperceptible (Davis & Wypych, 2021; Jiang & Engelhardt, 1998). Es por esto que hoy en día las células ionocíticas son consideradas como un blanco prometedor al momento de implementar terapias avanzadas para la FQ en la práctica clínica (Davis & Wypych, 2021).

Con base en lo anterior, la mayor limitación para implementar la terapia génica para el tratamiento de la FQ en la práctica clínica está enmarcada por la falta de un sistema de administración eficaz que llegue directamente a pulmones, junto con la heterogeneidad de expresión del CFTR a nivel celular que pone en tela de juicio cuál es el "drug target" o blanco celular más apropiado para este tipo de terapia (Allan *et al.*, 2021).

### 6.5 Internalización celular

Con el fin de desarrollar vectores más eficientes para la entrega de material genético a las células diana, se ha hecho un esfuerzo considerable por estudiar los mecanismos de inserción como la endocitosis y el tráfico celular (Ziello *et al.*, 2010). No obstante, en la actualidad no se conocen completamente éstos mecanismos, siendo esta una limitante en el desarrollo de los vectores (Ziello *et al.*, 2010).

A partir de esto, se ha identificado que la internalización celular del vector se lleva a cabo bajo la fusión directa con la membrana celular o por endocitosis mediada por receptores, a través de fosas cubiertas de clatrina, caveolas y/o balsas lipídicas (Ziello *et al.*, 2010). Una vez el vector ha ingresado a la célula, las partículas endocitadas se retienen en los endosomas tempranos, en donde se van a clasificar las sustancias que serán enviadas de regreso a la membrana plasmática y las que serán degradadas en el lisosoma (Klink *et al.*, 2001; Ziello *et al.*, 2010; Durymanov & Reineke, 2018). De este modo, los vectores al ser agentes biológicos, suelen ser degradados por medio de enzimas catabólicas hidrolíticas (pasando por el endosoma temprano, tardío y finalmente por la degradación lisosomal); por lo que requieren de sistemas de administración que tengan la capacidad de escapar o evadir los endosomas para finalmente llegar al núcleo (Klink *et al.*, 2001; Ziello *et al.*, 2010; Durymanov & Reineke, 2018). Para ello, se ha descrito el uso de algunos agentes farmacológicos que interrumpen el enrutamiento de la vía previamente descrita (como la cloroquina), por medio del cambio del pH del endosoma ó la desestabilización de su membrana lo que puede atenuar o evitar la degradación (Klink *et al.*, 2001; Ziello *et al.*, 2010; Durymanov & Reineke, 2018). Finalmente, una vez el material genético está libre en el

citoplasma, éste se inserta por medio de transporte activo a través de los poros nucleares o durante la mitosis, cuando la membrana nuclear desaparece (Montier *et al.*, 2004).

## 6.6 Barreras anatómicas

La aplicación de la terapia génica para el tratamiento de la FQ ha estado limitada por las barreras anatómicas naturales y fisiopatológicas que causa la enfermedad, como la heterogeneidad celular pulmonar y la presencia de moco hiperviscoelástico que induce la degradación de los vectores y evita la internalización celular del material genético a las células (Villate-Beitia *et al.*, 2017). El moco al ser altamente adhesivo en las vías respiratorias es considerado como la principal barrera anatómica al generar una densa red de fibras de mucina compuesta por glicanos cargados negativamente que se intercalan con regiones hidrófobas, las cuales, junto con la estrecha unión de las células epiteliales alveolares, impide la llegada de los vectores a los receptores, su internalización celular y por ende, la expresión del material genético (Villate-Beitia *et al.*, 2017).

Por consiguiente, el aclaramiento mucociliar reducido provocado por la FQ incrementa la cantidad de macrófagos y de procesos fagocíticos en los pulmones como consecuencia de la acumulación de moco que reduce la biodisponibilidad de los vectores en las vías respiratorias como resultado de la eliminación de éste material (Xu *et al.*, 2021).

Por otra parte, el volumen de disolución disponible en los pulmones al ser reducido puede limitar la dosis de administración del vector (Xu *et al.*, 2021). Se estima que el volumen total del líquido que recubre los pulmones es de 10 a 30 mL, sin embargo, es difícil calcular la proporción de este volumen que entra en contacto con las partículas de aerosol y por ende la disolución de las mismas (Xu *et al.*, 2021). Es decir que las partículas no disueltas difícilmente son absorbidas, se eliminan rápidamente y pueden ser fagocitadas por macrófagos, lo que podría llegar a disminuir la biodisponibilidad del vector y por ende, su efecto terapéutico (Xu *et al.*, 2021).

Finalmente, es necesario destacar la importancia de la geometría pulmonar y la humedad relativa (aproximadamente 90%) (Xu *et al.*, 2021) al momento de diseñar la forma farmacéutica de tal manera que se garantice una correcta liberación y estabilidad del vector en el tracto respiratorio (Xu *et al.*, 2021).

### *6.7 Mutaciones de CFTR y medicamentos CFTR moduladores*

Las terapias con medicamentos moduladores CFTR tienen como objetivo potencializar, estabilizar, amplificar y corregir la función del regulador proteico (Bergeron & Cantin, 2021). No obstante, la eficacia de la terapia está limitada a un tipo de mutación específica y la farmacodinamia puede ser variable incluso en pacientes con un mismo genotipo y clase de mutación (Bergeron & Cantin, 2021). Es por ésto que mutaciones clase II como la R560 no responde a ningún medicamento modulador actualmente disponible, pero mutaciones de ésta misma clase como la Phe508 pueden corregirse con una combinación de medicamentos correctores y potenciadores, que hasta el día hoy son los dos tipos de CFTR moduladores aprobados para el uso clínico (Boeck & Amaral, 2016, Gbian & Omri, 2021; Bergeron & Cantin, 2021).

Considerando lo anterior, los medicamentos potenciadores cómo el ivacaftor, están dirigidos a aquellos pacientes con mutaciones de clase III y IV debido a que van a aumentar la apertura del canal CFTR para permitir el flujo de cloruro (Gbian & Omri, 2021). Por otra parte, los medicamentos correctores como el lumacaftor, tezacaftor y elexacaftor, permiten que las proteínas CFTR mejoren su procesamiento y se transporten a la membrana celular (Gbian & Omri, 2021; Bergeron & Cantin, 2021). Del mismo modo, la combinación de éstos medicamentos (potenciadores y correctores) han demostrado ser más eficaces que la monoterapia debido a que incrementan la cantidad de proteína expresada y mejoran la función del CFTR, siendo apropiado su uso para pacientes con mutaciones clase II (Gbian & Omri, 2021; Bergeron & Cantin, 2021).

Sumado a lo anterior, se ha identificado que los CFTR moduladores pueden generar beneficios adicionales en la salud de los pacientes con FQ, como lo son: la mejora de la tolerancia a la glucosa cuando se hace uso de la terapia combinada con lumacaftor-ivacaftor y un aumento del peso con el uso del ivacaftor, como resultado de la reducción en la inflamación intestinal que incrementa la absorción de las grasas (Gbian & Omri, 2021). No obstante, se deben contemplar los efectos secundarios de éste tipo de medicamentos y sus consideraciones de uso debido a que puede afectar negativamente la vida del paciente. Un ejemplo de lo anterior, es la disfunción pulmonar y el aumento de las exacerbaciones de las infecciones pulmonares por la suspensión abrupta de la administración del ivacaftor después de su uso prolongado (Gbian & Omri, 2021); y el riesgo de interacciones farmacocinéticas durante su metabolismo al ser sustrato del CYP450, lo que puede provocar una disminución en su concentración y efecto terapéutico, causando incluso síntomas de abstinencia (Gbian & Omri, 2021).

## 7. Metodología

### 7.1. Tipo de estudio

Revisión bibliográfica descriptiva en torno a la fibrosis quística.

### 7.2 Criterios de inclusión

**Tabla 1. Criterios de inclusión de los referentes teóricos.**

Criterios de inclusión
<ul style="list-style-type: none"><li>- Bibliografía posterior al año 1990.</li><li>- Idiomas inglés y español.</li><li>- Aplicación de la terapia génica a trastornos o patologías a las enfermedades obstructivas de las vías respiratorias</li><li>- Aplicación de la terapia génica a la fibrosis quística con vectores híbridos, virales y no virales.</li><li>- El uso de vectores híbridos, virales o no virales para la entrega de material genético que conduzca a la expresión del conductor proteico CFTR.</li><li>- Documentos en los que en su resumen, título o palabras clave incluyan las palabras "cystic fibrosis", "gene therapy", "cystic fibrosis pathophysiology", "CFTR mutations", "cellular heterogeneity", "anatomical barriers", "non-viral vectors", "hybrid viral vectors", "adeno-associated virus", "adenoviral", "chimeric vectors", "nanoparticles", "retroviral", "lentiviral", "cationic polymers", "liposomes", "niosomes", "fibrosis quística", "fibrosis quística en Colombia", "enfermedad huérfana", "incidencia", "epidemiología", "tratamiento", "costos" y "CFTR moduladores".</li></ul>

### 7.3 Criterios de exclusión

**Tabla 2. Criterios de exclusión de los referentes teóricos**

Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"><li>- Bibliografía previa al año 1990.</li><li>- Idiomas diferentes al inglés y el español.</li><li>- Aplicación de la terapia génica a trastornos o patologías diferentes a las enfermedades obstructivas de las vías respiratorias</li><li>- Aplicación de la terapia génica a enfermedades distintas a la fibrosis quística con vectores híbridos, virales y no virales.</li><li>- El uso de vectores híbridos, virales o no virales diferente a la entrega de material genético que conduzca a la expresión del conductor proteico CFTR.</li><li>- Documentos en los que en su resumen, título o palabras clave no posean las palabras "cystic fibrosis", "gene therapy", "cystic fibrosis pathophysiology", "CFTR mutations", "cellular heterogeneity", "anatomical barriers", "non-viral vectors", "hybrid viral vectors", "adeno-associated virus", "adenoviral", "chimeric vectors", "nanoparticles", "retroviral", "lentiviral", "cationic polymers", "liposomes", "niosomes", "fibrosis quística", "fibrosis quística en Colombia", "enfermedad huérfana", "incidencia", "epidemiología", "tratamiento", "costos" y "CFTR moduladores".</li></ul>

### 7.4 Metodología de búsqueda de la literatura

Para la búsqueda y recolección de información a nivel internacional se hizo uso de la base de datos Scopus, la cual integra publicaciones de otras bases de datos y revistas indexadas como Pubmed, Sciencedirect, Springer y Nature. El diseño de ecuaciones de búsqueda se realizó teniendo en cuenta palabras claves y MeSH como "cystic fibrosis", "gene therapy", "cystic fibrosis pathophysiology", "airways diseases", "CFTR mutations", "cellular heterogeneity", "anatomical barriers", "non-viral vectors", "hybrid viral vectors", "adeno-associated virus", "adenoviral", "chimeric vectors", "nanoparticles", "retrovirals", "lentivirus", "cationic polymers", "lipid-based nanoparticles", "liposomes", "niosomes" y

“hybrid nanoparticles”. Con el objetivo de limitar y hacer más específica la búsqueda y relacionar los términos MeSH, se empleó el operador booleano AND entre cada término. Los criterios de exclusión se basaron en la fecha de publicación de las referencias bibliográficas (1990 a 2022) (PUB YEAR>1990), el idioma (inglés) ((LIMIT-TO (LANGUAGE))) y la inclusión de las palabras clave en el título o abstract de los artículos científicos (TITLE-ABS). También, se excluyeron aquellos artículos en los que se hacía uso de la terapia génica para el tratamiento de enfermedades diferentes a la FQ ó que hacían uso vectores para el transporte de agentes terapéuticos diferentes al material genético. Cabe resaltar que las búsquedas mencionadas anteriormente se efectuaron en inglés, puesto que es el idioma que unifica la ciencia.

Para la recolección de la información a nivel nacional y de latinoamérica se hizo uso de la base de datos Scielo, los datos reportados por el Instituto Nacional de Salud (INS), Invima, Ministerio de Salud y Protección Social (MSPS) y publicaciones de universidades nacionales, empleando para ello el idioma inglés y español; y palabras claves como “fibrosis quística”, “fibrosis quística en Colombia”, “enfermedad huérfana”, “incidencia”, “epidemiología”, “tratamiento”, “costos” y “CFTR moduladores”.

Cabe resaltar que parte de la información fue extraída de organizaciones e instituciones especializadas en la fibrosis quística como la Fundación Colombiana para Fibrosis Quística, el Servicio Nacional de Salud de Reino Unido (NHS) y la Cystic Fibrosis Foundation de Estados Unidos.

### *7.5 Selección de la literatura*

La selección de información se realizó con base a los criterios de inclusión y exclusión previamente descritos para posteriormente realizar su respectivo análisis y clasificación, considerando el tipo de vector (virales, no virales e híbridos). Cabe destacar que durante el desarrollo de la monografía se llevaron a cabo revisiones periódicas de la literatura con el objetivo de mantener actualizada la información hasta culminar el estudio.

### *7.6 Recolección de datos*

Para recolectar la información referente al ámbito legal de la FQ en Colombia se solicitó información de las tutelas interpuestas en Colombia entre el año 1991 al 2022 relacionadas con la FQ y se contactó entidades estatales como la Defensoría del Pueblo, la Corte Constitucional y el MSPS haciendo uso del derecho a la información establecido en la Ley 1712 de 2014.

## 8. Resultados

### *8.1 Enfoque actual de la terapia génica de la fibrosis quística*

Hace unos años, la terapia génica para la FQ estaba enfocada exclusivamente en mejorar la función del regulador CFTR por medio de la corrección de las irregularidades en el transporte de cloro (Jiang & Engelhardt, 1998). No obstante, la fisiopatología de la enfermedad ha demostrado presentar una relación entre las anomalías del CFTR con las de otros canales de conductancia de membrana apical como lo son ENaC y ORCC (canal de cloruro rectificador hacia el exterior), que son indispensables para la circulación de fluidos en el tracto respiratorio (Jiang & Engelhardt, 1998).

Aunque la terapia génica no puede reparar el daño orgánico que ha causado la FQ, se ha demostrado que podría reducir los síntomas y evitar el progreso del daño tisular. Éste tipo de terapias se podrían abordar por medio de 3 enfoques: la terapia génica integradora, no integradora y terapia de ARN (CFF, sf). La terapia génica integradora, tal como su nombre lo indica, va a incorporar una versión correcta del gen CFTR a las células, haciendo que su copia quede permanentemente en el genoma, generando un efecto terapéutico prolongado. Sin embargo, la falta de control del lugar de integración del gen CFTR en el genoma puede causar mutagénesis y desarrollo de cáncer (CFF, sf).

Por otra parte, la terapia génica no integradora va a proveer un fragmento de ADN con una copia correcta de CFTR que no se integra al genoma pero permite que las células utilicen ese gen para producir proteínas (CFTR) normales (CFF, sf). No obstante, el efecto de éste tipo de terapias va estar limitado a semanas o meses, por lo que los pacientes deberán ser tratados repetidamente para obtener un resultado eficaz (CFF, sf).

Finalmente, la terapia de ARN va a proveer directamente segmentos de ácido ribonucleico a las células, por lo que no va a producir una alteración del genoma y va a facilitar el control de la dosis (CFF, sf). Sin embargo los efectos de este tipo de terapias suelen permanecer solo por una o dos semanas, por lo que el paciente debe exponerse a la administración de repetidas dosis (CFF, sf).

Dicho lo anterior, hasta la fecha la terapia génica aplicada a la FQ ha hecho uso de vectores víricos, no virales (sintéticos) e híbridos para proveer material genético que conduzca a la producción de la proteína CFTR.

## 8.2 Vectores víricos

Los vectores víricos son sistemas de virus modificados que sirven como vehículo para la entrega eficiente de material genético como ADN y ARN (Capra *et al.*, 2021). En el caso de la FQ, se han utilizado numerosos sistemas de vectores con el objetivo garantizar una entrega eficiente de genes a las vías respiratorias, siendo los más prometedores los vectores virales que incluyen los retrovirus, lentivirus, adenovirus (Ad) y virus adenoasociados (AVV) (Yan *et al.*, 2019).

### 8.2.1 Retrovirales

Los retrovirus son virus de ARN envueltos que contienen dos copias de un genoma de ARN monocatenario de entre 7 y 10 kb, capaces de transfectar células en división e integrarse al genoma del hospedador. Por lo tanto, pueden producir una expresión transgénica estable a largo plazo en células en división con bajo potencial inmunogénico (Wu, Chaudhary y Mahato, 2019; Johnson, 2001). No obstante, una desventaja significativa de éste vector es la integración aleatoria de ADN en el genoma del huésped, generando un riesgo elevado de mutagénesis por inserción; y la producción de títulos bajos en la transferencia de genes a los epitelios de las vías respiratorias como consecuencia de la inactivación de los virus por el sistema del complemento (Wu, Chaudhary y Mahato, 2019; Johnson, 2001).

### 8.2.2 Lentivirus

Los lentivirus en la actualidad son considerados como sistemas prometedores para la terapia génica debido a que proporcionan una expresión sostenida y cuentan con la capacidad de transfectar tanto células que no conservan su capacidad para dividirse (Cooney *et al.*, 2018) como células progenitoras que van a transferir el gen a las células hijas (Yan *et al.*, 2019). Este tipo de virus resulta ser versátil ya que permite realizar procesos de pseudotipificación, otorgando la posibilidad de eliminar las glicoproteínas de la envoltura nativa y proveer una envoltura heteróloga que da paso a modificar la inmunogenicidad y capacidad de transfección por medio del uso de diversas glicoproteínas virales, siendo esta una herramienta que permite modular el tropismo viral (Cooney *et al.*, 2021). El uso de retrovirus, lentivirus y gammaretrovirus ha sido efectivo para la pseudotipificación debido a que son altamente permisivos al momento de incorporar glicoproteínas de unión heteróloga (Steeds *et al.*, 2020; Waehler *et al.*, 2007).

Los virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1) y de la inmunodeficiencia felina (VIF) son algunos de los lentivirus que más se han utilizado en las vías respiratorias (Loza *et al.*, 2021). La mayoría de estos vectores están pseudotipados con glicoproteínas del virus de la

estomatitis vesicular (VSV-G) puesto que tienen un alto tropismo celular y ofrece ventajas en la producción al facilitar la concentración y purificación de vectores por centrifugación (Mitomo *et al.*, 2010). No obstante las glicoproteínas de los filovirus, baculovirus, influenza y virus sendai también confieren un tropismo apical mejorado (Loza *et al.*, 2021).

Un ejemplo de lo anterior, fue el desarrollo de un vector lentiviral (F/HN-VIS) derivado del virus de la inmunodeficiencia de los simios (VIS) pseudotipificado con proteínas de envoltura del virus sendai (Sev), hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y proteínas de fusión (F) para mediar la unión entre el vector y la célula diana; lo que brindó una expresión citoplasmática en las células del tracto respiratorio del vector y eliminó las limitaciones causadas por la membrana nuclear (Mitomo *et al.*, 2010). Para optimizar el vector, se insertó el tracto central de polipurina (cPPT) y elementos reguladores postranscripcionales del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE), teniendo como resultado una expresión génica sostenida (Mitomo *et al.*, 2010).

Al evaluar la función del vector al cabo de 30 días de la transfección a modelos murinos se identificó que aproximadamente el 69% de la células transfectadas fueron ciliadas y el 7% escamosas (Mitomo *et al.*, 2010). Del mismo modo, se verificó la producción de canales de cloro CFTR funcionales en células embrionarias de riñón humano (HEK 293T), pudiendo concluir que tras la administración del vector con un intervalo de un mes, se logró una expresión génica del 40%, lo que demuestra la eficacia del vector para transferir genes en las vías respiratorias (Mitomo *et al.*, 2010). No obstante, la disminución de la expresión génica en el tiempo y el recambio de las células ciliadas exigen que este tipo de vectores virales sean administrados repetidamente, limitando su aplicación clínica debido a la inmunogenicidad que pueden causar (Mitomo *et al.*, 2010).

Aunque los pseudotipos con las glicoproteínas del virus VSV-G tienen un amplio tropismo por las células de las vías respiratorias, los receptores de VSV-G se encuentran en la parte basolateral de las células, zona de difícil acceso debido a las estrechas uniones celulares, que evitan la entrada de patógenos a los tejidos y dificultan el acceso de los vectores a sus receptores (Cmielewski *et al.*, 2017). A pesar de ello, el uso de lisofosfatidilcolina (LPC) antes de la administración del vector ha demostrado aumentar la permeabilidad transitoria de las uniones celulares y contribuye a solubilizar la mucosidad debido a sus propiedades como surfactante natural (Donnelley & Parsons, 2018).

En un estudio realizado por Cmielewski y colaboradores se evaluó la expresión génica de un vector VIH-1 lentiviral pseudotipado con VSV-G que contenía el gen LacZ (Cmielewski *et al.*,

2017). Dicho vector al ser evaluado en ratones C57Bl con el previo acondicionamiento con LPC, demostró que LPC no solo mejoró la expresión génica de las células ciliadas de la superficie al producir niveles de transducción significativamente más altos en la tráquea de y las vías respiratorias de los ratones con respecto al grupo control; sino que también permitió que los vectores lograran permear la células basales, siendo ésta una posibilidad para transfectar las células madre de la vía respiratoria (Cmielewski *et al.*, 2017). Lo anterior se demuestra bajo el hecho de que pasados 3 meses de la administración del vector, una pequeña porción de células hijas demostró tener una expresión transgénica de LacZ como posible resultado de la rotura de la capa epitelial causada LPC (Cmielewski *et al.*, 2017). No obstante, un grupo de ratones exhibió una breve depresión respiratoria después de la administración de LPC por lo que se debe evaluar los efectos a largo plazo en la función pulmonar del surfactante (Cmielewski *et al.*, 2017).

### 8.2.3 Virus adenoasociados (AAV)

Los AVV son un tipo de parvovirus que requieren de la coinfección de un adenovirus auxiliar para poder llevar a cabo el proceso de replicación (Guggino & Cebotaru, 2017). Una vez el ADN viral monocatenario se ha integrado en el genoma humano, permanece inactivo hasta que la célula huésped es coinfectada con un virus auxiliar que le permite llevar a cabo el ciclo de replicación (Guggino & Cebotaru, 2017).

Los vectores con AAV han liderado importantes estudios en la terapia génica para la FQ debido a que tienen la capacidad de transfectar células diferenciadas que perdieron la facultad de dividirse (Cooney *et al.*, 2018). Además, su ADN al estar recubierto por una cápside da la posibilidad de usar diferentes serotipos de envolturas proteicas que mejoran el tropismo celular y aumentan la estabilidad del material genético, permitiendo así un almacenamiento a largo plazo a baja temperatura y el uso de la ultracentrifugación como método de purificación y concentración del vector (Brommel *et al.*, 2020).

Para que los vectores de AAV sean funcionales deben contar con un plásmido que porte la secuencia codificante para el gen CFTR con repeticiones terminales invertidas (ITR) en sus extremos 5' y 3', un segundo plásmido con los genes rep y cap, y un tercer componente que proporcione la función auxiliar asociada al adenovirus (Guggino & Cebotaru, 2017). Las porciones ITR son indispensables para sintetizar la nueva hebra de ADN al tener función de cebador y poseer un sitio de unión para helicasas y endonucleasas (Martini *et al.*, 2011).

Algunas de las ventajas de éste tipo de vector es que el plásmido lanzadera puede ser modificable, lo que facilita su adaptación e implementación (Brommel *et al.*, 2020). Además,

la coinfección de los virus auxiliares proporciona seguridad al prevenir la propagación inespecífica e inapropiada de los AAV al momento de escalar la terapia a la práctica clínica (Guggino & Cebotaru, 2017). Sumado a lo anterior, los AAV presentan una alta prevalencia en los humanos y no se han asociado con alguna enfermedad conocida (Martini *et al.*, 2011).

Los AAV se caracterizan por tener varios serotipos, uno de los más estudiados en la terapia génica para la FQ es el serotipo dos (AAV2), que logra la internalización celular por medio de la endocitosis en la zona basolateral de las células (Martini *et al.*, 2011). En diferentes estudios preclínicos se ha podido observar que la expresión del CFTR mediada por estos vectores ha sido eficaz hasta 6 meses después de una única administración en monos y conejos (Martini *et al.*, 2011). Por otra parte, un estudio clínico realizado en 12 pacientes con FQ con este vector demostró producir de 0,1 a 0,6 copias de vector por célula cepillada o de penacho al administrar una dosis del vector por vía intranasal (aerosol) (Martini *et al.*, 2011). A pesar de ello, se han identificado anticuerpos neutralizantes AAV2 que junto con las respuestas inflamatorias pueden ser los causantes de la disminución de la transfección y expresión génica, lo que afectaría su eficacia tras la administración repetida del vector (Martini *et al.*, 2011).

Considerando las limitaciones anteriormente mencionadas, se ha optado por hacer uso de otros serotipos como los AAV1, AAV5 y AAV6, que han demostrado tener una mejor capacidad de transfección con respecto a los AAV2 (Martini *et al.*, 2011). El serotipo AAV5 se ha caracterizado por incrementar la entrega de genes hasta 50 veces más que el serotipo AAV2 en el epitelio respiratorio humano, como resultado de una mayor disponibilidad de receptores apicales y por ende un incremento en la afinidad por los mismos (Martini *et al.*, 2011). Agregado a lo anterior, la administración repetida de este serotipo no ha demostrado inducir procesos inflamatorios relevantes, apoptosis o cambios morfométricos en los pulmones, por lo que sería un excelente candidato para la terapia génica (Martini *et al.*, 2011).

Por otra parte, el serotipo AAV6 es prometedor debido a que no se adhiere a la red de mucosa y se difunde rápidamente a través del moco (Duncan *et al.*, 2018). Además, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que presenta una transferencia de genes mayor a los serotipos mencionados anteriormente, incrementa la capacidad de difusión entre 3 a 10 veces en contraste con el AAV1 y no exhibe dificultad para escapar de la degradación proteosomal (Duncan *et al.*, 2018). Es por esto que la aplicación de éste tipo de vectores en ratones de forma inhalada ha conferido hasta un 30% de expresión transgénica en las vías

respiratorias, porcentaje que podría ser comparable al de las células epiteliales respiratorias con el regulador CFTR en la FQ (Duncan *et al.*, 2018).

Aunque los AAV parecían tener un buen pronóstico, han fracasado en el proceso de transición a los estudios clínicos debido a los efectos secundarios significativos, a la falta de eficacia y duración del efecto terapéutico (Donnelley & Parsons, 2018). Además de que cuentan con una capacidad de empaquetamiento de ADN limitada de 4,68 kb (Guggino & Cebotaru, 2017) que conlleva al truncamiento del gen CFTR (Donnelley & Parsons, 2018).

#### 8.2.4 Adenovirus (Ad)

Los adenovirus son virus de ADN lítico, no envueltos que están compuestos por una nucleocápside y un genoma lineal de doble hebra de entre 26 y 45 kb, capaces de infectar células en cualquier estadio del ciclo celular de forma rápida y sin integración en el genoma (Wu, Chaudhary y Mahato, 2019), generando una expresión génica transitoria que requiere de la administración de varias dosis para mantener una producción genética estable (Kushwah *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta lo anterior, este virus ha sido ampliamente empleado como vector en la terapia génica aplicada al tratamiento de la FQ (principalmente los serotipos 2 y 5), debido a su alto tropismo en las vías respiratorias (Cao *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha observado en ensayos clínicos que los Ad suelen inducir respuestas inmunológicas innatas y adaptativas fuertes en los pacientes (inflamación) (Paredes & Fernández, 2002; Cooney *et al.*, 2015), limitando la cantidad y el número de dosis que se puede administrar del vector (Knowles *et al.*, 1995).

En respuesta a las limitaciones mencionadas, se han desarrollado los vectores adenovirales auxiliares dependientes (HD-Ad, por sus siglas en inglés), los cuales eliminan las secuencias de codificación viral y su composición se basa exclusivamente en las secuencias de encapsulación y replicación del genoma del vector; lo que aumenta la capacidad de empaquetamiento genético, prolonga la expresión del transgen y disminuye la respuesta inmunogénica hacia el vector (Kushwah *et al.*, 2008; Rosewell *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2018). Un ejemplo de lo anterior, fue el estudio desarrollado por Cao y colaboradores (2018), en donde se administró un vector de HD-Ad basado en un Ad del serotipo 5 junto con LCP de forma intranasal e instilación broncoscópica directa en ratones y cerdos, detectándose la transducción del vector en su tejido pulmonar. Por otra parte, al evaluar la actividad del vector en cultivos de células basales de las vías respiratorias de pacientes con FQ se evidenció la restauración de la actividad del canal CFTR (Cao *et al.*, 2018).

### 8.3 Vectores no virales

Los vectores no virales son sistemas de administración de genes que utilizan partículas biodegradables sintéticas o naturales para la transferencia de ácidos nucleicos a células por medio de interacciones electrostáticas con el material genético (Shahryari *et al.*, 2021). Cabe resaltar que aunque presentan un perfil de seguridad mayor que los vectores virales al evitar las respuestas inmunológicas graves (Yaniz-Galende & Hajjar, 2014; Shahryari *et al.*, 2021), exhiben una transducción deficiente y una expresión génica transitoria (Yaniz-Galende & Hajjar, 2014).

#### 8.3.1 Nanopartículas

Las nanopartículas (NP) son moléculas entre 1 y 100 nm, compuestas por una capa superficial, un caparazón y un núcleo (Khan, Saeed & Khan, 2019) que se caracterizan por presentar diferentes propiedades de acuerdo al tamaño, material y funcionalización superficial (Najahi-Missaoui *et al.*, 2020). Las NP en la terapia génica para la FQ ofrecen sistemas de entrega basadas en moléculas sintéticas compuestas por materiales biodegradables y biocompatibles como el PLGA (poliláctico-co-glicólico), PBAE (poli  $\beta$ -aminoésteres) y quitosano (Mastorakos *et al.*, 2015). No obstante, al igual que los vectores virales, la expresión génica sostenida se ve obstaculizada por la inestabilidad coloidal del moco y por la dificultad de difusión de los vectores en los fluidos corporales (Mastorakos *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que el uso de NP a base de polímeros catiónicos, indiscriminadamente de su tamaño, tienden a quedar inmobilizados o adheridos en el moco (cargado negativamente) como consecuencia de la carga positiva de su superficie (Mastorakos *et al.*, 2015). Razón por la cual, vectores catiónicos compuestos por polietilenimina y poli L-lisina suelen ser eliminados por el aclaramiento mucociliar (Mastorakos *et al.*, 2015). Considerando lo anterior, se debe procurar que éstos vectores sean lo suficientemente pequeños para difundirse a través de los poros del moco y tengan un rango de tamaño promedio entre 60-300 nm (Mastorakos *et al.*, 2015).

Las NP a base de PBAE han sido de gran interés ya que exhiben una transferencia génica eficiente y específica. No obstante, se ha dificultado la correlación del rendimiento *in vitro* a *in vivo* en vista a las barreras extracelulares y los entornos fisiológicos hostiles (Mastorakos *et al.*, 2015). Las principales limitantes de las NP de PBAE están determinadas por las características fisicoquímicas intrínsecas del material, ya que su naturaleza hidrolítica y baja

densidad de carga positiva reducen la estabilidad de compactación de la NP y el ADN en condiciones fisiológicas, lo que condiciona su uso *in vivo* (Mastorakos *et al.*, 2015).

Es por esto que es indispensable que las NP no solo estén compuestas por materiales estables fisicoquímicamente, sino que también sean biocompatibles y tengan la capacidad de lograr una transferencia génica mejorada (Osman *et al.*, 2018). Con el objetivo de satisfacer las necesidades mencionadas, se han desarrollado vectores a base de péptidos con unión a glicosaminoglicanos que permiten el acople directo con el ADN (Mastorakos *et al.*, 2015). Además, estudios con esputo de pacientes con FQ, han demostrado que la funcionalización de las NP con PEG evita la mucoadhesión e inhibe la agregación de las partículas gracias a su carga neutra que puede aumentar la distancia de difusión entre el 40 y 60% en comparación con NP que carecen de este material (Osman *et al.*, 2018).

En un estudio realizado por Kolonko y colaboradores, se diseñó un sistema de entrega para wtCFTR-mRNA a base de nanocápsulas lipídicas con polielectrolitos de quitosano con el objetivo de mejorar la secreción de cloruro en las células epiteliales (Kolonko *et al.*, 2020). Para ello se diseñaron nanocápsulas compuestas de un núcleo de aceite de quitosano envuelto en lecitina, ensamblados electrostáticamente con el material de transfección por medio de fosfolípidos y tensoactivos (Kolonko *et al.*, 2020). Al evaluar la transfección del vector en la línea celular epitelial bronquial humana de fibrosis quística (CFBE41o) se demostró que se requiere una expresión del 5% del ARNm de wtCFTR para evitar las complicaciones graves relacionadas con la FQ (Kolonko *et al.*, 2020). Obteniendo un autoensamblado con alta eficiencia de transfección y baja toxicidad del ARNm que reduce la inmunogenicidad y aumenta la seguridad al reducir el riesgo de mutagénesis (Kolonko *et al.*, 2020). Por otra parte, al hacer uso de capsaicina se logró aumentar la eficiencia de transfección al inhibir la función de ENaC (reabsorción del sodio) y con ello, el adelgazamiento del moco (Kolonko *et al.*, 2020).

### 8.3.2 Liposomas

Los liposomas son vesículas nano ó micrométricas compuestas por capas de fosfolípidos que facilitan la encapsulación de compuestos hidrofílicos, lipofílicos y anfifílicos (Gbian & Omri, 2021; Bandara *et al.*, 2021). Sus principales ventajas están enmarcadas por la alta capacidad de adoptar diferentes morfologías y composiciones en torno a las moléculas a vehicular, proporcionando excelentes propiedades de envoltura y protección (Bandara *et al.*, 2021; Daraee *et al.*, 2016). Además de que poseen una baja respuesta inmunogénica, una liberación diferenciada (Balazs & Godbey, 2011) y alta captación celular, gracias a la funcionalización con ligandos específicos compatibles con la diana terapéutica a transfectar

(Zylberberg *et al.*, 2017). No obstante, estos suelen tener algunas limitaciones como una baja estabilidad y solubilidad, una deficiente encapsulación de fármacos hidrofílicos, rápida eliminación *in vivo*, dificultad de escalado y alto costo de producción (Bandara *et al.*, 2021; Daraee *et al.*, 2016).

En un estudio clínico fase 2B, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo se administró repetidamente por nebulizador el vector pGM169/GL67A a 130 pacientes durante 12 meses (1 dosis por mes) (Clinical Trials, NCT01621867). El vector al estar compuesto por un lípido catiónico GL67A, facilitó la unión del vehículo al material genético, la protección de carga, la administración por nebulizador e internalización por endocitosis. Generando así, una mejoría en la función pulmonar en comparación con el placebo (Alton *et al.*, 2016).

Cabe resaltar que la descripción del vector y su constructo se describe detalladamente en el apartado 9.2.1, referente al plásmido pGM169 (página 38).

### 8.3.3 Niosomas

Los niosomas son un sistema de administración de fármacos basados en tres componentes principales, un lípido catiónico que es responsable de las interacciones electrostáticas con el material genético cargado negativamente, un surfactante no iónico que mejora la estabilidad a largo plazo del niosoma y un componente auxiliar como el colesterol o PEG, que pueden agregarse para mejorar las propiedades fisicoquímicas y desempeño biológico de la formulación (Al Qtaish *et al.*, 2020). Éstos sistemas al orientarse en bicapas, permiten albergar fármacos lipófilos e hidrófilos en su interior ó atrapar éstos dos tipos de fármacos en un único portador de manera simultánea (Khoee & Yaghoobian, 2017).

En comparación con los liposomas, los niosomas otorgan a la formulación una mayor estabilidad y menor citotoxicidad debido a los componentes auxiliares y tensioactivos no iónicos (Sainz-Ramos *et al.*, 2020).

En un estudio desarrollado por Sainz-Ramos (2020), se hizo uso del vector N3/pGM169 compuesto por DTPA (Dietilentriaminopentaacetato) (lípido catiónico), poloxámero 407 (surfactante no iónico), cloroquina (componente auxiliar) y el plásmido pGM169 marcado con GFP, el cual fue probado en células epiteliales de las vías respiratorias derivadas de pacientes con FQ (Sainz-Ramos *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos a partir del estudio demostraron un aumento en los niveles de expresión de la proteína CFTR y un incremento del 55% de la funcionalidad del canal del cloro, que según la literatura, superaría

ampliamente los valores necesarios para proporcionar beneficios terapéuticos (5%) (Dorin *et al.*, 1996; Sainz-Ramos *et al.*, 2020; Kolonko *et al.*, 2020).

#### 8.4 Vectores híbridos

Con el objetivo de superar las limitaciones de los vectores víricos y sintéticos asociadas a la genotoxicidad y el perfil de la expresión transgénica en trabajos de Johnson (2001), Mitomo *et al.* (2010), Martini *et al.* (2011), Kushwah *et al.* (2008), Paredes & Fernández (2002), Cooney *et al.* (2015), Bandara *et al.* (2021), Mastorakos *et al.* (2015), Hou *et al.* (2021), Gbian & Omri (2021), Yaniz-Galende & Hajjar (2014), entre otros; se desarrollaron los vectores híbridos para la administración de genes, debido a que otorgan una seguridad y eficacia terapéutica mejorada. Además, brindan una mayor estabilidad del ADN del vector durante períodos prolongados y disminuyen las respuestas inmunológicas graves en el huésped (Huang & Kamihira, 2013; Jacoby *et al.*, 1997). Cabe aclarar que el término híbrido también es empleado por algunos autores para referirse a los vectores pseudotipados (Yan *et al.*, 2017), puesto que combinan elementos de dos o más virus (Huang & Kamihira, 2013).

Con base en lo anterior, para el tratamiento de la FQ, se han empleado vectores híbridos a partir de la combinación de virus adenoasociados recombinantes y bocavirus humano 1 (rAAV2/HBoV1), PiggyBac y adenovirus (PB/Ad) (Tang *et al.*, 2020), AAV/Ad (Gonçalves *et al.*, 2002) y NP (Hadinoto *et al.*, 2013).

##### 8.4.1 rAAV2/HBoV1

Los virus adenoasociados recombinantes del serotipo 2 (rAAV2) son un tipo virus no envuelto que están constituidos por una capa de proteína que rodea y protege un genoma de ADN monocatenario de aproximadamente 4.8 kb (Naso *et al.*, 2017). No obstante, su uso en la terapia génica para la FQ se ha dificultado debido a que presenta limitaciones relacionadas con la baja capacidad de transducción en el epitelio respiratorio y baja capacidad de empaquetamiento que dificulta la inserción completa de la secuencia codificante del gen CFTR (4,443 kb) y de promotores que garanticen la expresión duradera del mismo (Yan *et al.*, 2017, Yan *et al.*, 2013).

Considerando lo anterior, Yan y colaboradores (2013), desarrollaron el vector viral rAAV2/HBoV1-CFTR, basado en la pseudotipificación del genoma de rAAV2 en la cápside del virus HBoV1, que permitió empaquetar y entregar la secuencia codificante de CFTR de longitud completa junto con los elementos transcripcionales necesarios para la expresión eficaz del ARNm de CFTR (Yan *et al.*, 2013, Yan *et al.*, 2019). Tras realizar estudios *in vitro*,

se determinó que el vector logró restaurar aproximadamente el 30% del CFTR y una mejora en el transporte del cloruro en el epitelio humano polarizado (Yan *et al.*, 2013), por lo que se considera que este vector es prometedor para su uso en terapia génica para el tratamiento de la FQ (Tang *et al.*, 2020).

#### 8.4.2 PB/Ad

Un transposón (elemento genético móvil) es un segmento de ADN que puede cambiar su posición relativa dentro del genoma de una célula (Cooney *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016). En un estudio realizado por Cooney y colaboradores, se hizo uso del transposón *piggyBac* (ADN PB) para el desarrollo de vectores híbridos con Ad, con el objetivo de integrar genéticamente un transgén que mejore el funcionamiento del CFTR de manera eficaz, segura y con una alta estabilidad (Cooney *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2020). Es preciso mencionar que el transposón ADN PB tenía como función proporcionar la actividad catalítica para mediar la integración genómica del gen de interés (Cooney *et al.*, 2015), mientras que el Ad, gracias a su capacidad de empaquetado genético permitiría generar plásmidos y funcionaría como vehículo de entrega de los transposones (Cooney *et al.*, 2015). Además, el vector estaba compuesto por un promotor de citomegalovirus, que generaría una transducción con títulos elevados (Cooney *et al.*, 2015).

Este vector al ser evaluado *in vitro* e *in vivo* en células del epitelio respiratorio (pólipos nasales, tráquea y bronquios), conejos y ratones demostró tener una expresión persistente en un lapso de 17, 6 y 22 semanas respectivamente (Cooney *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 1999). Además, al administrar el vector por medio de aerosolización en animales grandes (cerdos) con LPC de forma concomitante, logró una transducción significativa en las vías respiratorias grandes y pequeñas (en particular, células ciliadas, no ciliadas, caliciformes, basales y las glándulas submucosas); lo que se traduce en la corrección funcional de la proteína CFTR, una mejora en la actividad del canal de cloro, la acidez del líquido de la superficie de las vías respiratorias y la reducción de la capacidad de destrucción bacteriana pulmonar (Cooney *et al.*, 2018). Pudiendo concluir que estos nuevos sistemas de vectores híbridos proporcionan una herramienta adicional para la transferencia de genes *in vivo* (Cooney *et al.*, 2015, Cooney *et al.*, 2018).

#### 8.4.3 AAV/Ad

A partir de un estudio desarrollado por Gonçalves y colaboradores (2002), se logró producir vectores híbridos de AAV y Ad a través del sistema Cre/loxP en líneas celulares retinianas embrionarias humanas (PER.C6) (Gonçalves *et al.*, 2002). Con lo cual se generó un sistema capaz de combinar la gran capacidad de clonación y la entrega eficiente de genes nucleares independiente del ciclo celular de vectores de Ad con la expresión transgénica a largo plazo y la falta de genes virales AAV, superando las limitaciones de cada uno de forma individual. El vector (AAV/Ad) al ser evaluado *in vitro*, demostró tener una expresión transgénica estable que se logró mediante la integración del ADN exógeno al genoma del huésped (Gonçalves *et al.*, 2002).

#### 8.4.4 Nanopartículas híbridas

Las NP híbridas lípido-polímero son nanoportadores compuestos por un núcleo polimérico recubierto por lípidos que exhiben ventajas en cuanto a la estabilidad, biocompatibilidad, eficacia de administración celular *in vivo* y mejor rendimiento de producción (Hadinoto *et al.*, 2013). Además, brindan la posibilidad de hacer uso de diversos materiales que generan perfiles de liberación controlados, específicos y que protegen a las sustancias de la degradación mientras reducen los efectos secundarios (Soares *et al.*, 2020).

En el caso de la FQ, se han desarrollado NP híbridas con un núcleo polimérico de PLGA y una capa lipídica de DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) de administración intranasal o inhalada y con una eficiencia de encapsulación del PNA (ácido nucleico peptídico) de más del 90% (Comegna *et al.*, 2021). A diferencia de las terapias mencionadas a lo largo del presente documento, ésta va a estar dirigida a miR-509-3p, un micro-ARN no codificante que está relacionado con la degradación del ARNm, dificultando la traducción de las proteínas que codifican el CFTR (Comegna *et al.*, 2021). Con el propósito de revertir dicha degradación, Comegna y colaboradores hicieron uso de PNA, que se hibridan con sus homólogos naturales (ARN y ADN) de acuerdo al emparejamiento de las bases nitrogenadas, el cual es posible gracias a la similitud del PNA con el ADN y ARN, a la presencia de una estructura sin carga compuesta por unidades de N-(2-aminoetil) glicina y la ausencia de grupos fosfatos que evitan la repulsión electrostática (Comegna *et al.*, 2021).

Al evaluar la viabilidad del vector por medio de estudios *ex vivo* en células epiteliales nasales primarias de pacientes con FQ, moco dializado y un simulador de fluido pulmonar intersticial se evidenció que las NP exhiben un perfil de liberación sostenido de hasta 3 días ( $32,4 \pm 5,2\%$  en 24 horas y 50% en 48 horas), conservando un diámetro hidrodinámico por

debajo de 300 nm, con una buena estabilidad y propiedades mucoinertes, que evitaban la aglomeración y favorecen la difusión pasadas las 72 horas (Comegna *et al.*, 2021). Demostrando que éste sistema cuenta con la capacidad para penetrar las barreras celulares y se difunde eficazmente a través de membranas mientras garantiza una transfección del PNA de más del 40% (Comegna *et al.*, 2021).

### 8.5 Estudios clínicos

La terapia génica aplicada a la FQ se ha encargado de proponer nuevas alternativas para el suministro y expresión de genes en las vías respiratorias. Para el año 2017 se realizaron aproximadamente 2600 ensayos relacionados con la terapia génica de los cuales 36 fueron estaban enfocados en la FQ (Donnelley & Parsons, 2018).

Entre algunos de los estudios clínicos realizados en torno a la FQ se destacan el NCT00004533 y NCT00073463, en los cuales un vector viral de AVV (tgAAVCF) demostró producir una mejora en FEV1 y una disminución en la presencia de interleucinas proinflamatorias (IL-8) en los pacientes que recibieron la terapia génica, además de que el tratamiento demostró ser seguro y bien tolerado. A pesar de ello, no se evidenció una mejora significativa en la función pulmonar con el paso del tiempo y los resultados no fueron estadísticamente significativos (Moss *et al.*, 2004; Moss *et al.*, 2007). Por otra parte, en el estudio NCT00004287 se evidenció que aunque es posible lograr la transferencia de material genético en el epitelio respiratorio por medio de vectores virales diseñados con Ad, su eficiencia es baja y transitoria en las vías respiratorias (Zuckerman *et al.*, 1999). En cuanto al estudio NCT01621867, un ensayo clínico de dosis múltiple de fase IIb aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo realizado entre los años 2012 a 2014, se evidenciaron beneficios significativos a nivel clínico al demostrar estadísticamente una estabilización modesta en la tasa de deterioro de la función pulmonar en pacientes con FQ, por medio de la administración mensual durante un año de liposomas cargados con un plásmido de expresión de CFTR (GL67A/pGM169) a 100 participantes (Alton *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2019). Finalmente, para enero del 2022, no se han publicado resultados oficiales sobre el ensayo clínico más reciente, desarrollado entre 2019 y 2021, en el cual se vehiculizó un vector de ARNm CFTR en partículas lipídicas (MRT5005), no obstante, de acuerdo a un comunicado de prensa, se identificó que el vector es seguro, bien tolerado y no genera efectos adversos graves, sin embargo, hasta ese momento, no se había evidenciado un aumento en FEV1 (Translate Bio, 2021).

**Tabla 3.** Listado de ensayos clínicos con vectores virales y no virales (sintéticos).

Ensayo (código)	Fecha de finalización	Fase	No de participantes	Vía de administración	Tipo de vector	Vector	Composición	Referencias
NCT00004533	06/2002	1	19	Intranasal	Viral	tgAAVCF	El vector se construyó reemplazando la secuencia codificante de AAV con el ADNc de CFTR humano de longitud completa y una secuencia de poliadenilación sintética basada en globulina murina. Esta construcción estaba flanqueada por las secuencias repetidas terminales invertidas de AAV2.	(Flotte et al., 2003) (Clinical Trials, NCT00004533)
NCT00073463	10/2005	2 y 3	100	Aerosol	Viral			(Moss et al., 2004) (Clinical Trials, NCT00073463)
NCT00004287	06/2005	1	14	Endobronquial	Viral	H5.001CBCFTR	El vector se basa en el serotipo 5 de Ad humano, en el cual el cDNA de CFTR es impulsado por un promotor de $\beta$ -actina de pollo potenciado por secuencias del gen de expresión rápida del citomegalovirus usando una secuencia poli (A) del virus de simio 40 (SV40).	(Clinical Trials, NCT00004287) (Zuckerman et al., 1999).
NCT00004806	11/2002	1	9	Intranasal	Sintético	Regulador de conductancia transmembrana de FQ	Liposomas catiónicos complejados con plásmido que contiene el ADNc para la producción de CFTR humano.	(Clinical Trials, NCT00004806)
NCT01621867	05/2014	2	130	Nasal y pulmonar	Sintético	GL67A/pGM169	Es la combinación del liposoma catiónico (GL67A) y ADN bicatenario circular plasmídico que expresa CFTR (pGM169).	(Alton et al., 2016) (Clinical Trials, NCT01621867) (Alton et al., 2013)
NCT03375047	12/2021	1 y 2	40	Nasal	Sintético	MRT5005	Se basa en ARNm que codifica la proteína CFTR encapsulada en nanopartículas lipídicas.	(Clinical Trials, NCT03375047)

**Tabla 4.** Ventajas y limitaciones de vectores empleados en la terapia génica aplicada a la fibrosis quística.

Tipo de vector	Clase	Ventaja	Limitación
Virales	Retrovirus	Integración de ADN exógeno al genoma del huésped, expresión genética duradera y baja respuesta inmunogénica (Wu, Chaudhary y Mahato, 2019).	Riesgo de mutagénesis por inserción, transfección de células en división exclusivamente (Wu, Chaudhary y Mahato, 2019) y expresión génica baja (Johnson, 2001).
	Lentivirus	Expresión sostenida, capacidad de transfección de células sin capacidad de dividirse (Cooney <i>et al.</i> , 2018) y potencial de pseudotipificación, lo que otorga una disminución en la inmunogenicidad (Cooney <i>et al.</i> , 2021), la capacidad de modular el tropismo y facilitar la purificación y concentración en el proceso de manufactura (Loza <i>et al.</i> , 2021).	Limitada aplicación clínica por inmunogenicidad (Mitomo <i>et al.</i> , 2010).
	Ad	Transfección de células en cualquier estadio del ciclo celular, producción rápida y robusta del transgén (Wu, Chaudhary y Mahato, 2019).	Respuesta inmunológica innata y adaptativa fuerte (Paredes & Fernández, 2002; Cooney <i>et al.</i> , 2015) con expresión genética transitoria (Wu, Chaudhary y Mahato, 2019)

	AVV	No se han asociado con alguna enfermedad humana conocida (Martini <i>et al.</i> , 2011); con potencial de modificación de serotipos para mejorar el tropismo celular (Martini <i>et al.</i> , 2011).	Empaquetamiento del ADN limitado, fracaso en estudios clínicos por inmunogenicidad (Donnelley & Parsons, 2018) y expresión génica transitoria (Martini <i>et al.</i> , 2011).
	HD-Ad	Respuesta inmune reducida y mayor capacidad de empaquetamiento en comparación con los virus adenoasociados, prolongación de expresión génica (Kushwah <i>et al.</i> , 2008; Rosewell <i>et al.</i> , 2011; Cao <i>et al.</i> , 2018) y capacidad de incorporar herramientas de edición genética (Bandara <i>et al.</i> , 2021).	Expresión génica transitoria (Wu, Chaudhary y Mahato, 2019)
<b>No virales</b>	Liposomas	Capacidad de adoptar diferentes morfologías, composición variada, capacidad de encapsular moléculas de diferente naturaleza (hidrofílicas, lipofílicas y anfipáticas), baja respuesta inmunogénica y liberación diferencial (Balazs & Godbey, 2011).	Baja estabilidad, baja encapsulación de fármacos hidrofílicos, rápida eliminación in vivo, dificultad de escalado (Bandara <i>et al.</i> , 2021), alto costo y baja solubilidad (Daraee <i>et al.</i> , 2016)
	Niosomas	Mayor estabilidad y menor citotoxicidad en comparación con los liposomas (Sainz-Ramos <i>et al.</i> , 2020); encapsulación de fármacos de naturaleza hidrofílica y lipofílica (Khoee & Yaghoobian, 2017)	Combinación, agregación, permeabilidad e hidrólisis de los medicamentos encapsulados y largo tiempo de manufactura (Gharbavi <i>et al.</i> , 2018)
	NP	Gran diversidad de materiales biodegradables y biocompatibles que pueden ser utilizados para su elaboración (Osman <i>et al.</i> , 2018), se puede modificar la estabilidad de acuerdo al tamaño, material y funcionalización (Najahi-Missaoui <i>et al.</i> , 2020) y pueden ser de naturaleza lipídica, polimérica o híbrida.	Expresión génica sostenida dificultada por la inestabilidad coloidal del moco, limitada difusión de los vectores en los fluidos corporales, la adherencia de los polímeros catiónicos al moco (Mastorakos <i>et al.</i> , 2015) y respuestas proinflamatorias (Hou <i>et al.</i> , 2021; Gbian & Omri, 2021).
<b>Híbridos</b>	rAAV2/HBoV1	Inserción completa del gen CFTR, expresión génica duradera y estable; con aumento del tropismo del vector por vías respiratorias (Yan <i>et al.</i> , 2019)	Manufactura compleja y glucoproteínas tóxicas (Copreni <i>et al.</i> , 2004)
	PB/Ad	Mayor capacidad de empaquetamiento, expresión genética e integración genómica (Cooney <i>et al.</i> , 2015; Zhao <i>et al.</i> , 2016)	
	AAV/Ad	Generación de títulos elevados, entrega eficiente de genes independiente del ciclo celular, expresión transgénica a largo plazo y baja respuesta inmune (Gonçalves <i>et al.</i> , 2002).	
	NP	Buena estabilidad, biocompatibilidad, eficacia de administración celular in vivo y rendimiento de producción (Hadinoto <i>et al.</i> , 2013); liberación diferencial, protección contra degradación y reducción de efectos secundarios (Ferreira Soares <i>et al.</i> , 2020)	Poca solubilidad en agua e internalización celular reducida en función del número de bases nitrogenadas (Comegna <i>et al.</i> , 2021)

**Nota:** en la literatura consultada se evidenció que aunque algunos autores consideraban como positiva la inserción del material genético exógeno al genoma del huésped (Wu, Chaudhary y Mahato, 2019; Cooney *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016), otros autores plantean que ésta inserción es una desventaja al traer consigo el riesgo de mutagénesis por inserción (Kustikova *et al.*, 2010; Ranzani *et al.*, 2013; Johnson, 2001; CFF, s.

## 9. Discusión de Resultados

### 9.1 Descripción del vector

Considerando que las ventajas y limitaciones de cada vector van a estar asociadas a su naturaleza (híbrido, viral o sintético) (tabla 4), no es posible establecer un vector ideal para su uso en la terapia génica aplicada al tratamiento de la FQ con la información disponible a la fecha, puesto que un solo vector no cumple todos los parámetros necesarios para que la terapia génica sea eficaz. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos clínicos que se han desarrollado hasta la fecha, el vector más prometedor es el vector sintético GL67A/pGM169, debido a que logró estabilizar ligeramente la tasa de deterioro de la función pulmonar en pacientes con FQ (Alton *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2019).

### 9.2 Proceso de manufactura

El proceso de manufactura del vector consta de 3 macroprocesos: la producción del plásmido pGM169, del lípido GL67A y la preparación del vector final (Alton *et al.*, 2014).

#### 9.2.1 Plásmido pGM169

El plásmido pGM169, es un plásmido de 6549 pb que está sintetizado químicamente y compuesto por una secuencia de CFTR (soCFTR2), un promotor de hCEFI (potenciador del citomegalovirus humano/factor de elongación 1 alfa) que provee una expresión genética alta y persistente del transgen terapéutico (Pringle *et al.*, 2009); una secuencia de un intrón sintético que mejora el corte y empalme del ARNm y una secuencia BGH Poli A (señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina) que confiere estabilidad y protección al ARNm durante la traducción y exportación nuclear (Taylor-Parker, 2016). Con el fin de reducir una respuesta inmune en el huésped, el plásmido se diseñó con un origen de replicación bacteriano R6K, un gen de resistencia a kanamicina y una secuencia promotora bacteriana sintética EM7, que al estar libres de CpG reducen la inflamación y la respuesta inmune en el huésped, generando una mayor seguridad y una expresión génica pulmonar sostenida (Hyde *et al.*, 2008). Además, con el propósito de facilitar el ensamblaje del plásmido, se ubicaron secuencias específicas para las enzimas de restricción entre cada uno de los elementos de pGM169 (Alton *et al.*, 2014).

Con el fin de evaluar la idoneidad del constructo generado, se evaluó la capacidad de transcripción y traducción de la proteína CFTR por medio de secuenciación, electroforesis en gel para el plásmido y posteriormente western blot. También se estimó la funcionalidad de

las proteínas expresadas por medio de análisis de flujo de salida de yoduro en células HEK293T transfectadas con pGM169 (Alton *et al.*, 2014). Una vez garantizada la idoneidad del plásmido, se procedió a transformar y transfectar las células huésped de origen bacteriano (*E. Coli*), para posteriormente seleccionar las células que lograron la internalización de pGM169 y someterlas a un proceso de fermentación y lisado en solución para liberar el plásmido (Alton *et al.*, 2014).

Acto seguido, se purificaron y concentraron los plásmidos por medio de una separación sólido/líquido, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de interacción hidrofóbica (Alton *et al.*, 2014), para finalmente desalinizar y filtrar los plásmidos por ultrafiltración/diafiltración y filtración esterilizante respectivamente. El fármaco a granel se envasó en viales de un solo uso y se almacenaron a -80 °C (Alton *et al.*, 2014).

### 9.2.2 Lípido catiónico GL67A

El lípido catiónico GL67A es un excipiente que consta de una mezcla de tres componentes GL67 (N4 colestiril-espermina), DOPE (Dioleoilfosfatidiletanolamina) y DMPE-PEG5000 (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina unido covalentemente con PEG 5000) (Alton *et al.*, 2014). Para su producción, se disolvieron GL67, DOPE y DMPE-PEG5000 en terbutanol y agua en una proporción 9:1 para obtener una relación molar de 1:2:0,05, respectivamente. Posteriormente, se realizó una filtración esterilizante y el llenado de viales de vidrio para liofilización de 10 mL con la mezcla de lípidos. La liofilización, se realizó bajo una atmósfera inerte durante aproximadamente 94 horas a temperaturas que oscilaban entre los -50 °C y 10 °C. Al cabo de esta operación, los viales se taparon con tapones de aluminio y se almacenaron a -80 °C (Alton *et al.*, 2014).

### 9.2.3 Preparación del vector final

Para preparar el vector que se va a administrar, se debe someter al plásmido y al lípido catiónico a un proceso de descongelación a temperatura ambiente, para posteriormente hidratar el lípido GL67A con agua para inyección, hasta garantizar la dilución completa (Alton *et al.*, 2014). Los complejos de pGM169/GL67A se preparan mezclando rápidamente 5 mL de pGM169 y 5 mL de GL67A por medio de un dispositivo mezclador de doble barril basado en una jeringa desechable, de tal forma que se asegure que la formulación final del producto a administrar va a ser de 2,6 mg/ml de pGM169, 3,7 mg/ml de GL67, 8,9 mg/ml de DOPE y 1,7 mg/ml de DMPE-PEG5000 (Alton *et al.*, 2014).

Aunque el proceso de manufactura del vector empleado en el ensayo clínico NTC01621867 fue descrito detalladamente en la literatura, los procesos de manufactura para la fabricación de los vectores y sus respectivas formas farmacéuticas a menudo no se suelen publicar a detalle (Clément & Grieger, 2016). Por otra parte, las vías de administración y las formas farmacéuticas siguen representando un reto para la implementación de la terapia génica, puesto que deben superar con éxito la degradación física, química y enzimática para alcanzar el blanco terapéutico deseado, al mismo tiempo que se garantiza que la administración de los vectores por la vía pulmonar no va a afectar la fisiología del sistema respiratorio ó va a causar trastornos respiratorios (Xu *et al.*, 2021).

### 9.3 Vías de administración y formas farmacéuticas

Como se ha expuesto a lo largo del presente documento, la implementación de la terapia génica en la práctica clínica para el tratamiento de la FQ se ha visto estancada por la falta de un proceso de entrega eficaz del material genético al sitio de acción, como consecuencia de las barreras anatómicas naturales, celulares y fisiopatológicas que deben superar los vectores para alcanzar el órgano a tratar, barreras que van a estar determinadas por la enfermedad y la vía de administración (Sainz-Ramos *et al.*, 2021). A partir de esto es indispensable definir el perfil farmacocinético del vector en concordancia con las propiedades fisicoquímicas y farmacodinámicas del material genético; al igual que la solubilidad, permeabilidad, transformación y eliminación tanto del material genético como del vector; variables que pueden estar directamente influenciadas o modificadas por la formulación de la forma farmacéutica (Jin *et al.*, 2021).

Con base en lo anterior, la vía intravenosa, intramuscular y subcutánea son las vías de administración más comunes para la aplicación de medicamentos biológicos, material genético, péptidos y proteínas (Shaji & Patole, 2008). No obstante, éstas se han relacionado con varios inconvenientes que incluyen la esterilidad, alto costo de producción, la necesidad de personal especializado para su aplicación; una baja adherencia del paciente al tratamiento por dolor, lesiones en el lugar de administración, flebitis, una vida media corta de los fármacos en el torrente sanguíneo y efectos adversos graves al haber una mayor biodisponibilidad (Jin *et al.*, 2021). A partir de esto, se han buscado vías de administración alternas que sean menos invasivas y permitan la administración de macromoléculas de manera efectiva y con un impacto terapéutico eficaz (Jin *et al.*, 2021), siendo la vía de administración pulmonar la más conveniente para enfermedades que comprometen el funcionamiento pulmonar como lo es el caso de la FQ (Jin *et al.*, 2021).

La vía de administración pulmonar es ventajosa puesto que permite la entrega directa de medicamentos en el sitio de acción y una absorción e inicio de acción rápida de los mismos como resultado de la amplia área superficial, vascularización del endotelio pulmonar y del reducido grosor del epitelio alveolar no ciliado (aproximadamente 0,1 a 0,5  $\mu\text{m}$ ) (Xu *et al.*, 2021; Jin *et al.*, 2021). Del mismo modo, evita el metabolismo del primer paso, permite la reducción de la dosis y en comparación con la vía intravenosa; disminuye los efectos secundarios, es más rentable y fácil de administrar, lo que finalmente puede llegar a mejorar la adherencia a los tratamientos y reduce la posibilidad de desarrollar efectos secundarios o toxicidad acumulativa (Jin *et al.*, 2021; Youngren-Ortiz. *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2021).

Sin embargo, la biodisponibilidad y la efectividad de los fármacos va a depender de la técnica de inhalación del paciente, del tamaño de las partículas del medicamento y de la estabilidad del fármaco en las vías respiratorias, siendo éstos los tres principales desafíos que presenta ésta vía de administración (Jin *et al.*, 2021). En lo que concierne a la degradación enzimática, se ha intentado superar ésta limitante por medio del diseño de sistemas de administración novedosos no virales como micelas, NP, liposomas y niosomas; y sistemas de administración conjugados como partículas mucoadhesivas, partículas que penetran la mucosidad y partículas acopladas a polímeros (Jin *et al.*, 2021). Estos sistemas de administración, además de mejorar la estabilidad de los fármacos, permiten modificar los perfiles de liberación y lograr una entrega dirigida al objetivo terapéutico, de tal manera que se pueda definir si el fármaco se va a depositar en los pulmones, se va a eliminar por aclaramiento mucociliar o va a alcanzar la circulación sistémica; logrando así una administración efectiva de fármacos y una terapia más personalizada (Jin *et al.*, 2021).

En éste sentido, un factor que trasciende directamente en la administración pulmonar de medicamentos es la naturaleza y el tamaño de la partícula del principio activo (Jin *et al.*, 2021). Por lo cual, en el diseño y desarrollo de medicamentos inhalados es necesario contemplar aspectos como la retención y efecto depósito del fármaco, la disolución, el metabolismo y la tolerabilidad en los pulmones (Xu *et al.*, 2021). Por consiguiente, partículas aerodinámicas con un diámetro entre 5 a 9  $\mu\text{m}$  se depositan en las vías respiratorias grandes y en la región orofaríngea, las partículas de 1 a 5  $\mu\text{m}$  se depositan y sedimentan en bronquios y alvéolos, siendo las partículas de menos de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro las que se van a depositar en la región alveolar (Xu *et al.*, 2021, Jin *et al.*, 2021).

Desde el punto de vista farmacotécnico, el desarrollo de polvos inhalables requiere de la estabilización del material biológico durante todo el proceso de manufactura y comercialización, puesto que es susceptible a la degradación (Chang *et al.*, 2021). Es por

esto que los excipientes juegan un papel fundamental al momento de garantizar las propiedades anteriormente mencionadas y deben ser seleccionados de acuerdo a la actividad, el tamaño y la estructura de éstas biomoléculas (Chang *et al.*, 2021). En el caso de las formulaciones con ácidos nucleicos, no se suele generalizar los procesos de manufactura ni los excipientes utilizados debido a que se deben plantear condiciones diferentes dependiendo de los ácidos nucleicos empleados y su objetivo de uso (Chang *et al.*, 2021). No obstante la molienda, el secado y la liofilización, son las operaciones que suelen mantenerse en la mayoría de los procesos de manufactura, mientras que se varían las condiciones de producción y las técnicas de caracterización (Chang *et al.*, 2021).

#### *9.4 Panorama de la fibrosis quística en Colombia*

Las enfermedades huérfanas son enfermedades crónicas, debilitantes y graves que amenazan la vida y cuentan con una prevalencia menor de 1 por cada 5000 colombianos (Ley 1438, 2011), en el caso de la FQ, presenta una tasa de incidencia de 1 por cada 5.025 recién nacidos en el país (Mateus, Fonseca-Mendoza & Silva, 2010). De acuerdo con el informe de eventos del 2021 publicado por el INS, en Colombia desde el 2016 hasta el periodo epidemiológico VI del 2021 se han reportado 48.605 casos de habitantes diagnosticados con alguna enfermedad huérfana al Sivigila, ubicándose la FQ como la treintava (30) enfermedad huérfana con mayor incidencia en el país al presentar 41 casos y representando el 0,69% de estas enfermedades (INS, 2021).

Conforme a los datos recopilados por Andrade y Díaz, el costo promedio de la atención anual por paciente con FQ en Colombia es de COP \$35'986.538 (USD \$10.640,60) (Andrade & Díaz, 2020). Recursos que son empleados para la aplicación de terapias paliativas que drenan la cantidad de moco acumulado en las cavidades respiratorias por procedimientos quirúrgicos o terapia física respiratoria (Burney & Davies, 2012).

Tanto a nivel internacional como nacional, el tratamiento para la FQ se aborda bajo un enfoque de terapias de limpieza de las vías respiratorias (compresión torácica de alta frecuencia, presión espiratoria positiva, acapella y flutter, ciclo activo de respiración, drenaje autógeno, técnica de Huffing y percusión torácica), intervenciones quirúrgicas (trasplante), esquemas farmacoterapéuticos y apoyo nutricional (NHS, 2021; MSPS & Colciencias, 2014). En Colombia, el esquema farmacológico consta de tobramicina, dornasa alfa, ácido ursodeoxicólico, antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos nebulizados, ciclos de antibióticos endovenosos ambulatorios y enzimas pancreáticas (Vásquez, Aristizábal, & Daza, 2010), los cuales están incluidos en el Plan de Beneficios en Salud (Resolución 2292, 2021).

En el país, el diagnóstico de la FQ se basa en la identificación de un cuadro clínico con los síntomas y signos propios de la enfermedad, que va acompañado con una revisión de la historia clínica familiar, un tamizaje neonatal (MSPS, 2014) y dos pruebas positivas de electrolitos en sudor por medio de un test cuantitativo de iontoforesis con pilocarpina, y/o estudio molecular gen CFTR (INS, 2020).

Según la Guía No. 38 del 2014 del MSPS, la mayoría de los pacientes con FQ son diagnosticados sin ninguna dificultad debido a que la mayoría presentan enfermedad sinopulmonar crónica y el 85-90% de los pacientes tienen insuficiencia pancreática exocrina. No obstante, se ha identificado que el 5-10% de los pacientes presentan un diagnóstico difícil de establecer (MSPS & Colciencias, 2014). Por lo que asegurar el diagnóstico de una enfermedad que presenta una incidencia reducida genera grandes desafíos, como la posibilidad de generar un diagnóstico erróneo bajo etiquetas de “posible fibrosis quística” ó “fibrosis quística leve” y en el peor de los casos ser diagnosticada como asma, a raíz de resultados equívocos o normales en la prueba de sudor y por la dificultad de identificar algunas mutaciones (Simmonds, 2019). Así mismo, en un estudio realizado en Colombia en 2015, confirmó la existencia del diagnóstico tardío de los pacientes y su implicación en la calidad de vida y el pronóstico de la enfermedad (Bonilla & García, 2015).

Desde el gobierno nacional se han generado normativas para establecer un marco de incentivos para consolidar la atención y el desarrollo del conocimiento científico en torno a las enfermedades huérfanas, cómo lo es la ley 1392 de 2010, que en consonancia con la ley 1164 de 2007, establecen:

“los mecanismos de promoción y participación, para la investigación científica de diagnósticos tempranos y posibles medicamentos, tratamientos preventivos, aspectos psicológicos y psiquiátricos asociados con estas enfermedades” (ley 1392, 2010).

No obstante, se ha destacado la necesidad de emplear mecanismos que permitan el aumento del conocimiento de este tipo de patologías desde la formación universitaria, que facilite el diagnóstico y fortalecimiento de sistemas de reporte, vigilancia y control exclusivo de las enfermedades huérfanas en el país (Pareja, 2017).

### *9.5 Ámbito legal*

En los últimos años la FDA ha aprobado el uso y comercialización de medicamentos basados en terapia génica como Luxturna (Voretigene neparvovec)(2017), Kymriah (2017) y Zolgesma (Onasemnogene abeparvovec)(2019). Sin embargo, hasta la fecha no se ha

desarrollado ningún medicamento aprobado por alguna agencia regulatoria para el tratamiento de la FQ a partir de terapia génica ya que estos aún se encuentran en ensayos clínicos (tabla 3).

Como ya se mencionó, la terapia génica ofrece una opción de tratamiento independientemente del tipo de mutación que presente la proteína CFTR, y en el caso de las mutaciones de clase I y VI, es su única opción (Bandara et al., 2021; De la Hoz et al., 2018). En Colombia hay procedimientos, servicios o medicamentos que no están incluidos en el PBS (Resolución 2292, 2021), lo que dificulta su acceso y muchas veces se tiene que recurrir a procesos legales para su adquisición (tutela) (Decreto 2591, 1991). En este orden de ideas, el mecanismo judicial para lograr la aprobación de la terapia génica sería por medio de la acción de tutela bajo el derecho a intentar, reconocido por la sentencia T-057 de 2015, que tal como lo expone Duque (2018) y Castaño (2021), para su aprobación deben disponerse del cumplimiento de algunos requisitos evaluados individualmente, como lo son: tratarse de un paciente con diagnóstico confirmado de enfermedad terminal o catastrófica, existir un riesgo inminente y grave que vulnere la salud y ponga en peligro la vida, que los servicios o tecnologías en salud sean experimentales, no debe existir otras alternativas de tratamiento aprobadas que ofrezcan beneficios significativos para el paciente, o que existiendo, no puedan usarse o no hayan brindado beneficios al paciente; existir cierto grado de certeza científicamente documentada sobre la eficacia y eficiencia del tratamiento experimental, el servicio o la tecnología en salud deben ser prescritos, con fundamento científico, por el médico tratante y finalmente, el paciente y su familia deben tener pleno conocimiento de los riesgos, beneficios y consecuencias del tratamiento experimental, lo cual debe quedar consignado de forma expresa y escrita en el consentimiento informado, y ser suscrito por el paciente o su representante legal (Duque, 2018; Castaño, 2021).

Otra opción a considerar es el uso compasivo de medicamentos, en que se hace uso de medicamentos en investigación en pacientes al margen d un ensayo clínico, siempre y cuando el médico considere indispensable su utilización (Olalla & Tercero, 2007). Sin embargo, en Colombia no existe una clara regulación para el uso compasivo de medicamentos pero se ha contemplado su uso, puesto que existen registros de solicitudes en el acta 34 del año 2011 de la sala especializada de medicamentos y productos biológicos (Invima, 2011) y la resolución 730 de 2020, en donde se establece que:

“En el caso de pacientes que no sean elegibles para participar en ensayos clínicos, el Invima podrá autorizar programas de uso compasivo con el respaldo de los

profesionales de la salud que requieran su uso, bajo los lineamientos que determine esa entidad (Resolución 730, 2020)”.

Con lo cual, el uso compasivo de medicamentos se posiciona como una alternativa para acceder a la terapia génica o terapias experimentales, para cualquier tipo de enfermedad y no exclusivamente como tratamiento para la FQ.

En Colombia, desde 1999 hasta septiembre del 2020, se presentaron 7.865.046 tutelas, de las cuales aproximadamente el 30% (2.333.138) correspondían a tutelas en salud (Defensoría del Pueblo, 2022). Al buscar información referente a la cantidad de tutelas interpuestas en el área de la salud asociadas a la FQ en Colombia en el periodo de 1990-2022, en bases de datos de entidades estatales como la Defensoría del Pueblo, la Corte Constitucional y el MSPS, se evidenció la falta de información actualizada en los años consultados y una deficiencia en los criterios de búsqueda de información relacionada con patologías específicas, que tal como lo describe la Defensoría del Pueblo (2022):

“La información del período correspondiente del año 1991 a 1998 no está dentro de nuestras bases de datos y la información del año 2021 aún no se encuentra actualizada... Por otra parte, no contamos con dicha información relacionada con las tutelas en salud interpuestas en el período de 1991 al 2021 en relación con la fibrosis quística, puesto que es muy específica. De igual manera esta información la maneja el Ministerio de salud y Seguridad Social (Defensoría del Pueblo, 2022)”.

Sin embargo, al consultar el MSPS, no fue posible acceder a este tipo de información debido a que según la ley estatutaria 1581 de 2012, el diagnóstico de una enfermedad es considerado como información sensible al ser un dato relativo a la salud. Por su parte, la Corte Constitucional explica que si bien la caracterización de las tutelas por la categoría “fibrosis quística” no está registrada, si existe una variable “enfermedad grave”. En este sentido, en la categoría de tutelas accionantes con enfermedad grave, entre las cuales se asume se encuentra la FQ, se presentaron 96.109 tutelas entre 2016 y noviembre de 2021, de las cuales el 77,8% (74.812) demandan el derecho a la salud. Finalmente, en un estudio realizado por Bonilla y Garcia con 25 pacientes con FQ inscritos en la Fundación Colombiana de Fibrosis Quística en el 2015, identificaron que el 72% (18) de los pacientes accedieron a los servicios de salud a través de tutelas, mientras que sólo un 28% (7) accedió a los servicios de salud sin hacer uso de este recurso.

## 10. Conclusiones y recomendaciones

Con el avance de la biología molecular para el esclarecimiento del proceso de internacionalización celular y de la biotecnología y tecnología farmacéutica para el desarrollo de medicamentos biológicos; se ha promovido la investigación y la aplicación de la terapia génica para el tratamiento de la FQ a través del uso de vectores virales, no virales e híbridos que han logrado producir la proteína CFTR al ser administrados por vía pulmonar. No obstante, su implementación en la práctica clínica se ha obstaculizado por las limitaciones inherentes a cada tipo de vector y por la inexistencia de un vector y sistema de administración que reúna todas las características mínimas necesarias para lograr una terapia génica eficaz en términos de capacidad de transfección, expresión génica, manufactura, estabilidad y baja inmunogenicidad. A pesar de ello, se han adelantado ensayos clínicos con vectores virales y sintéticos que han arrojado resultados esperanzadores como el NCT01621867, que tras la administración del vector GL67A/pGM169 logró mejorar la función pulmonar en pacientes con FQ.

En Colombia, pese a que los tratamientos para la FQ están centrados en reducir la sintomatología y complicaciones asociadas con la enfermedad, la mayoría de medicamentos se encuentran incluidos en el Plan de Beneficios en Salud a excepción de los fármacos CFTR moduladores que no cuentan con el registro sanitario expedido por el INVIMA. Por otra parte, el acceso a la terapia génica puede lograrse por medio de la tutela bajo el derecho a intentar y el uso compasivo de medicamentos, el cual no cuenta con una vía legal claramente definida.

Finalmente, es fundamental reconocer el rigor científico y la calidad de la evidencia que debe ser recopilada para garantizar la implementación de la terapia génica en un tratamiento que proporcione la suficiente seguridad y eficacia en la comunidad científica, pacientes y familiares. Razón por la cual se recomienda y promueve la continuidad de la investigación de los vectores híbridos y pseudotipados en la búsqueda de un tratamiento efectivo para la FQ. Además, se fomenta la investigación y el desarrollo de terapias avanzadas a nivel nacional e internacional, como posible alternativa de tratamiento para enfermedades catastróficas e incurables. Por último, se reconoce la necesidad de diseñar y desarrollar bases de datos estatales que registren información relacionada con las tutelas, incluyendo un mayor número de filtros y criterios de búsqueda, que permitan clasificar y realizar estudios basados en los análisis de datos que arrojen las mismas.

## 11. Referencias bibliográficas

- Al Qtaish, N., Gallego, I., Villate-Beitia, I., Sainz-Ramos, M., López-Méndez, T. B., Grijalvo, S., ... & Pedraz, J. L. (2020). Niosome-based approach for in situ gene delivery to retina and brain cortex as immune-privileged tissues. *Pharmaceutics*, 12(3), 198.
- Allan, K. M., Farrow, N., Donnelley, M., Jaffe, A., & Waters, S. A. (2021). Treatment of cystic fibrosis: From gene-to cell-based therapies. *Frontiers in pharmacology*, 12, 241.
- Alton, E. W., Armstrong, D. K., Ashby, D., Bayfield, K. J., Bilton, D., Bloomfield, E. V., ... & UK Cystic Fibrosis Gene Therapy Consortium. (2016). Methods: clinical trial design and outcome measures. In *A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of repeated nebulisation of non-viral cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene therapy in patients with cystic fibrosis*. NIHR Journals Library.
- Alton, E. W., Boyd, A. C., Cheng, S. H., Cunningham, S., Davies, J. C., Gill, D. R., ... & Porteous, D. J. (2013). A randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIB clinical trial of repeated application of gene therapy in patients with cystic fibrosis. *Thorax*, 68(11), 1075-1077.
- Alton, E., Davies, J., Griesenbach, U., Hyde, S., Gill, D., Davies, L., Porteous, D., Boyd, A., & Innes, A. (2014). Cystic fibrosis treatment (US Patent No. US20140242690A1). <https://patentimages.storage.googleapis.com/25/50/7a/6974d146764cf5/US20140242690A1.pdf>
- Andrade, E., & Díaz, J. (2020). Costo-efectividad de la prueba de secuenciación del gen CFTR para portadores asintomáticos en la población colombiana. *Biomédica*, 40(2), 283-295.
- Balazs, D. A., & Godbey, W. (2011). Liposomes for use in gene delivery. *J Drug Deliv* 2011: 326497.
- Bandara, R. A., Chen, Z. R., & Hu, J. (2021). Potential of helper-dependent Adenoviral vectors in CRISPR-cas9-mediated lung gene therapy. *Cell & Bioscience*, 11(1), 1-9.

- Bergeron, C., & Cantin, A. M. (2021). New therapies to correct the cystic fibrosis basic defect. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6193.
- Bonilla Cárdenas, A. J., & García Quintero, O. (2015). Caracterización de la Fibrosis Quística en Bogotá, Colombia y desarrollo de una propuesta de atención integral a pacientes con Fibrosis Quística.
- Brommel, C. M., Cooney, A. L., & Sinn, P. L. (2020). Adeno-associated virus-based gene therapy for lifelong correction of genetic disease. *Human Gene Therapy*, 31(17-18), 985-995.
- Burney, T. J., & Davies, J. C. (2012). Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis. *The application of clinical genetics*, 5, 29.
- Cao, H., Ouyang, H., Grasemann, H., Bartlett, C., Du, K., Duan, R., ... & Hu, J. (2018). Transducing airway basal cells with a helper-dependent adenoviral vector for lung gene therapy. *Human Gene Therapy*, 29(6), 643-652.
- Capra, E., Godfre, A., Loche, A., Smith, J. (2021). Gene-therapy innovation: Unlocking the promise of viral vectors. Recupere by: <https://www.mckinsey.com/industries/life-sciences/our-insights/gene-therapy-innovation-unlocking-the-promise-of-viral-vectors>
- Castañó, R. (2021). Aspectos bioéticos del derecho a intentar o right to try (pp. 1–20). Universidad El Bosque.
- Chang, R. Y. K., Chow, M. Y., Khanal, D., Chen, D., & Chan, H. K. (2021). Dry powder pharmaceutical biologics for inhalation therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 172, 64-79.
- Clément, N., & Grieger, J. C. (2016). Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 3, 16002.
- Clinical Trials. National Library of Medicine (U.S.). (1995, June – 2002, November). Phase I Study of Liposome-Mediated Gene Transfer in Patients With Cystic Fibrosis. NCT00004806.

- Clinical Trials. National Library of Medicine (U.S.). (1995, November). Phase I Study of the Third Generation Adenovirus H5.001CBCFTR in Patients With Cystic Fibrosis. NCT00004287.
- Clinical Trials. National Library of Medicine (U.S.). (1999, August – 2002, August). Phase I Randomized Study of Adeno-Associated Virus-CFTR Vector in Patients With Cystic Fibrosis. NCT00004533.
- Clinical Trials. National Library of Medicine (U.S.). (2003, June – 2005, October). Safety and Efficacy of Recombinant Adeno-Associated Virus Containing the CFTR Gene in the Treatment of Cystic Fibrosis. NCT00073463.
- Clinical Trials. National Library of Medicine (U.S.). (2012, May - 2014, May). Repeated Application of Gene Therapy in CF Patients. NCT01621867.
- Clinical Trials. National Library of Medicine (U.S.). (2015, September - 2016, September). Exploratory Study to Evaluate QR-010 in Subjects With Cystic Fibrosis  $\Delta$ F508 CFTR Mutation. NCT02564354.
- Clinical Trials. National Library of Medicine (U.S.). (2018, May - 2021, October). Study to Evaluate the Safety & Tolerability of MRT5005 Administered by Nebulization in Adults With Cystic Fibrosis (RESTORE-CF). NCT03375047.
- Cmielewski, P., Farrow, N., Devereux, S., Parsons, D., & Donnelley, M. (2017). Gene therapy for Cystic Fibrosis: Improved delivery techniques and conditioning with lysophosphatidylcholine enhance lentiviral gene transfer in mouse lung airways. *Experimental lung research*, 43(9-10), 426-433.
- Comegna, M., Conte, G., Falanga, A. P., Marzano, M., Cernera, G., Di Lullo, A. M., ... & Castaldo, G. (2021). Assisting PNA transport through cystic fibrosis human airway epithelia with biodegradable hybrid lipid-polymer nanoparticles. *Scientific reports*, 11(1), 1-10.
- Cooney, A. L., McCray Jr, P. B., & Sinn, P. L. (2015). Integrating viral and nonviral vectors for cystic fibrosis gene therapy in the airways. *Cyst. Fibros. Light New Res.*

- Cooney, A. L., McCray, P. B., & Sinn, P. L. (2018). Cystic fibrosis gene therapy: looking back, looking forward. *Genes*, 9(11), 538.
- Cooney, A. L., Singh, B. K., & Sinn, P. L. (2015). Hybrid nonviral/viral vector systems for improved piggyBac DNA transposon in vivo delivery. *Molecular Therapy*, 23(4), 667-674.
- Cooney, A. L., Singh, B. K., Loza, L. M., Thornell, I. M., Hippee, C. E., Powers, L. S., ... & Sinn, P. L. (2018). Widespread airway distribution and short-term phenotypic correction of cystic fibrosis pigs following aerosol delivery of piggyBac/adenovirus. *Nucleic acids research*, 46(18), 9591-9600.
- Copreni, E., Penzo, M., Carrabino, S., & Conese, M. (2004). Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium: a promising approach to gene therapy of cystic fibrosis. *Gene Therapy*, 11(1), S67-S75.
- Corte Constitucional. Sala Octava de Revisión. Sentencia T-057 de 2015. M.P: Martha Victoria Sáchica Méndez; 12 de febrero de 2015.
- Cystic Fibrosis Foundation (CFF). (sf). Gene Therapy for Cystic Fibrosis. Recuperate by: <https://www.cff.org/Research/Research-Into-the-Disease/Restore-CFTR-Function/Gene-Therapy-for-Cystic-Fibrosis/#:~:text=Gene%20therapy%20is%20a%20process,t o%20make%20normal%20CFTR%20proteins>.
- Daraee, H., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S., & Akbarzadeh, A. (2016). Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 44 (1): 381–391.
- Davis, J. D., & Wypych, T. P. (2021). Cellular and functional heterogeneity of the airway epithelium. *Mucosal immunology*, 14(5), 978-990.
- De Boeck, K., & Amaral, M. D. (2016). Progress in therapies for cystic fibrosis. *The Lancet Respiratory Medicine*, 4(8), 662–674. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00023-0)

Decreto 2591 de 1991. [Presidencia de la República de Colombia]. Por el cual se reglamenta la acción de tutela consagrada en el artículo 86 de la Constitución Política. 19 de noviembre de 1991

De la Hoz, D., Villamil Osorio, M., & Restrepo-Gualteros, S. M. (2019). Moduladores CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator): presente y futuro en la terapia de fibrosis quística. Revisión. Archivos argentinos de pediatría, 117(2), e131-e136.

Donnelley, M., & Parsons, D. W. (2018). Gene therapy for cystic fibrosis lung disease: overcoming the barriers to translation to the clinic. Frontiers in pharmacology, 1381.

Dorin, J. R., Farley, R., Webb, S., Smith, S. N., Farini, E., Delaney, S. J., ... & Porteous, D. J. (1996). A demonstration using mouse models that successful gene therapy for cystic fibrosis requires only partial gene correction. Gene therapy, 3(9), 797-801.

Duncan, G. A., Kim, N., Colon-Cortes, Y., Rodriguez, J., Mazur, M., Birket, S. E., ... & Suk, J. S. (2018). An adeno-associated viral vector capable of penetrating the mucus barrier to inhaled gene therapy. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 9, 296-304.

Duque Giraldo, M. (2018). Precedente constitucional en materia de "derecho a ser intentado" o "right to try" para tratamientos experimentales. Revista CES Derecho, 9(1), 143-163.

Durymanov, M., & Reineke, J. (2018). Non-viral delivery of nucleic acids: insight into mechanisms of overcoming intracellular barriers. Frontiers in pharmacology, 9, 971.

Flotte, T. R., Zeitlin, P. L., Reynolds, T. C., Heald, A. E., Pedersen, P., Beck, S., ... & Guggino, W. B. (2003). Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. Human gene therapy, 14(11), 1079-1088.

Gbian, D. L., & Omri, A. (2021). Current and novel therapeutic strategies for the management of cystic fibrosis. Expert opinion on drug delivery, 18(5), 535-552.

- Gharbavi, M., Amani, J., Kheiri-Manjili, H., Danafar, H., & Sharafi, A. (2018). Niosome: a promising nanocarrier for natural drug delivery through blood-brain barrier. *Advances in pharmacological sciences*, 2018.
- Gonçalves, M. A., Van Der Velde, I., Janssen, J. M., Maassen, B. T., Heemskerk, E. H., Opstelten, D. J. E., ... & De Vries, A. A. (2002). Efficient generation and amplification of high-capacity adeno-associated virus/adenovirus hybrid vectors. *Journal of virology*, 76(21), 10734-10744.
- Guggino, W. B., & Cebotaru, L. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) gene therapy for cystic fibrosis: current barriers and recent developments. *Expert opinion on biological therapy*, 17(10), 1265-1273.
- Hadinoto, K., Sundaresan, A., & Cheow, W. S. (2013). Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 85(3), 427-443.
- Hou, X., Zaks, T., Langer, R., & Dong, Y. (2021). Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature Reviews Materials*, 6(12), 1078-1094.
- Huang, S., & Kamihira, M. (2013). Development of hybrid viral vectors for gene therapy. *Biotechnology advances*, 31(2), 208-223.
- Hyde, S. C., Pringle, I. A., Abdullah, S., Lawton, A. E., Davies, L. A., Varathalingam, A., ... & Gill, D. R. (2008). CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nature biotechnology*, 26(5), 549-551.
- Instituto Nacional de Salud (INS). (13 de febrero de 2020). Fichas y Protocolos. Obtenido de Enfermedades huérfanas o raras: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Fichas-y-Protocolos.aspx>
- Instituto Nacional de Salud (INS). (2021). Informe de eventos enfermedades huérfanas-raras. 2021. Recuperado de: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/ENFERMEDADES%20HU%C3%89RFANAS-RARAS%20PE%20VI%202021.pdf>
- Invima. (2011). Comisión Revisora Sala Especializada de Medicamentos y Productos Biológicos. Obtenido de Acta No. 34 de 2011.

[https://www.invima.gov.co/documents/20143/1266669/ACTA\\_No\\_34\\_DE\\_2011.pdf/028b4b4e-2abe-6e1f-fd53-2802a3c26ed0?t=1561678441638](https://www.invima.gov.co/documents/20143/1266669/ACTA_No_34_DE_2011.pdf/028b4b4e-2abe-6e1f-fd53-2802a3c26ed0?t=1561678441638)

- Invima. (2019). Comisión Revisora Sala Especializada de Moléculas Nuevas, Nuevas Indicações y Medicamentos Biológicos. Obtenido de Acta No. 16 de 2019: [https://www.invima.gov.co/documents/20143/1615620/Acta\\_No\\_16\\_de\\_2019\\_SEM\\_NNIMB.pdf](https://www.invima.gov.co/documents/20143/1615620/Acta_No_16_de_2019_SEM_NNIMB.pdf)
- Jacoby, D., Fraefel, C., & Breakefield, X. O. (1997). Hybrid vectors: a new generation of virus-based vectors designed to control the cellular fate of delivered genes. *Gene therapy*, 4(12), 1281-1283.
- Jaffé, A., Bush, A., Geddes, D. M., & Alton, E. W. F. W. (1999). Prospects for gene therapy in cystic fibrosis. *Archives of disease in childhood*, 80(3), 286-289.
- Jarvis, C. (2020). Why is cystic fibrosis so hard to treat?. Royal Society of Chemistry. Retrieved from: <https://www.chemistryworld.com/features/why-is-cystic-fibrosis-so-hard-to-treat/4012206.article>
- Jiang, Q., & Engelhardt, J. F. (1998). Cellular heterogeneity of CFTR expression and function in the lung: implications for gene therapy of cystic fibrosis. *European Journal of Human Genetics*, 6(1).
- Jin, X., Song, L., Ma, C. C., Zhang, Y. C., & Yu, S. (2020). Pulmonary route of administration is instrumental in developing therapeutic interventions against respiratory diseases. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(12), 1655-1665.
- Johnson, L. G. (2001). Retroviral approaches to gene therapy of cystic fibrosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 953(1), 43-52.
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles: properties, applications and toxicities. *Arab J Chem* 12: 908.
- Khoei, S., & Yaghoobian, M. (2017). Chapter 6 - Niosomes: a novel approach in modern drug delivery systems. In E. Andronescu & A. M. Grumezescu (Eds.), *Nanostructures for Drug Delivery* (pp. 207–237). Elsevier.

- Klink, D. T., Glick, M. C., & Scanlin, T. F. (2001). Gene therapy of cystic fibrosis (CF) airways: a review emphasizing targeting with lactose. *Glycoconjugate journal*, 18(9), 731-740.
- Knowles, M. R., Hohneker, K. W., Zhou, Z., Olsen, J. C., Noah, T. L., Hu, P. C., ... & Boucher, R. C. (1995). A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 333(13), 823-831.
- Kolonko, A. K., Efinger, J., González-Espinosa, Y., Bangel-Ruland, N., van Driessche, W., Goycoolea, F. M., & Weber, W. M. (2020). Capsaicin-Loaded Chitosan Nanocapsules for wtCFTR-mRNA Delivery to a Cystic Fibrosis Cell Line. *Biomedicines*, 8(9), 364.
- Kushwah, R., Cao, H., & Hu, J. (2008). Characterization of pulmonary T cell response to helper-dependent adenoviral vectors following intranasal delivery. *The Journal of Immunology*, 180(6), 4098-4108.
- Kustikova, O., Brugman, M., & Baum, C. (2010, August). The genomic risk of somatic gene therapy. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 20, No. 4, pp. 269-278). Academic Press.
- Ley 1392 de 2010. Por medio de la cual se reconocen las enfermedades huérfanas como de especial interés y se adoptan normas tendientes a garantizar la protección social por parte del Estado colombiano a la población que padece de enfermedades huérfanas y sus cuidadores. 2 de julio de 2010. DO: 47.758
- Ley 1438 de 2011. Por medio de la cual se reforma el sistema general de seguridad social en salud y se dictan otras disposiciones. 19 de enero de 2011. DO: 47.957
- Loza, L. I. M., Cooney, A. L., Dong, Q., Randak, C. O., Rivella, S., Sinn, P. L., & McCray Jr, P. B. (2021). Increased CFTR expression and function from an optimized lentiviral vector for cystic fibrosis gene therapy. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 21, 94-106.

- Martini, S. V., Rocco, P. R. M., & Morales, M. M. (2011). Adeno-associated virus for cystic fibrosis gene therapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44, 1097-1104.
- Mastorakos, P., Da Silva, A. L., Chisholm, J., Song, E., Choi, W. K., Boyle, M. P., ... & Suk, J. S. (2015). Highly compacted biodegradable DNA nanoparticles capable of overcoming the mucus barrier for inhaled lung gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(28), 8720-8725.
- Mateus Arbelaez, H. E., Fonseca-Mendoza, D. J., & Silva, M. (2010). Fibrosis quística afectaría a uno de cada cinco mil recién nacidos. Universidad del Rosario.
- Miah, K. M., Hyde, S. C., & Gill, D. R. (2019). Emerging gene therapies for cystic fibrosis. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 13(8), 709-725.
- Ministerio de Salud y Protección Social, & Colciencias. (2014). Guía de Práctica Clínica para la prevención, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación de Fibrosis Quística. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/IETS/GPC-Fibrosis-Quistica-Completa.pdf>
- Mitomo, K., Griesenbach, U., Inoue, M., Somerton, L., Meng, C., Akiba, E., ... & Alton, E. W. (2010). Toward gene therapy for cystic fibrosis using a lentivirus pseudotyped with Sendai virus envelopes. *Molecular Therapy*, 18(6), 1173-1182.
- Montier, T., Delepine, P., Pichon, C., Ferec, C., Porteous, D. J., & Midoux, P. (2004). Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. *Trends in biotechnology*, 22(11), 586-592.
- Moss, R. B., Milla, C., Colombo, J., Accurso, F., Zeitlin, P. L., Clancy, J. P., ... & Heald, A. E. (2007). Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Human gene therapy*, 18(8), 726-732.
- Moss, R. B., Rodman, D., Spencer, L. T., Aitken, M. L., Zeitlin, P. L., Waltz, D., ... & Heald, A. E. (2004). Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest*, 125(2), 509-521.

- Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D., & Cummings, B. S. (2020). Safe nanoparticles: Are we there yet?. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 385.
- Nayerossadat, N., Maedeh, T., & Ali, P. A. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced biomedical research*, 1.
- Olalla, R., & Tercero, J. (2007). Uso compasivo de medicamentos. *Offarm*, 26(4), 94–97.
- Osman, G., Rodriguez, J., Chan, S. Y., Chisholm, J., Duncan, G., Kim, N., ... & Dixon, J. E. (2018). PEGylated enhanced cell penetrating peptide nanoparticles for lung gene therapy. *Journal of controlled release*, 285, 35-45.
- Pan, H., Deutsch, G. H., & Wert, S. E. (2019). Comprehensive anatomic ontologies for lung development: A comparison of alveolar formation and maturation within mouse and human lung. *Journal of biomedical semantics*, 10(1), 1-21.
- Paredes, F., & Fernández, J. (2002). La terapia génica. *Medicina Integral*, 40(4), 159–162. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-la-terapia-genica-13036783>
- Pareja, M. L. (2017). Situación actual de las enfermedades huérfanas en Colombia 2017. *Revista CES Derecho*, 8(2), 231-241.
- Pringle, I. A., Hyde, S. C., & Gill, D. R. (2009). Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: recent developments and future prospects. *Expert opinion on biological therapy*, 9(8), 991-1003.
- Ramalho, A. S., Beck, S., Meyer, M., Penque, D., Cutting, G. R., & Amaral, M. D. (2002). Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 27(5), 619-627.
- Rang, C., Kotsimbos, T., & Wilson, J. (2020). Overview of CFTR Modulators and Gene Therapy. In *Cystic Fibrosis-Heterogeneity and Personalized Treatment*. IntechOpen.
- Ranzani, M., Annunziato, S., Adams, D. J., & Montini, E. (2013). Cancer gene discovery: exploiting insertional mutagenesis. *Molecular Cancer Research*, 11(10), 1141-1158.

- Resolución 2292 de 2021. [Ministerio de Salud y Protección Social]. Por la cual se actualizan y establecen los servicios y tecnologías de salud financiados con recursos de la Unidad de Pago por Capitación (UPC). 23 de diciembre de 2021.
- Resolución 730 de 2020. [Ministerio de Salud y Protección Social]. Por la cual se establecen disposiciones para la presentación y aprobación de los protocolos de investigación clínica con medicamentos, en el marco de la Emergencia Sanitaria generada por el Covid-19. 8 de mayo de 2020.
- Reynolds, P. N., Feng, M., & Curiel, D. T. (1999). Chimeric viral vectors—the best of both worlds?. *Molecular medicine today*, 5(1), 25-31.
- Ringshausen, FC, Hellmuth, T. y Dittrich, A. (2020). Was ist gesichert in der Therapie der Mukoviszidose?. *Internist* 61, 1212-1229 .  
<https://doi.org/10.1007/s00108-020-00896-9>
- Rosewell, A., Vetrini, F., & Ng, P. (2011). Helper-dependent adenoviral vectors. *Journal of genetic syndrome & gene therapy*.
- Sainz-Ramos, M., Gallego, I., Villate-Beitia, I., Zarate, J., Maldonado, I., Puras, G., & Pedraz, J. L. (2021). How far are non-viral vectors to come of age and reach clinical translation in gene therapy?. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7545.
- Sainz-Ramos, M., Villate-Beitia, I., Gallego, I., Qtaish, N. A., Lopez-Mendez, T. B., Eritja, R., ... & Pedraz, J. L. (2020). Non-viral mediated gene therapy in human cystic fibrosis airway epithelial cells recovers chloride channel functionality. *International Journal of Pharmaceutics*, 588, 119757.
- Sanders, D. B., & Fink, A. K. (2016). Background and epidemiology. *Pediatric Clinics*, 63(4), 567-584.
- Servicio Nacional de Salud de Reino Unido (NHS). (2021). Treatment of Cystic fibrosis.  
<https://www.nhs.uk/conditions/cystic-fibrosis/treatment/>
- Shahryari, A., Burtscher, I., Nazari, Z., & Lickert, H. (2021). Engineering Gene Therapy: Advances and Barriers. *Advanced Therapeutics*, 4(9), 2100040.

- Shaji, J., & Patole, V. (2008). Protein and peptide drug delivery: oral approaches. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 70(3), 269.
- Sharma, A., Jacob, A., Tandon, M., & Kumar, D. (2010). Orphan drug: Development trends and strategies. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2(4), 290.
- Simmonds, N. J. (2019). Is it cystic fibrosis? The challenges of diagnosing cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews*, 31, 6-8.
- Soares, D. C. F., Domingues, S. C., Viana, D. B., & Tebaldi, M. L. (2020). Polymer-hybrid nanoparticles: Current advances in biomedical applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110695.
- Steeds, K., Hall, Y., Slack, G. S., Longet, S., Strecker, T., Fehling, S. K., ... & Carroll, M. W. (2020). Pseudotyping of VSV with Ebola virus glycoprotein is superior to HIV-1 for the assessment of neutralising antibodies. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.
- Tang, Y., Yan, Z., & Engelhardt, J. F. (2020). Viral vectors, animal models, and cellular targets for gene therapy of cystic fibrosis lung disease. *Human Gene Therapy*, 31(9-10), 524-537.
- Taylor-Parker, J. (2016, March 31). Addgene. Plasmids: Terminators and PolyA Signals.
- Thapa, B., & Narain, R. (2016). Mechanism, current challenges and new approaches for non viral gene delivery. In *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy* (pp. 1-27). Woodhead Publishing.
- Translate Bio. (2021, March 17). Translate Bio Announces Results from Second Interim Data Analysis from Ongoing Phase 1/2 Clinical Trial of MRT5005 in Patients with Cystic Fibrosis (CF). Press Releases. <https://investors.translate.bio/news-releases/news-release-details/translate-bio-announces-results-second-interim-data-analysis>
- Van Haasteren, J., Hyde, S. C., & Gill, D. R. (2018). Lessons learned from lung and liver in-vivo gene therapy: implications for the future. *Expert opinion on biological therapy*, 18(9), 959-972.

- Vásquez, C., Aristizábal, R., & Daza, W. (2010). Fibrosis quística en Colombia. *Hipertensión*, 1, 0-8.
- Veit, G., Avramescu, R. G., Chiang, A. N., Houck, S. A., Cai, Z., Peters, K. W., ... & Lukacs, G. L. (2016). From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Molecular biology of the cell*, 27(3), 424-433.
- Velino, C., Carella, F., Adamiano, A., Sanguinetti, M., Vitali, A., Catalucci, D., ... & Iafisco, M. (2019). Nanomedicine approaches for the pulmonary treatment of cystic fibrosis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 406.
- Villate-Beitia, I., Zarate, J., Puras, G., & Pedraz, J. L. (2017). Gene delivery to the lungs: pulmonary gene therapy for cystic fibrosis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(7), 1071-1081.
- Waehler, R., Russell, S. J., & Curiel, D. T. (2007). Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nature reviews genetics*, 8(8), 573-587.
- Wang, G., Slepushkin, V., Zabner, J., Keshavjee, S., Johnston, J. C., Sauter, S. L., ... & McCray, P. B. (1999). Feline immunodeficiency virus vectors persistently transduce nondividing airway epithelia and correct the cystic fibrosis defect. *The Journal of clinical investigation*, 104(11), R55-R62.
- Wu, H., Chaudhary, K. y Mahato, R. (2019). Gene Therapy. In B. M. Daan J. A. Crommelin, Robert D. Sindelar (Ed.), *Pharmaceutical Biotechnology* (Fifth, pp. 323–355).
- Xu, Y., Thakur, A., Zhang, Y., & Foged, C. (2021). Inhaled RNA therapeutics for obstructive airway diseases: recent advances and future prospects. *Pharmaceutics*, 13(2), 177.
- Yan, Z., Feng, Z., Sun, X., Zhang, Y., Zou, W., Wang, Z., ... & Engelhardt, J. F. (2017). Human bocavirus type-1 capsid facilitates the transduction of ferret airways by adeno-associated virus genomes. *Human gene therapy*, 28(8), 612-625.
- Yan, Z., Keiser, N. W., Song, Y., Deng, X., Cheng, F., Qiu, J., & Engelhardt, J. F. (2013). A novel chimeric adenoassociated virus 2/human bocavirus 1 parvovirus vector

efficiently transduces human airway epithelia. *Molecular Therapy*, 21(12), 2181-2194.

Yan, Z., McCray Jr, P. B., & Engelhardt, J. F. (2019). Advances in gene therapy for cystic fibrosis lung disease. *Human molecular genetics*, 28(R1), R88-R94.

Yan, Z., Zou, W., Feng, Z., Shen, W., Park, S. Y., Deng, X., ... & Engelhardt, J. F. (2019). Establishment of a high-yield recombinant adeno-associated virus/human bocavirus vector production system independent of bocavirus nonstructural proteins. *Human gene therapy*, 30(5), 556-570.

Yaniz-Galende, E., & Hajjar, R. J. (2014). Stem cell and gene therapy for cardiac regeneration. In *Cardiac Regeneration and Repair* (pp. 347-379). Woodhead Publishing.

Youngren-Ortiz, S. R., Gandhi, N. S., España-Serrano, L., & Chougule, M. B. (2016). Aerosol delivery of siRNA to the lungs. Part 1: rationale for gene delivery systems. *KONA Powder and Particle Journal*, 2016014.

Zhao, S., Jiang, E., Chen, S., Gu, Y., Shangguan, A. J., Lv, T., ... & Yu, Z. (2016). PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene encoding. *Translational lung cancer research*, 5(1), 120.

Ziello, J. E., Huang, Y., & Jovin, I. S. (2010). Cellular endocytosis and gene delivery. *Molecular Medicine*, 16(5), 222-229.

Zuckerman, J. B., Robinson, C. B., Shell, R., Sferra, T. J., Chirmule, N., Magosin, S. A., ... & Wilson, J. M. (1999). A phase I study of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to a lung segment of individuals with cystic fibrosis. *Human gene therapy*, 10(18), 2973-2985.

Zylberberg, C., Gaskill, K., Pasley, S., & Matosevic, S. (2017). Engineering liposomal nanoparticles for targeted gene therapy. *Gene therapy*, 24(8), 441-452.