MEMÒRIES
DE LA
REIAL ACADÈMIA DE CIÈNCIES I ARTS
DE BARCELONA

TERCERA ÈPOCA NÚM. 1067 VOL. LXIX NÚM. 1

TERÀPIA GÈNICA: UNA NOVA EINA PER AL TRACTAMENT DE MALALTIES MINORITÀRIES I D'ALTA PREVALENÇA

MEMÒRIA LLEGIDA PER L'ACADÈMICA ELECTA

Dra. FÀTIMA BOSCH I TUBERT

A l'acte de la seva recepció del dia 31 de març de 2022

DISCURS DE RESPOSTA PER L'ACADÈMIC NUMERARI

Excm. Sr. ERNEST GIRALT I LLEDÓ

Publicada el mes de març de 2022

B A R C E L O N A
2 0 2 2

© RACAB 2022
1a edició: març de 2022
Tiratge: 400 exemplars
DL: B-2020-59
ISSN: 2462-3334
Maquetació i impressió: 9.disseny s.l.

Són rigorosament prohibides, sense l'autorització escrita dels titulars del *copyright*, la reproducció total o parcial d'aquesta obra per qualsevol procediment i suport, incloent-hi la reprografia i el tractament informàtic, la distribució d'exemplars mitjançant lloguer o préstec comercial, la inclusió total o parcial en bases de dades i la consulta a través de xarxa telemàtica o d'Internet. Les infraccions d'aquests drets estan sotmeses a les sancions establertes per les lleis.

— 3 —

TERÀPIA GÈNICA: UNA NOVA EINA PER AL TRACTAMENT DE MALALTIES MINORITÀRIES I D'ALTA PREVALENÇA

MEMÒRIA LLEGIDA PER L'ACADÈMICA ELECTA

Dra. FÀTIMA BOSCH I TUBERT

A l'acte de la seva recepció del dia 31 de març de 2022

Excel·lentíssim Senyor President,
Excel·lentíssimes Senyores i Senyors Acadèmics,
Senyores i senyors:

És per a mi un gran honor i un plaer presentar la meva memòria de recepció a la Reial Acadèmia de Ciències i Arts de Barcelona en aquest acte. En primer lloc voldria mostrar el meu profund agraïment a tots els seus excel·lentíssims membres per haver-me elegit, molt especialment, al doctor Josep Font, que ha impulsat la meva candidatura per ser membre de l'Acadèmia des de l'inici i que ha estat un gran suport al llarg d'aquests anys. Em comprometo així a aportar el meu granet de sorra per mantenir l'altíssim nivell de l'Acadèmia contribuint en la seva tasca de formació i divulgació en l'àmbit de la ciència i la cultura de la societat catalana.

Permetin-me també expressar el meu agraïment a les diverses persones i institucions que han estat al meu voltant al llarg de la meva carrera científica. Tot el que he assolit professionalment no ho hauria pogut fer sola, sinó que és el resultat del seu suport. A l'inici, el doctor Joan Guinovart fou qui em va introduir en el camp de la recerca científica com a director de la meva tesi doctoral. Posteriorment, per tal de començar una nova carrera com a investigadora independent, vaig marxar als Estats Units, on vaig fer una estada al laboratori del doctor Richard W. Hanson, a la Universitat de Case Wester Reserve, a Cleveland, Ohio. En aquest laboratori vaig aprendre les bases de la manipulació genètica animal i les tecnologies d'obtenció d'animals transgènics; així mateix, em vaig familiaritzar amb els primers vectors virals per a la transferència de gens a teixits. Aquells eren uns moments molt especials: els del naixement del camp de la teràpia gènica. A ell, d'una manera molt especial, vull agrair-li haver-me introduït en aquest camp que tant em fascina. També vull expressar el meu sincer agraïment a la Universitat Autònoma de Barcelona i als seus membres per haver-me permès formar i dirigir un grup de recerca compost per uns joves investigadors molt brillants, amb els quals, al llarg dels anys, amb seu esforç i entusiasme, hem pogut anar avançant en el desenvolupament de diversos projectes. Per tant, no seria correcte acceptar aquest honor sense fer-lo extensiu també a tots els membres del meu equip passats i presents. Moltes gràcies a tots ells. Molts altres

professors de la UAB han estat clau en el programa translacional que hem desenvolupat i molt especialment voldria agrair el suport incondicional del doctor Jesús Ruberte, de tots els companys de la Facultat de Veterinària i del doctor Francesc Gòdia, amb qui amb gran entusiasme hem fundat una nova companyia spin-off a partir de la nostra recerca. També, moltes gràcies a tot l'equip d'Esteve Pharmaceuticals, especialment al doctor Eduard Valentí, per confiar en nosaltres.

En el terreny més personal, vull agrair a tots el amics, i en especial a la meva amiga la doctora Josefina Plaixats, que hagin estat al meu costat animant-me en tot moment. Finalment, infinites gràcies al meu fantàstic fill Ramon pel seu suport i comprensió, especialment quan era molt jove i tenia una mare sempre força enfeinada, però, sobretot, per la complicitat d'aquests últims anys en què s'ha convertit en el meu principal assessor en els projectes translacionals; i, per descomptat, gràcies també a la seva dona, la meva nova filla, la Cristina, que ha portat molta alegria a les nostres vides. Per acabar, no podré agrair mai prou als meus pares, Joan i Agustina, tot el que van fer per mi. El seu exemple m'ha guiat sempre.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. La teràpia gènica: una nova eina que permetrà curar malalties que fins ara no tenien un tractament eficaç

La teràpia gènica consisteix en la transferència de gens amb finalitats terapèutiques. Al principi, va sorgir per al tractament de les *malalties genètiques minoritàries* (també anomenades *malalties rares*), les quals no es poden curar mitjançant les teràpies que utilitzen medicaments convencionals i, sovint, ni tan sols manifesten cap millora significativa pel que fa a la simptomatologia. En principi, amb la restauració d'una còpia correcta del gen mutat, la teràpia gènica permetria que molts pacients sense cap esperança de millora —o, en molts casos, de sobreviure més enllà de pocs anys de vida i en unes condicions molt dolentes— poguessin gaudir d'una vida llarga i en condicions de normalitat. Recentment, molts estudis clínics han aportat proves inqüestionables d'eficàcia i seguretat d'aproximacions de teràpia gènica per a un gran nombre de malalties *monogèniques*.

Després d'haver superat molts dels reptes que van dificultar l'èxit de la teràpia gènica en els seus primers anys, la tecnologia ha ampliat el seu ventall d'aplicacions potencials, que va des de malalties monogèniques complexes a malalties no hereditàries i d'alta prevalença en la població, com poden ser diferents tipus de càncer, malalties cardiovasculars, l'Alzheimer o la diabetis *mellitus*. Aquestes malalties *majoritàries* són sobretot el resultat de l'efecte de diversos factors ambientals (dietes hipercalòriques, contaminació ambiental, estils de vida poc saludables…), tot i que en alguns casos el component genètic també hi pot contribuir.

La teràpia gènica representa, doncs, una eina prometedora per al tractament més eficaç d'algunes d'aquestes malalties que les teràpies convencionals amb medicaments no poden assolir. Aquesta teràpia consisteix en la transferència de material genètic a cèl·lules o teixits per prevenir o curar una malaltia. Dins la teràpia gènica, es poden distingir dos grans tipus d'aproximacions. En primer lloc, la *teràpia gènica 'in vivo'*, que es basa en la introducció d'un gen terapèutic a un vector (o vehicle) que després s'administra directament al pacient; aquest vector transferirà el gen d'interès al teixit diana que produirà la proteïna terapèutica. I, en segon lloc, la *teràpia gènica 'ex vivo'*, basada en la transferència del vector que porta el gen terapèutic a cèl·lules en cultiu obtingudes del mateix pacient; posteriorment, un cop aquestes cèl·lules són manipulades genèticament, es reintrodueixen al pacient per produir la proteïna terapèutica (figura 1).

En el disseny d'una aproximació de teràpia gènica, s'han de tenir en compte diversos aspectes clau. Primerament, cal seleccionar el *gen terapèutic* per tractar la malaltia. Després, aquest gen ha de ser transportat mitjançant un vehicle o *vector* fins a la *cèl·lula diana* que serà l'encarregada d'expressar la proteïna terapèutica.

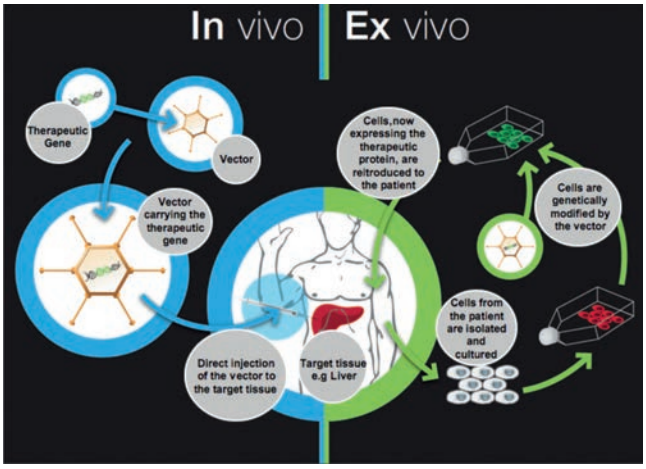

Fig. 1. Representació esquemàtica de les teràpies gèniques *in vivo* i *ex vivo*.

Per assolir la transferència del gen terapèutic a la cèl·lula diana, també s'ha de tenir en compte la *via d'administració* mitjançant la qual el vector s'introduirà al pacient per tal d'arribar a la seva destinació. Finalment, cal disposar de *models animals* de les malalties humanes que s'han de tractar en els quals es pugui assajar l'eficàcia i la seguretat de l'aproximació de teràpia gènica (figura 2). Els models animals més emprats són, principalment, ratolins manipulats genèticament perquè siguin deficitaris

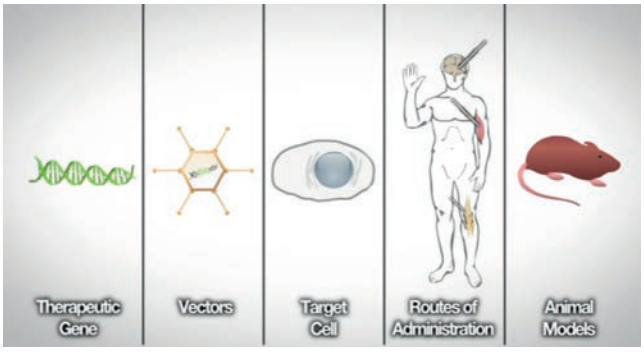

Fig. 2. Aspectes clau que cal tenir en compte a l'hora de dissenyar una estratègia de teràpia gènica. En primer lloc, s'ha d'escollir el gen terapèutic que es transferirà, segons la malaltia, i, a continuació, el vector que transportarà el gen d'interès a un teixit diana. Així mateix, serà molt important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

per al gen causant de la malaltia (ratolins *knock-out).* Tanmateix, també s'utilitzen rates model de malalties i, sobretot en fases avançades dels estudis preclínics, abans d'arribar a la clínica amb pacients humans, s'assagen les estratègies terapèutiques en models animals grans, com, per exemple, primats no humans o gossos.

1.2. Teràpia gènica 'in vivo' mitjançada per vectors virals adenoassociats

El gen terapèutic es transporta a les cèl·lules diana dins d'un vector. En els darrers anys, s'han desenvolupat un gran nombre de vectors, cadascun dels quals presenta unes característiques determinades. L'elecció d'un vector o un altre depèn de factors com el teixit diana que es manipularà o el tipus de tractament —crònic o a curt termini— que pot requerir la malaltia. Segons l'origen dels vectors, es poden distingir dos grans grups: *vectors virals* i *vectors no virals.*

Els *vectors virals*, tal com indica el nom, deriven de virus. Els virus són agents infecciosos que han evolucionat fins a ser altament eficients en la transferència del seu material genètic a les cèl·lules hoste. La teràpia gènica aprofita aquesta característica dels virus per introduir gens terapèutics a les cèl·lules diana. Amb aquesta finalitat, els gens virals són substituïts pel gen terapèutic, de manera que el virus esdevé un vector viral. L'estructura bàsica d'un vector viral consta d'una càpsida formada per proteïnes estructurals dins la qual hi ha l'àcid nucleic (gen terapèutic).

Entre els diferents vectors virals que s'han utilitzat per a introduir gens d'interès a les cèl·lules, els *vectors virals adenoassociats* (AAV) són els més emprats en les aproximacions de teràpia gènica *in vivo* (Wang *et al*., 2019). Aquests vectors AAV deriven de virus que no causen malalties ni en animals ni en humans i, per tant, es consideren vectors segurs per a la teràpia gènica. El genoma dels virus adenoassociats està format per DNA de cadena senzilla. Després d'entrar a la cèl·lula per endocitosi, la partícula viral allibera la molècula de DNA al nucli cel·lular, on es converteix en una molècula de DNA de cadena doble, que persisteix com a DNA episòmic al llarg de diversos anys en el nucli de les cèl·lules que no es divideixen. Com a resultat d'això, aquests vectors AAV són capaços de produir alts nivells de proteïna terapèutica a la cèl·lula diana, i aquesta expressió es pot mantenir a molt llarg termini (anys) en teixits amb una taxa de divisió cel·lular baixa, com el fetge en adults, el múscul esquelètic o el cervell. S'han descrit diversos serotips d'AAV que mostren variacions en el seu tropisme per a diferents cèl·lules i teixits. La principal limitació d'aquests vectors és la seva mida petita, ja que només poden empaquetar un gen terapèutic de fins a 4,5 kb (figura 3).

A més, els vectors AAV presenten excel·lents perfils de seguretat en estudis clínics, pel fet de tenir una baixa toxicitat i immunogenicitat, que permet l'expressió a llarg termini del gen terapèutic (Wang *et al*., 2019). Tant en nombrosos models animals, com també en pacients humans, s'han obtingut diverses «proves de concepte» que

demostren l'eficaç transferència de gens mitjançant vectors AAV a diversos òrgans com el cervell, el fetge, el múscul esquelètic, l'ull, el ronyó, el pàncrees, el cor o el teixit adipós. Actualment, tres de les set aproximacions de teràpia gènica que han obtingut l'aprovació per a ser comercialitzades es basen en vectors AAV (Mendell *et al*., 2020).

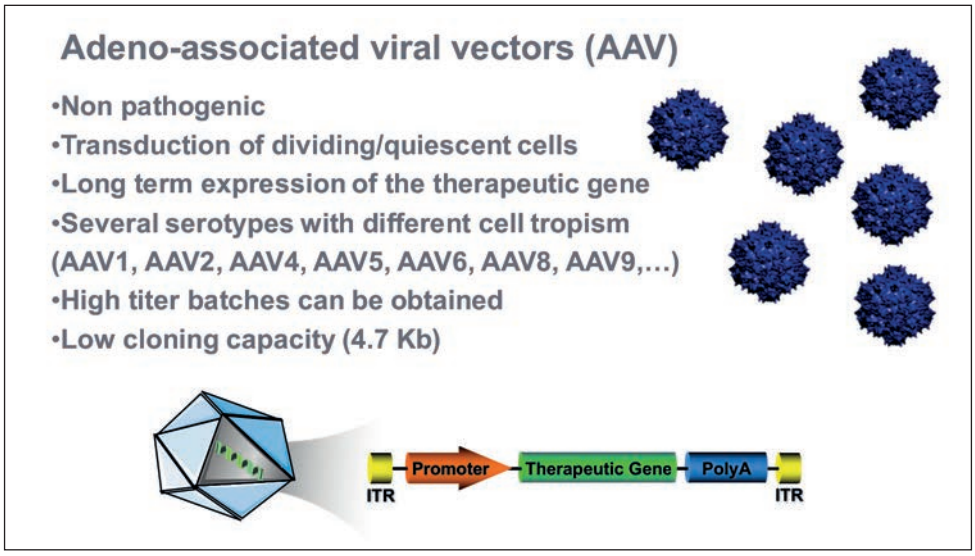

Fig. 3. Característiques principals dels vectors adenoassociats (AAV). A la part inferior es mostra de manera esquemàtica la composició bàsica del genoma d'un vector AAV, on el gen terapèutic està sota el control d'un promotor específic que es troba entre les dues seqüències ITR (*inverted terminal repeats*)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

2. TERÀPIA GÈNICA PER AL TRACTAMENT DE LES MALALTIES MINORITÀRIES

2.1. Malalties rares, models animals i teràpia gènica

Les malalties rares suposen un important problema de salut pública, ja que la majoria d'elles són molt discapacitants, disminueixen l'esperança de vida, afecten les capacitats físiques i mentals i redueixen dràsticament la qualitat de vida dels pacients. Moltes causen la mort dels pacients a edats molt primerenques i sovint també s'associen a la síndrome d'esgotament de la persona cuidadora. A la Unió Europea hi ha més de trenta milions d'individus afectats per una de les més de sis mil malalties rares descrites fins ara. Tot i que la prevalença combinada estimada de les malalties minoritàries a la població europea supera el 7 %, encara hi ha un nombre molt limitat de medicaments orfes comercialitzats, i la gran majoria d'aquestes malalties no tenen cap tractament eficaç.

Atès que el 80 % de les malalties rares tenen un origen genètic, la transferència gènica de la seqüència codificadora correcta de la proteïna alterada als teixits afectats seria per si mateixa curativa. Per tant, en aquests casos s'espera un benefici significatiu de la teràpia gènica respecte a les estratègies terapèutiques existents o d'altres en desenvolupament. En concret, la teràpia gènica *in vivo* mitjançada per vectors AAV ofereix la possibilitat d'un tractament puntual, amb la possibilitat d'efectes beneficiosos per a tota la vida, ja que la producció de la proteïna terapèutica durant períodes de temps prolongats després d'una única administració del producte de teràpia gènica ha estat repetidament demostrada en diversos models animals i en pacients humans (Buchlis *et al*., 2012; Jaén *et al*., 2017; Mingozzi i High, 2011; Nathwani *et al*., 2011). Actualment, set teràpies basades en gens ja han rebut l'autorització de comercialització per part dels organismes reguladors d'Europa (Agència Europea del Medicament, EMA) i dels Estats Units (Food and Drug Administration, FDA) (Mendell *et al*., 2020). A més, cal esperar que el progrés d'aquests últims anys en l'àmbit clínic continuarà alimentant el nombre de les anomenades «teràpies avançades» (*advanced therapy medicinal product*, ATMP) que s'aprovaran en un futur proper. No obstant això, tot i els resultats prometedors que sorgeixen dels assajos clínics de productes de teràpia gènica, el repte continua sent enorme, ja que les malalties hereditàries rares es compten a milers i totes juntes representen un cost social i econòmic immens, així com una gran necessitat mèdica.

El descobriment de nous productes de teràpia gènica ha d'estar basat en estudis de prova de concepte *in vivo* en animals model que comprenen les característiques principals de la malaltia humana. Aquests estudis tenen com a objectiu demostrar una eficàcia duradora en els òrgans diana més importants i, també, la seguretat de la teràpia gènica proposada. Per a la majoria de malalties rares, no hi ha models animals naturals disponibles i el desenvolupament d'estratègies terapèutiques per a aquestes

malalties depèn de la generació d'animals modificats genèticament. En el nostre grup, al llarg de tots aquests anys hem desenvolupat i caracteritzat fenotípicament un gran nombre de nous animals model en els quals assagem les nostres aproximacions de teràpia gènica. Això també ha estat possible gràcies al fet de formar part des de fa més de quinze anys de grans consorcis de fenotipatge de ratolins a escala global (International Mouse Phenotyping Consortium, IMPC, *https://www.mousephenotype.org/*) i de la Unió Europea (Infrafrontier, *https://www.infrafrontier.eu/*).

Així doncs, el programa de teràpia gènica, basat en la utilització de vectors AAV, que estem desenvolupant en el nostre grup per al tractament d'un gran nombre de malalties minoritàries, se centra, en primer lloc, a dur a terme estudis preclínics d'eficàcia i seguretat de les diferents aproximacions terapèutiques en els ratolins model de les malalties, que hem generat i caracteritzat (Haurigot *et al*., 2013; Motas *et al*., 2016; Ribera *et al*., 2015; Roca *et al*., 2017; Ruzo *et al*., 2012*a*; Ruzo *et al*., 2012*b*). Un cop testada l'aproximació de teràpia gènica en els ratolins model de les malalties, ens centrem a estudiar la biodistribució, la seguretat i la durabilitat de l'expressió a llarg termini dels productes de teràpia gènica desenvolupats en animals grans (gossos Beagle) (Haurigot *et al*., 2013; Jaén *et al*., 2017; Ribera *et al*., 2015). Es tracta d'una investigació translacional que vol progressar de manera ràpida i optimitzada, des de la preclínica cap a desenvolupaments no clínics (contribuir a la part reguladora, propietat intel·lectual, manufactura a gran escala de vectors AAV…) fins arribar a la clínica —el tractament de pacients humans (figura 4).

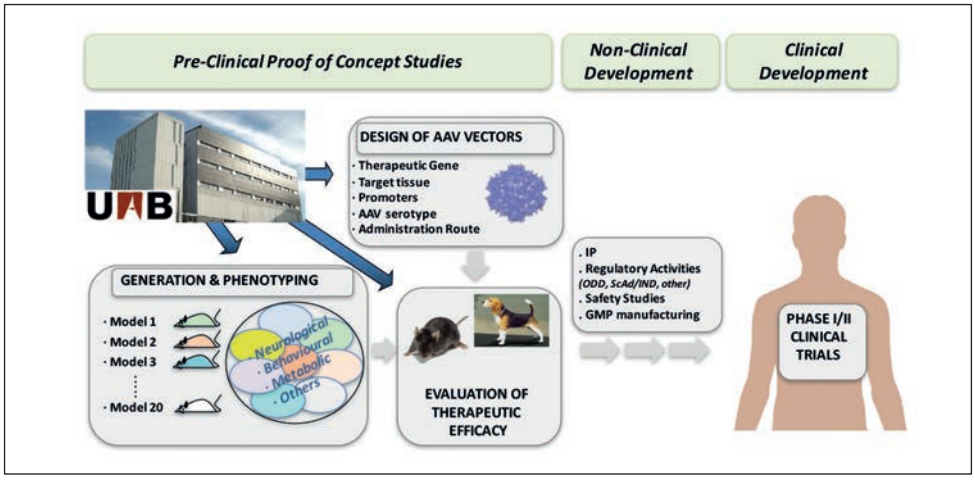

Fig. 4. Esquema de la investigació translacional que duu a terme el nostre grup per al tractament de malalties rares. Els nostres estudis impliquen tots els passos, que van dels assaigs preclínics de les noves teràpies gèniques en animals model de diferents malalties fins arribar finalment a la clínica en pacients humans.

La major part de les investigacions translacionals actuals en el camp de les malalties rares presenten un progrés lent en el desenvolupament de noves teràpies gèniques. Les nostres propostes des de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), en canvi, representen un enfocament més innovador i d'alt rendiment per al desenvolupament de noves teràpies, ja que disposem d'una gran expertesa, tant en la generació i la caracterització d'animals model modificats genèticament com en el desenvolupament de vectors AAV que permeten una transferència gènica eficient. A més, també comptem amb l'experiència d'altres grups de la UAB amb els quals col·laborem activament —en especial, de la Facultat de Veterinària, grans especialistes del camp de la morfologia, patologia o cirurgia animal, que ens ajuden també en els estudis en gossos. Tota aquesta expertesa ens permet anar molt de pressa i abordar el tractament d'un gran nombre de malalties en paral·lel. Així, actualment, ja estem treballant en teràpies gèniques per al tractament d'unes quinze malalties minoritàries, que estan en graus de desenvolupament diversos. Per a quatre d'elles, ja hem obtingut la denominació de *medicament orfe* per part de l'EMA i la FDA en els productes de teràpia gènica desenvolupats per als seus tractaments. A més, una de les nostres teràpies ja ha arribat als pacients, en fase clínica I/II.

En aquesta part de la memòria es presenten els resultats dels nostres estudis per al tractament amb teràpia gènica d'un grup de malalties rares molt greus que formen part del que es coneix com a malalties d'emmagatzematge de macromolècules parcialment degradades en els lisosomes de les cèl·lules.

2.2. Malalties minoritàries d'emmagatzematge lisosòmic

Les malalties d'emmagatzematge lisosòmic o per dipòsit lisosòmic (LSD, *lysosomal storage disorders*) són un grup d'aproximadament cinquanta malalties rares que tenen com a resultat alteracions de la funció dels lisosomes (Leal *et al*., 2020). Els lisosomes són orgànuls cel·lulars destinats a la digestió de proteïnes, àcids nucleics, hidrats de carboni i alguns lípids. Aquests orgànuls presenten un lumen àcid (pH de 4,5-5,0) limitat per una bicapa lipídica. El seu interior conté una gran quantitat d'hidrolases àcides que estan implicades en la digestió de diferents substrats. Aquestes alteracions dels lisosomes són causades per defectes genètics en gens que codifiquen per enzims lisosòmics, els seus cofactors o per proteïnes que participen en el transport de proteïnes al lisosoma. Com a conseqüència d'això, molècules parcialment digerides o substrats sencers s'acumulen progressivament a l'interior d'aquests orgànuls (figura 5). Aquesta acumulació acaba provocant la distensió lisosòmica i, de retruc, un dany cel·lular progressiu que finalment dona lloc a la mort cel·lular (Platt, 2018).

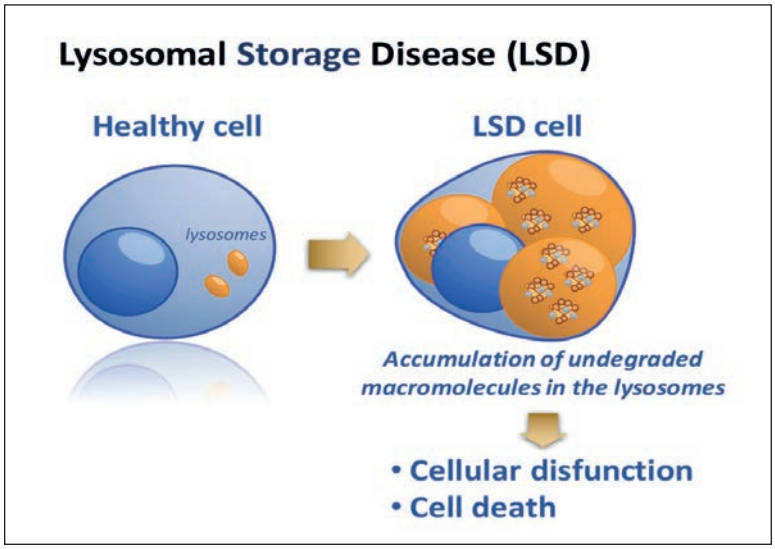

Fig. 5. Característica principal de les LSD. En aquestes malalties, es produeix una acumulació progressiva de macromolècules no degradades en els lisosomes que altera el funcionament de les cèl·lules i pot portar finalment a la seva mort.

La majoria dels pacients amb LSD neixen aparentment sans i els símptomes es presenten d'una manera progressiva. La velocitat i la severitat d'aparició dels símptomes depenen de molts factors: el substrat que s'acumula, el tipus cel·lular en què es produeix aquest dipòsit o la mutació genètica causant de la malaltia. Diferents mutacions en un mateix gen poden donar lloc a una forma més o menys severa d'una mateixa malaltia i provocar una aparició més o menys primerenca d'aquesta, ja que poden ocasionar una major o menor pèrdua del grau de funcionalitat de la proteïna.

Tot i que cada LSD està causada per mutacions en un gen determinat, la conseqüència d'aquestes mutacions porta les LSD a compartir la mateixa característica bioquímica: acumulació de substrats dins dels lisosomes. El tipus de substrat que s'acumula (mucopolisacàrids, esfingolípids, glicogen, colesterol, etc.) s'utilitza per a classificar els diferents tipus de LSD (Platt, 2018) (figura 6). A més, algunes de les LSD es classifiquen en subtipus en funció de la seva severitat, del moment d'aparició de la malaltia (formes infantil, juvenil o adulta) o del gen mutat encarregat de la degradació seqüencial d'un mateix substrat. En el nostre grup ens hem centrat sobretot en el desenvolupament de teràpies gèniques per al tractament de les mucopolisacaridosis (MPS) de tipus II, tipus III (subtipus A, B, C, D) i tipus IV (subtipus A) (figura 6).

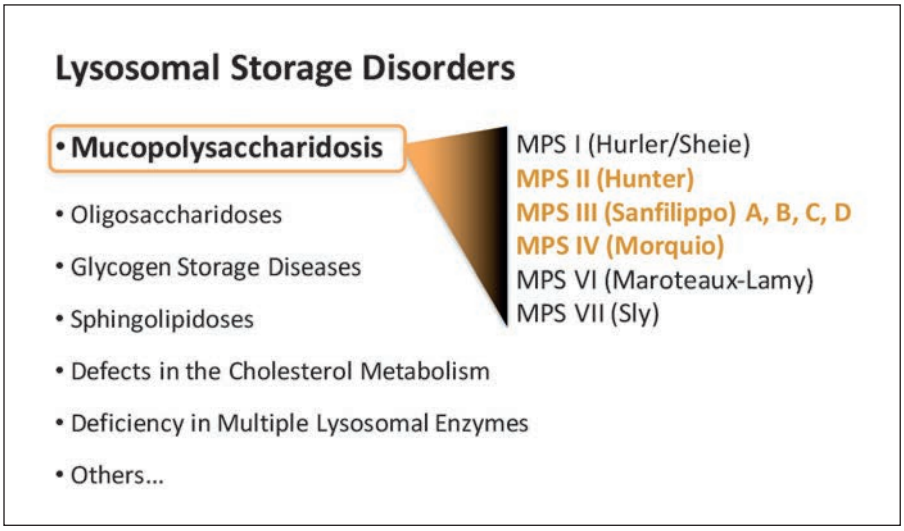

Fig. 6. Classificació general de les LSD segons els substrats que s'acumulen.

Els enzims lisosòmics se sintetitzen en el reticle endoplasmàtic i, posteriorment, es transporten a l'aparell de Golgi, on reben una modificació posttraduccional que consisteix en la unió de residus de mannosa-6-fosfat (M6P). Aquests residus són reconeguts per receptors de M6P a l'aparell de Golgi, on s'empaqueten en vesícules de clatrina, les quals es fusionaran amb els endosomes (Braulke i Bonifacino, 2009). A l'interior d'aquests, els receptors M6P s'alliberaran dels seus lligands per acidificació del medi i podran ser reciclats novament cap a l'aparell de Golgi o cap a la membrana plasmàtica de la cèl·lula. Finalment, els endosomes es fusionaran amb els lisosomes, on els enzims s'han de sotmetre als últims passos de maduració per tal d'adquirir la seva forma plenament activa. No obstant això, aquestes hidrolases àcides també poden ser captades per via indirecta mitjançant endocitosi a través dels receptors M6P presents a la membrana plasmàtica de la cèl·lula. Aquests receptors són capaços de captar els enzims amb el lligand de M6P que es troben en el medi extracel·lular. Així, les hidrolases àcides sintetitzades en una cèl·lula no només poden dur a terme la seva acció en aquesta mateixa cèl·lula, sinó que també poden ser secretades al medi extracel·lular o a la circulació sanguínia per ser captades per una cèl·lula que presenti el receptor de M6P a la seva membrana plasmàtica. Aquesta forma indirecta d'incorporar els enzims lisosòmics permet l'anomenada *correcció encreuada* (*cross-correction*) (figura 7). Aquest fenomen consisteix en el fet que els enzims lisosòmics no només actuen en la mateixa cèl·lula productora sinó que a més poden fer-ho en altres cèl·lules deficients per a aquests enzims i aquesta és la base de les teràpies que s'estan desenvolupant per a la majoria de les LSD.

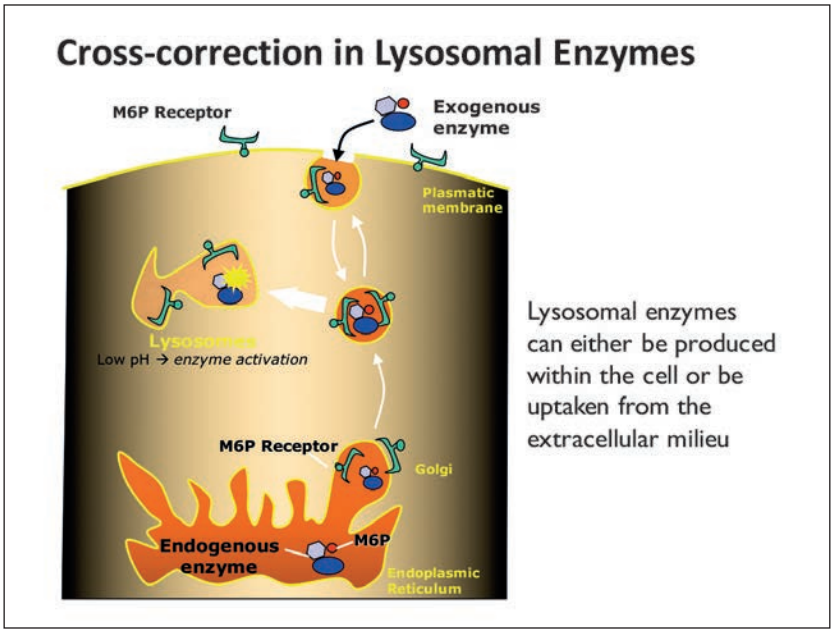

Fig. 7. Mecanisme de correcció encreuada. Les hidrolases àcides produïdes en una cèl·lula poden exercir la seva funció en la mateixa cèl·lula que les sintetitza (via directa) o ser secretades al medi extracel·lular i a la circulació sanguínia, i aleshores poden ser captades per cèl·lules veïnes o distants que expressin el receptor de M6P en la membrana plasmàtica, i exercir la seva funció digestiva en aquestes cèl·lules (via indirecta).

Per a la majoria de malalties d'emmagatzematge lisosòmic no hi ha cura. La teràpia gènica *in vivo* és una eina atractiva per al tractament de les LSD causades per deficiències d'enzims lisosòmics que són secretables (Parenti *et al*., 2015). Això és així perquè, d'una banda, no és necessària la restauració completa de l'activitat enzimàtica normal d'una cèl·lula, atès que s'ha observat que la restauració d'un 10-20 % de l'activitat enzimàtica ja pot revertir les alteracions patològiques; d'altra banda —i a diferència d'altres malalties minoritàries— en les LSD no es requereix la transducció de totes les cèl·lules de l'òrgan afectat. Aquestes estratègies de teràpia gènica es basen en la correcció encreuada: un enzim lisosòmic soluble present al compartiment extracel·lular produït i secretat per una cèl·lula que ha estat modificada genèticament per un AAV pot ser captat per endocitosi quan s'uneix als receptors de M6P presents a la membrana plasmàtica i permet la correcció d'altres cèl·lules que no han estat transduïdes (cèl·lules veïnes, altres cèl·lules de l'òrgan diana o, fins i tot, d'altres òrgans del cos, en el cas que l'enzim arribi als fluids principals, com el sèrum i el líquid cefalorraquidi (LCR))(Nagree *et al*., 2019) (figura 8).

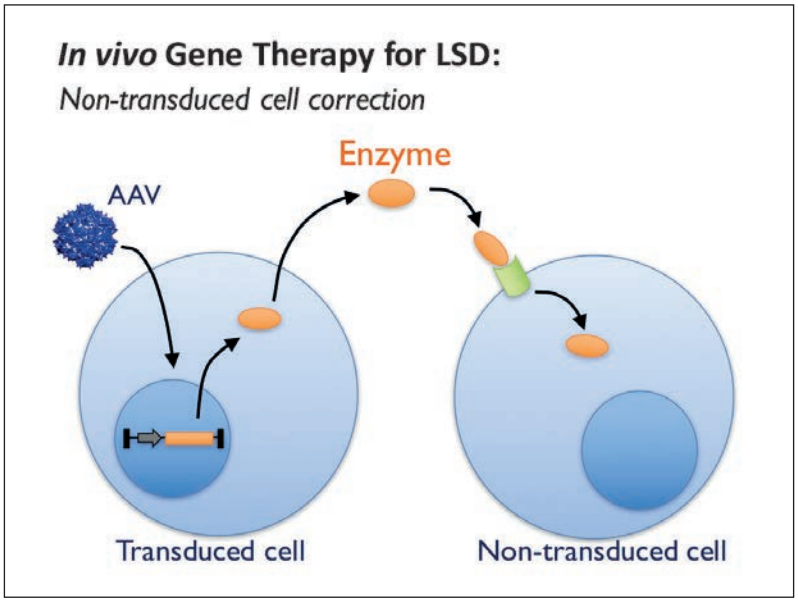

Figura 8. Teràpia gènica *in vivo* per a LSD. Es basa en el principi de correcció encreuada per aconseguir corregir la manca d'activitat enzimàtica de totes les cèl·lules d'un òrgan afectat. Gràcies a la distribució pels fluids corporals (sang, líquid cefalorraquidi, etc.) dels enzims secretats per les cèl·lules manipulades genèticament (transduïdes pel vector AAV), es pot arribar a obtenir una correcció de tot l'organisme d'un pacient.

El nostre grup ha desenvolupat amb èxit estratègies de teràpia gènica *in vivo* per a quatre LSD neurodegeneratives (MPSII, MPSIIIA, IIIB i IIID) i per a una LSD que afecta el sistema esquelètic (MPSIVA). Aquest projecte es va iniciar gràcies a la interacció amb l'associació de famílies afectades de MPS (MPS España). La nostra relació amb ells durant més de dotze anys ens ha inspirat i motivat a treballar molt activament per tal de trobar una solució per a aquestes malalties tan greus.

3. TERÀPIA GÈNICA PER A LES MUCOPOLISACARIDOSIS

Una part important de la nostra investigació s'ha centrat en el desenvolupament de nous enfocaments de teràpia gènica basats en AAV per al tractament de les mucopolisacaridosis (MPS), un grup de malalties devastadores d'emmagatzematge lisosòmic causades per les deficiències enzimàtiques específiques que condueixen a l'acumulació intracel·lular de glicosaminoglicans (GAG) parcialment degradats a les cèl·lules.

La MPS tipus III (MPSIII), també coneguda com a *síndrome de Sanfilippo*, és un dels tipus més freqüents de MPS, sobretot a Europa, amb una herència autosòmica recessiva (Valstar *et al*., 2008). La síndrome de Sanfilippo es classifica en quatre subtipus diferents (A-D) segons l'enzim deficient implicat en la degradació gradual del GAG heparan sulfat (HS): la deficiència en *N*-sulfoglucosamina-sulfohidrolasa o sulfamidasa (SGSH) provoca el tipus IIIA; en α-*N*-acetilglucosaminidasa (NAGLU), el tipus IIIB; en acetil-CoA α-glucosaminida-acetiltransferasa (HGSNAT), el tipus IIIC, i en *N*-acetilglucosamina-6-sulfatasa (GNS), el tipus IIID. Com a conseqüència d'això, l'HS no degradat s'acumula als lisosomes de les cèl·lules, causa disfunció cel·lular i, finalment, s'esdevé la mort cel·lular. Tot i que l'enzim la deficiència del qual provoca cada subtipus de la síndrome de Sanfilippo (tipus A-D) és diferent, els quatre subtipus comparteixen mecanismes fisiopatològics comuns, així com signes clínics i un pronòstic similars. La MPSIII es caracteritza per ser una malaltia neurodegenerativa greu i progressiva. Hi ha, però, una afectació somàtica lleu, amb hepato- i esplenomegàlia, infeccions recurrents de l'orella i de les vies respiratòries superiors, diarrea freqüent i dismorfismes facials. La malaltia progressa amb l'edat, cosa que provoca la mort de les persones afectades, en general, durant la seva segona dècada de vida (Fedele, 2015; Valstar *et al*., 2008)Sanfilippo syndrome.

La MPS tipus II (MPSII), o *síndrome de Hunter*, és una LSD recessiva lligada al cromosoma X que afecta només els nens, causada per la deficiència d'iduronat-2-sulfatasa (IDS) (Wraith *et al*., 2008). Aquest enzim lisosòmic és essencial per a la degradació conjunta dels GAG HS i dermatan sulfat (DS). Es tracta també d'un altre tipus molt comú de MPS, i és la més freqüent a l'Àsia (Okuyama *et al*., 2010; Yamada *et al*., 1993)and mutations in 13 patients (25%. La MPSII és un trastorn variable, progressiu i multisistèmic, amb un deteriorament neurològic sever que també implica l'obstrucció de les vies respiratòries, deformitats esquelètiques i cardiomiopatia.

Atès que el sistema nerviós central (SNC) és l'òrgan més afectat en les MPSII i MPSIII i que està aïllat anatòmicament de la resta del cos —a causa de l'existència de la barrera hematoencefàlica (BHE)—, el seu tractament és mes complicat, ja que s'ha d'aconseguir un grau suficient de correcció gènica d'aquest òrgan. Actualment, s'han descrit diferents maneres de subministrar gens al SNC. L'*administració directa de vectors AAV al parènquima cerebral* és una aproximació altament invasiva i poc eficient en la correcció d'àrees del SNC distals al lloc d'injecció (Marcó *et al*., 2019)(figura 9).

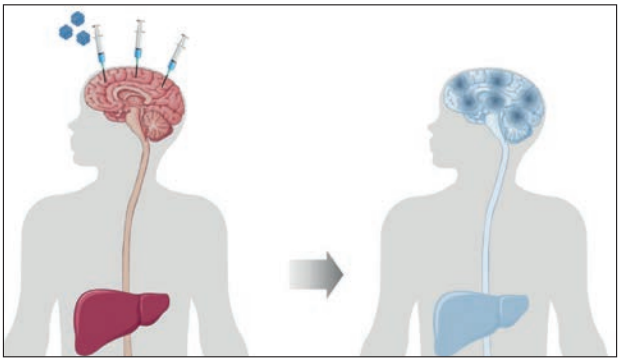

Fig. 9. Representació esquemàtica de la modificació genètica del cervell mitjançant l'administració de vectors AAV directament intraparènquima. Aquesta administració consisteix en múltiples injeccions directes al parènquima cerebral a través de sis o vuit forats (tres o quatre per hemisferi) a dues profunditats diferents per lloc d'injecció. Aquesta aproximació resulta en una difusió limitada dels AAV al SNC amb concentracions locals de genomes virals molt elevades al lloc de la injecció que disminueixen progressivament amb la distància. Les cèl·lules al voltant dels llocs d'injecció es poden corregir mitjançant l'enzim expressat localment, però hi ha un baix alliberament de la proteïna expressada al LCR i, per tant, no es pot corregir tot l'òrgan. La transducció d'òrgans perifèrics, com el fetge, és molt baixa o inexistent (Adaptat de Marcó *et al*., 2019)

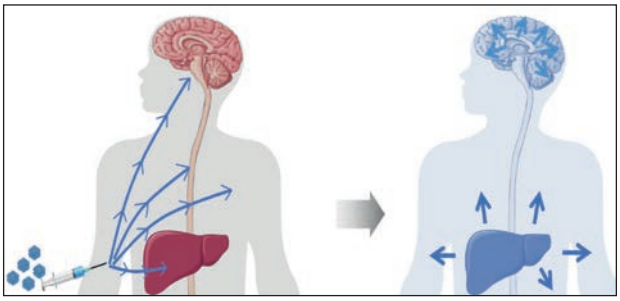

Fig. 10. Representació esquemàtica de la modificació genètica del SNC i els teixits perifèrics mitjançant l'administració intravenosa de vectors AAV. És una tècnica molt eficient per a transduir els òrgans somàtics, especialment el fetge, en funció del serotip d'AAV utilitzat. Entre ells, els vectors de serotip 9 (AAV9) han demostrat la capacitat de creuar la BHE i transduir el SNC. Per a això, és necessària l'administració de dosis de vectors molt altes, ja que la injecció de dosis més baixes resulta en una transducció del SNC insuficient per donar lloc a nivells terapèuticament significatius d'enzims al cervell.
A més, amb aquesta aproximació, l'eficàcia a nivell del SNC se suprimeix si hi ha presència d'immunitat preexistent contra l'AAV, ja que els anticossos neutralitzadors del sèrum bloquejaran l'entrada del vector al SNC (Adaptat de Marcó *et al*., 2019)

Una altra aproximació per a transferir gens al SNC és l'*administració intravenosa de vectors AAV capaços de creuar la BHE*. Es tracta d'una tècnica no invasiva, però s'ha d'enfrontar a la necessitat d'injectar dosis molt elevades de vectors AAV per tal de poder arribar al cervell i a la possibilitat que el pacient tingui immunitat humoral i cel·lular contra els AAV que bloquejarà que aquests vectors puguin transduir els teixits.

El nostre grup ha posat en marxa diverses teràpies gèniques per a la MPSII i la MPSIII mínimament invasives, segures i que garanteixen la màxima eficàcia terapèutica en els òrgans afectats. Els enfocaments que hem desenvolupat per a aquests trastorns neurodegeneratius es basen en l'*administració local al cervell de vectors AAV mitjançant la injecció directa al líquid cefalorraquidi (intra-LCR)* que banya tot el SNC (figura 11).

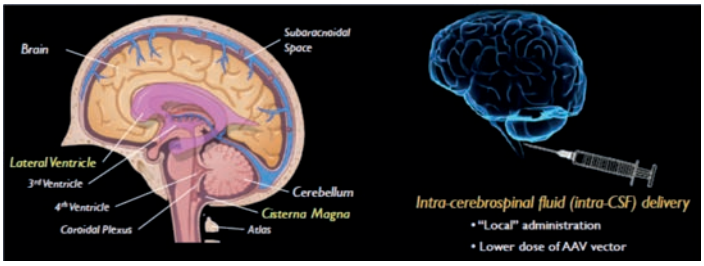

Fig. 11. Administració dels vectors AAV directament al líquid cefalorraquidi (intra-LCR). El LCR banya el SNC i s'hi pot accedir a través de la *cisterna magna* o del *ventricle lateral*.

Així, vam demostrar que l'administració de vectors AAV9 directament al LCR a través de la cisterna magna —un gran espai subaracnoidal ple de LCR— facilita la distribució dels vectors a tot el SNC. D'aquesta manera, s'aconsegueix la transducció generalitzada del SNC amb una dosi de vectors AAV molt baixa, sobretot en comparació amb la que s'injecta per via sistèmica. A més, els vectors AAV9 tenen propietats úniques en aquest sentit; l'AAV9 es distribueix en àrees molt més grans del SNC després de l'administració intra-LCR en comparació amb altres serotips de vectors AAV, des de les parts més rostrals a les més caudals de l'encèfal i per tota la medul·la espinal, la qual cosa condueix a l'expressió del transgèn a totes les estructures clau del SNC. El patró d'expressió dels gens d'interès indica que els vectors penetren des de la superfície fins a zones més profundes del SNC. Així mateix, posteriorment, les cèl·lules transduïdes secreten les proteïnes al LCR, cosa que permet augmentar encara més l'eficàcia mitjançant la distribució de la proteïna terapèutica a tot el SNC. També, vam observar que, després de l'administració intra-LCR, una part del vector AAV9 passa del LCR a la circulació sanguínia i transdueix molt eficientment el fetge que expressa llavors el gen terapèutic, de manera que proporciona una font perifèrica de proteïna terapèutica que pot ser captada de la circulació sanguínia i corregeix així la resta d'òrgans somàtics (el cor, els pulmons, els ronyons, etc.) gràcies al principi de correcció encreuada.

El nostre grup va ser el primer a demostrar, mitjançant aquest enfocament de teràpia gènica, la correcció completa de la MPSIIIA en un model animal de la malaltia amb afectació neurològica greu. Així, vam demostrar que l'administració intra-CSF de vectors AAV9 que codificaven per al gen de la sulfamidasa aconseguia nivells d'activitat més elevats de la proteïna terapèutica que el que s'assolia en estudis previs en els quals utilitzàvem l'administració sistèmica del vector (Haurigot *et al*., 2013; Ruzo *et al*., 2012*b* i 2012*a*). En aquests ratolins MPSIIIA tractats intra-LCR amb l'AAV9-sulfamidasa, es va observar l'eliminació dels GAG acumulats, la resolució de la patologia lisosòmica i de la neuroinflamació al cervell i la correcció dels dèficits conductuals (figura 12). També, es va obtenir un increment de l'activitat enzimàtica al sèrum, amb el fetge com la font més important d'enzim circulant, que va permetre revertir la patologia lisosòmica a tots els òrgans perifèrics (figura 13). En conjunt, el tractament amb AAV9-sulfamidasa va resultar en la prolongació de la supervivència dels animals tractats. Així, el nostre estudi va ser el primer a demostrar la correcció a nivell de tot l'organisme d'una malaltia d'emmagatzematge lisosòmic després del tractament amb una teràpia gènica.

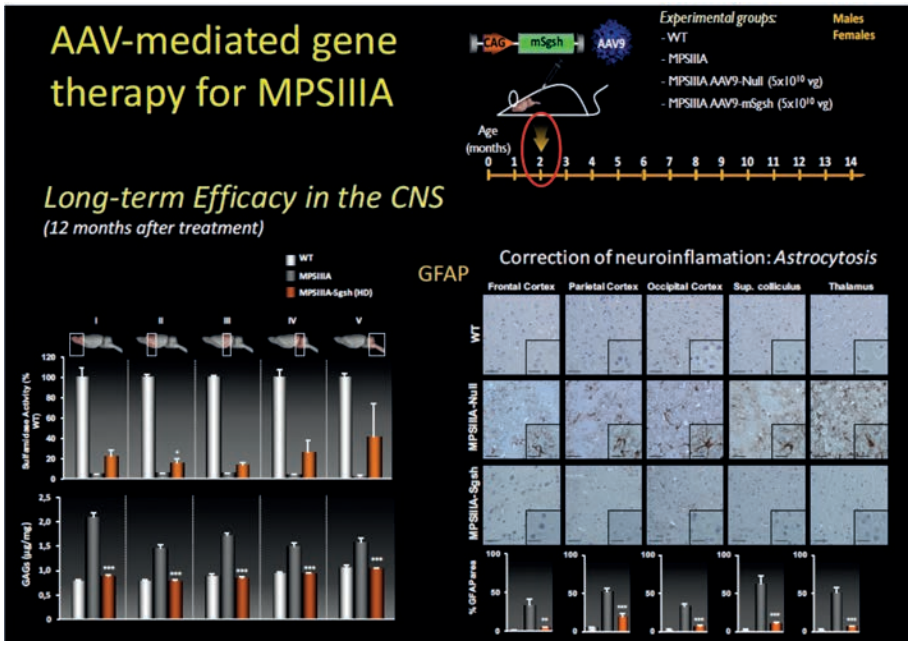

Fig. 12. Tractament de la patologia del SNC en la MPSIIIA. Els ratolins MPSIIIA de dos mesos d'edat es van tractar intra-LCR amb l'AAV9-sulfamidasa. Al cap de dotze mesos, es va observar que l'activitat sulfamidasa era detectable a totes les regions del SNC que va portar a la normalització del contingut de GAG i a la reversió de la neuroinflamació, en comparació amb els ratolins MPSIIIA no tractats.

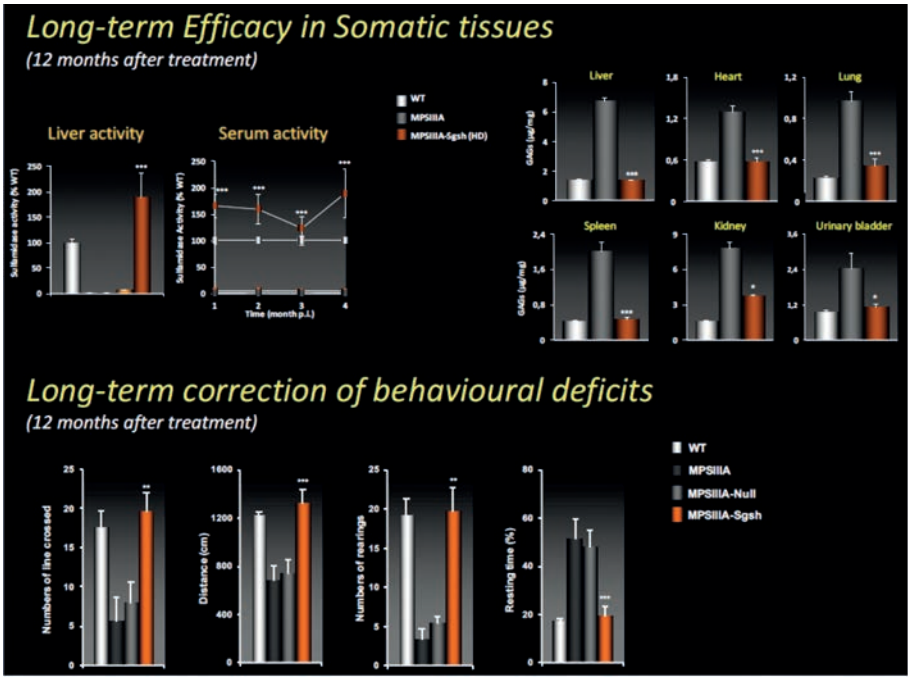

Fig. 13. Tractament de la patologia somàtica i de les alteracions del comportament en la MPSIIIA. Els ratolins MPSIIIA de dos mesos d'edat es van tractar intra-LCR amb l'AAV9-sulfamidasa. Al cap de dotze mesos, es va observar activitat sulfamidasa al fetge i la normalització del contingut de GAG a tots els teixits perifèrics. A més a més, es van revertir les alteracions del comportament.

També vam demostrar que aquesta estratègia era eficaç per al tractament d'altres MPS, tant la MPSIIIB com la MPSIIID, així com la MPSII (Motas *et al*., 2016; Ribera *et al*., 2015; Roca *et al*., 2017). A les quatre MPS, l'administració del vector terapèutic va provocar un augment de l'activitat enzimàtica a tot l'encèfal, el fetge i el sèrum, que al seu torn va resultar en: *a*) la correcció dels GAG acumulats al SNC i als teixits i els òrgans perifèrics, *b*) la resolució de la patologia lisosòmica i la neuroinflamació al SNC, *c*) la correcció dels dèficits de comportament i *d*) la prolongació de la supervivència a llarg termini. Aquests estudis van conduir a l'establiment d'una *plataforma per al tractament de malalties minoritàries que presenten neurodegeneració*, centrada en l'administració al LCR de vectors AAV9 que codifiquen per als enzims deficients (Haurigot i Bosch, 2013; Haurigot *et al*., 2013; Marcó *et al*., 2019; Motas *et al*., 2016; Ribera *et al*., 2015; Roca *et al*., 2017)there is currently no cure. The BBB, which limits the bioavailability of drugs administered systemically, and the short half-life of lysosomal enzymes, hamper the development of effective therapies. Mucopolysaccharidosis type IIIA (MPS IIIA (figura 14).

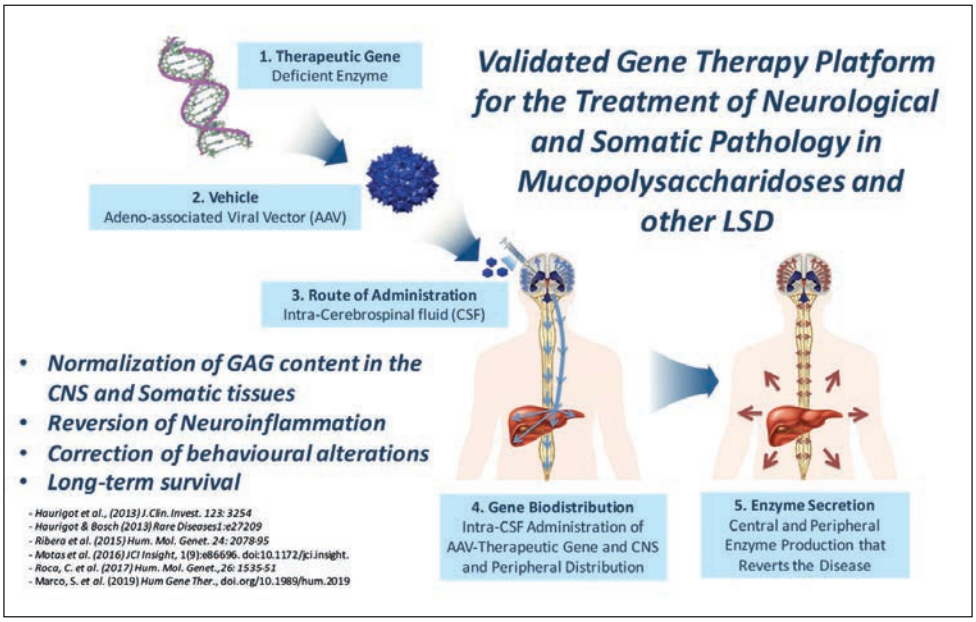

Fig. 14. Esquema representatiu de la plataforma de teràpia gènica mitjançada per vectors AAV administrats intra-LCR per al tractament de les MPS i altres malalties lisosòmiques. L'administració de vectors AAV9 al LCR, a través del ventricle lateral o de la cisterna magna, porta a una distribució generalitzada i uniforme de vectors AAV a tot el cervell i la medul·la espinal, ja que el LCR banya tot el SNC. A més, part del vector AAV9 arriba a la circulació, cosa que condueix a la transducció del fetge. Com a resultat d'aquesta distribució dels vectors AAV, l'activitat enzimàtica augmenta a tot el SNC, al LCR i al sèrum, en què el fetge és la font més important d'enzim circulant. També, hem demostrat en estudis en models animals seropositius que l'eficàcia terapèutica al SNC, després de l'administració dels vectors al LCR, no es veuria compromesa per la presència d'anticossos neutralitzadors anti-AAV9 al sèrum, ja que aquests no poden creuar la BHE.

Una vegada demostrats els resultats positius en ratolins model de MPS, també hem demostrat que l'administració intra-LCR de vectors AAV9-sulfamidasa és factible i segura en models animals grans, com els gossos Beagle, en els quals hem observat la producció i secreció de la proteïna terapèutica durant molts anys (>7 anys) després d'una sola administració de vector a través de la cisterna magna. Aquestes observacions constitueixen el seguiment a més llarg termini d'un model animal gran després de l'administració dels vectors AAV al LCR. Els gossos injectats van tolerar molt bé el tractament i no van desenvolupar cap signe clínic —neurològic o d'imatge, agut o crònic— que suggerís efectes nocius associats a la presència del vector o a l'expressió contínua del transgèn al cervell o a la medul·la espinal al llarg de

tots aquests anys. El més important és que tots els animals tractats van mostrar uns nivells d'activitat sulfamidasa molt augmentats al LCR més de set anys després d'una sola administració del vector AAV. A més, vam detectar uns nivells molt elevats de genomes virals i d'expressió del gen de la sulfamidasa, com també d'activitat de l'enzim, en biòpsies obtingudes de tot el cervell i de la medul·la espinal (figura 15). Es va observar també la persistència del vector i l'expressió del transgèn al fetge dels gossos tractats. Tots aquests resultats indiquen també l'excel·lent perfil de seguretat a llarg termini d'aquesta teràpia en gossos.

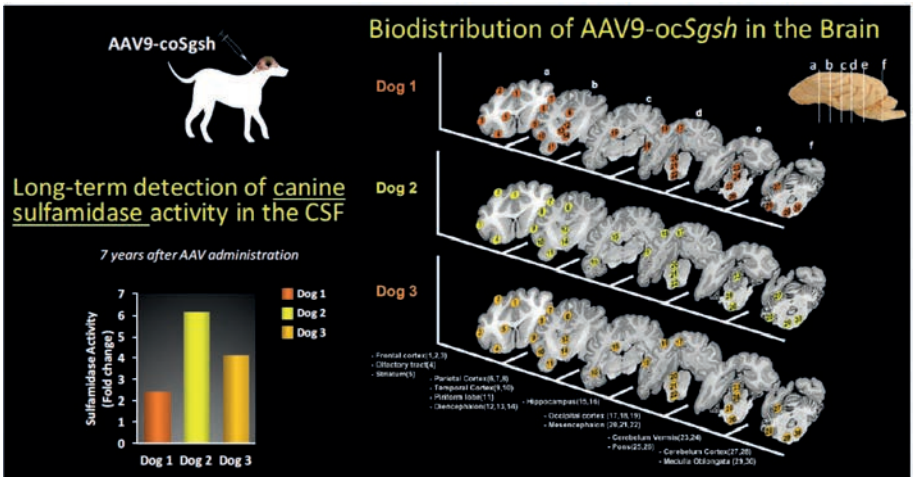

Fig. 15. Expressió i activitat sulfamidasa a llarg termini al SNC després de la transferència gènica mitjançada per vectors AAV9 al LCR de gossos. Tots els animals tractats van mostrar uns nivells d'activitat de sulfamidasa molt augmentats al LCR més de set anys després d'una administració del vector AAV. A més, presentaven nivells molt elevats de genomes virals i d'expressió del gen de la sulfamidasa, com també d'activitat de l'enzim en biòpsies obtingudes de tot el cervell i de la medul·la espinal set anys després del tractament.

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

Per tal de poder portar aquestes teràpies cap a la clínica, el nostre grup a la UAB va establir el 2010 un partenariat publicoprivat amb la companyia farmacèutica Esteve Pharmaceuticals. Aquesta col·laboració ha estat clau i ha permès avançar aquestes aproximacions terapèutiques gràcies a la combinació de l'expertesa en recerca bàsica

preclínica del nostre grup juntament amb l'expertesa d'Esteve en l'àmbit regulador (interacció amb les agències del medicament), toxicològic i de disseny d'assaigs clínics. Actualment, ja s'han obtingut tres denominacions de medicaments orfes (ODD) per part de l'EMA i de la FDA per als productes de teràpia gènica desenvolupats al nostre laboratori per al tractament de la MPSII, de la MPSIIIA i de la MPSIIIB.

Recentment, Esteve ha iniciat un assaig clínic de fase I/II per al tractament de pacients amb MPSIIIA (2015-000359-26, *www.ClinicalTrialsregister.eu*). Un total de tres cohorts de tres pacients (nou pacients de >2 anys) ja han rebut el producte de teràpia gènica administrat, a tres dosis diferents, directament al LCR mitjançant la via intracerebroventricular (ICV) a l'Hospital Sant Joan de Déu, a Barcelona. Es tracta d'un assaig clínic de seguretat, de tolerabilitat i d'eficàcia inicial. Tots els pacients han respost bé al tractament ICV, no s'han observat efectes adversos i, actualment, s'està fent el seguiment i analitzant les millores clíniques dels pacients tractats.

Els resultats de tots aquests estudis de teràpia gènica, mitjançada per vectors AAV administrats al LCR, seran també molt útils i de gran interès per al tractament d'altres malalties neurodegeneratives, cosa que contribueix molt probablement a proporcionar una cura en un futur per a molts altres trastorns del SNC fins ara no tractables.

4. TERÀPIA GÈNICA PER A MALALTIES D'ALTA PREVALENÇA: LA DIABETIS 'MELLITUS'

A més de treballar en teràpies gèniques per a malalties rares, des de l'inici, la major part de la meva recerca s'ha centrat en l'estudi de les causes fisiopatològiques de la diabetis *mellitus* utilitzant models animals transgènics per tal de poder desenvolupar noves teràpies més efectives. En especial, hem dissenyat i assajat noves estratègies de teràpia gènica per tractar aquesta malaltia mitjançant la manipulació genètica *in vivo* de diferents teixits utilitzant vectors AAV.

4.1. La diabetis 'mellitus', models animals i teràpia gènica

La diabetis *mellitus* (DM) és la principal malaltia metabòlica que afecta la població a escala mundial. Actualment, s'ha convertit en un important problema de salut pública tant en països desenvolupats com en via de desenvolupament. La seva prevalença creix a un ritme alarmant i ara ja afecta >450 milions de persones a escala global i s'espera que arribi a >700 milions l'any 2045 (International Diabetes Federation (IDF); *https://www.jdr.org/*).

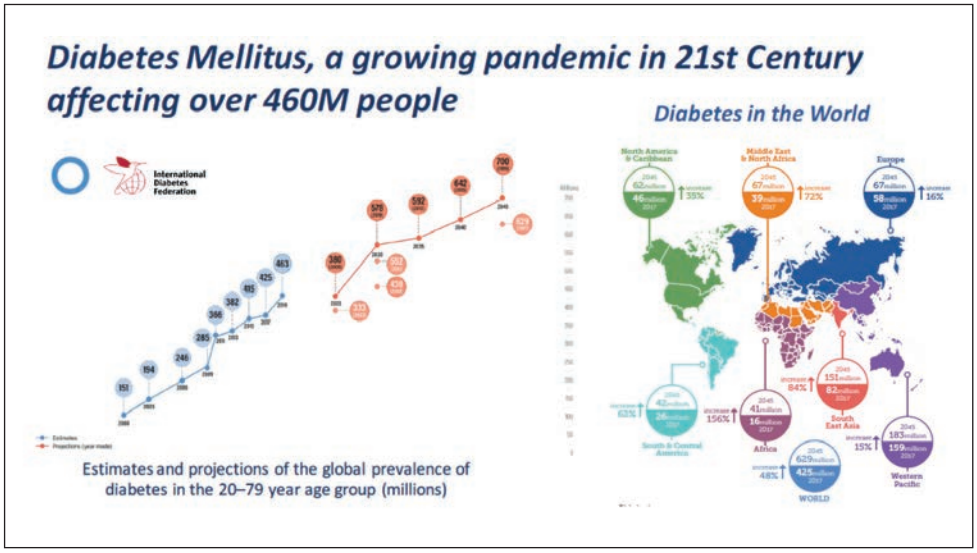

Fig. 16. Prevalença de la diabetis *mellitus* a escala global. La incidència de la diabetis està incrementant d'una manera alarmant aquests últims anys i es preveu un augment encara més gran en els propers anys, tant en països desenvolupats com en via de desenvolupament (segons l'*IDF Diabetes Atlas 2019*, *https://www.diabetesatlas.org/*).

Les dues formes principals de diabetis *mellitus* són la *diabetis de tipus 1* (DT1) i la *diabetis de tipus 2* (DT2). La DT1 i la DT2 són una de les principals causes de morbiditat i mortalitat arreu del món. Principalment a causa d'un mal control glucèmic, ambdues diabetis s'associen a complicacions secundàries molt severes responsables d'una pobra qualitat i esperança de vida dels pacients. Actualment no hi ha cura per a la diabetis.

La DT1 només representa un 5-10 % de la població diabètica i és el resultat de la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β del pàncrees productores d'insulina. Els pacients desenvolupen hiperglucèmia i necessiten una teràpia substitutòria amb insulina per a sobreviure. No obstant això, aquesta teràpia és imperfecta, ja que la glucèmia no sempre es regula adequadament i la hiperglucèmia crònica porta al desenvolupament de les greus complicacions microvasculars (retinopatia i nefropatia), macrovasculars (ictus i infart de miocardi) i neurològiques d'aquesta malaltia. La normalització dels nivells de glucosa en sang és fonamental per a prevenir aquestes complicacions devastadores. La teràpia intensiva amb insulina pot retardar l'inici i la progressió de les complicacions secundàries, però els pacients que reben aquesta teràpia presenten un risc elevat de desenvolupar episodis d'hipoglucèmia. Per això, cal desenvolupar noves aproximacions terapèutiques que permetin obtenir un millor control de la glucèmia.

La DT2 és la principal forma de diabetis, afecta del 90-95 % dels pacients i és el resultat de la disminució de l'acció de la insulina a teixits perifèrics (coneguda com a resistència a la insulina), conjuntament amb una reducció de la capacitat de les cèl·lules β pancreàtiques de secretar prou insulina per a contrarestar aquesta resistència perifèrica a l'hormona. La DT2 i la resistència a la insulina s'associen molt fortament a l'obesitat, la prevalença de la qual també augmenta a escala mundial (Moller i Flier, 1991). L'obesitat incrementa el risc de mortalitat i és també un factor molt important en el desenvolupament de malalties del cor, alteracions immunitàries, hipertensió, artritis i certs tipus de càncer (Haslam i James, 2005; Roberts *et al.*, 2010). D'altra banda, els pacients obesos i diabètics són més propensos a desenvolupar trastorns a nivell del SNC —com deteriorament cognitiu, demència, depressió, ansietat o ictus— que la població general i, a més, la DT2 gairebé duplica el risc de patir la malaltia d'Alzheimer (Mayeux i Stern, 2012). Intervencions en l'estil de vida i els tractaments farmacològics convencionals han demostrat ser efectius per a molts pacients obesos i amb DT2. No obstant això, aquestes opcions terapèutiques no funcionen en tots els casos i no estan exemptes d'efectes secundaris indesitjables. Per tant, hi ha una necessitat de tractaments nous, ben tolerats per a grans poblacions heterogènies de pacients obesos i amb DT2.

Per tant, en el cas de la DM hi ha opcions terapèutiques però no són prou eficients, sobretot perquè no eviten el desenvolupament de les greus complicacions secundàries d'aquesta malaltia. Nosaltres des de fa anys estem treballant perquè

considerem que la teràpia gènica podria proporcionar millors beneficis clínics a llarg termini. Tanmateix, en el desenvolupament de noves teràpies gèniques per a la DM s'ha de tenir en compte que, a diferència de les malalties rares monogèniques, tant la DT1 com la DT2 són malalties poligèniques amb un fort component ambiental com a causa del seu desenvolupament. Aquest fet fa que el disseny de noves estratègies de teràpia gènica sigui molt més complex.

En el cas de les malalties monogèniques, com a gen terapèutic a transferir s'utilitzava una còpia correcta del gen mutat. En el cas de la DM, no és clar quin pot ser un possible gen terapèutic a transferir i, per tant, es requereixen molts estudis sobre la fisiopatologia de la malaltia per tal d'identificar el possible gen o gens terapèutics candidats. També, s'ha d'estudiar i seleccionar quin és el teixit diana sobre el qual s'hauria d'actuar per contrarestar les alteracions metabòliques, tant en la DT1 com en la DT2. A més, en el cas d'aquestes malalties tampoc no existeix un model animal que reprodueixi perfectament la patologia humana. Hi ha diversos models animals de DT1 i DT2 acceptats en el camp. Per exemple, animals tractats amb estreptozotocina (destrueix cèl·lules β pancreàtiques) o ratolins NOD (*non-obese diabetic*) com a models de DT1, o bé animals sotmesos a dietes altes en lípids o diferents soques de ratolins genèticament obesos (*ob*/*ob*, *db*/*db*) com a models de DT2. Aleshores, per tal de demostrar que una teràpia gènica pot ser efectiva per contrarestar aquestes malalties caldrà assajar-la en diversos d'aquests models, cosa que complica molt els experiments a realitzar a fi de validar una nova aproximació terapèutica.

En el cas de la DT1, al llarg d'aquests anys estem desenvolupant aproximacions de teràpia gènica *in vivo* centrades en: 1) la possibilitat de regenerar el pàncrees endocrí mitjançant l'expressió de factors de creixement que indueixen la replicació, bloquegen l'apoptosi de les cèl·lules β pancreàtiques i contraresten la inflamació dels illots, i 2) la manipulació genètica del múscul esquelètic perquè capti glucosa i secreti insulina generant un sensor de glucosa en aquest teixit que permeti garantir la normoglucèmia i així prevenir el desenvolupament de les complicacions secundàries (figura 17).

En el cas de la DT2, les estratègies que estem desenvolupant són mes complexes i estan centrades sobretot a transferir possibles gens terapèutics a diferents teixits clau —com el fetge, el teixit adipós o el múscul esquelètic— que portin a una disminució de la resistència a la insulina i l'obesitat, incrementin la termogènesi, disminueixin l'acumulació de greix ectòpic i la hiperplàsia dels illots pancreàtics, i que finalment permetin assolir normoglucèmia i normoinsulinèmia i un increment en la sensibilitat a la insulina. La selecció dels gens candidats és complexa i es basa en molts estudis previs en models animals en què s'han identificat diferents factors que poden millorar aquestes alteracions clau en la patogènia de la DT2 (figura 18).

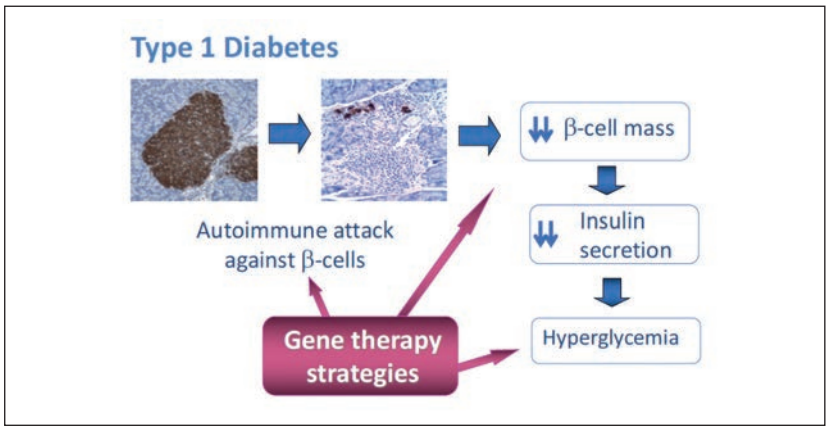

Fig. 17. Estratègies de teràpia gènica *in vivo* per al tractament de la DT1. S'estan desenvolupant dues grans estratègies centrades en la transferència de gens clau que portin a: *a*) bloquejar la resposta autoimmunitària i regenerar la massa de cèl·lules β, o *b*) disminuir la hiperglucèmia incrementant la captació de glucosa pels teixits.

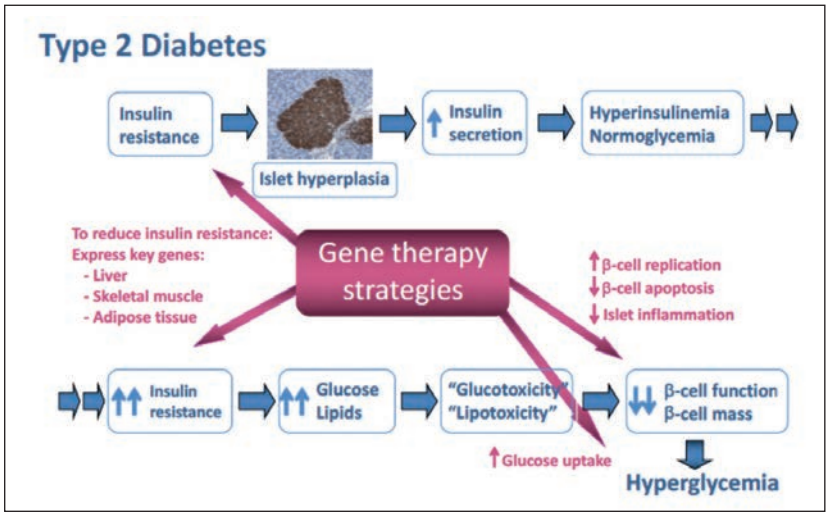

Fig. 18. Estratègies de teràpia gènica *in vivo* per al tractament de la DT2. L'enginyeria genètica, mitjançada per vectors AAV —del fetge, del teixit adipós o del múscul esquelètic— amb factors terapèutics clau identificats en estudis previs, representa un avenç tecnològic que pot permetre contrarestar la resistència a la insulina, la DT2 i l'obesitat.

Un cop s'ha demostrat que una aproximació de teràpia gènica per a la DM és eficaç en els models animals, la seva translació cap a la clínica també és més complexa que en el cas de les malalties minoritàries monogèniques, ja que s'haurà d'identificar molt bé, dins de la gran població de pacients diabètics, el nínxol al qual podria beneficiar més la nova teràpia. La contribució de les agències reguladores també serà clau en aquest procés. Per tant, el desenvolupament d'aquestes noves estratègies per a tractar la DM és molt més complex i un repte important per als propers anys. No obstant això, el camp de la teràpia gènica ja està preparat actualment i disposa de molta tecnologia (com ara vectors més bons i més segurs i la seva manufactura a gran escala) que permetrà tractar un gran nombre de pacients en un futur proper.

A continuació es presenten dues de les teràpies gèniques que hem desenvolupat, una per a la DT1 i l'altra per a la DT2, i ja s'està avançant per portar-les cap a la clínica per tractar pacients humans.

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

La DT1 està associada amb complicacions secundàries greus, causades en gran part per un mal control glucèmic. El tractament amb insulina exògena no aconsegueix prevenir completament aquestes complicacions, cosa que comporta una morbiditat i una mortalitat importants. Per tant, la regulació precisa de l'homeòstasi de la glucosa és un repte important en el control de la DT1.

La manipulació genètica del múscul esquelètic per a combatre la hiperglucèmia és una estratègia atractiva per corregir la DT1. El múscul esquelètic és responsable de l'eliminació del 70 % de la glucosa que circula després d'un àpat. En els músculs, la utilització de la glucosa es controla mitjançant el transport de glucosa estimulat per la insulina, a través del transportador de glucosa tipus 4 (GLUT4) (Kahn, 1996), i la fosforilació per l'hexoquinasa II (HKII), que té una *K*m baixa per a la glucosa i és inhibida pel seu producte, la glucosa-6-fosfat, i limita així la captació de glucosa (Printz *et al*., 1993*a*). En el múscul diabètic, a causa de la manca d'insulina, la translocació GLUT4 a la membrana plasmàtica i l'activitat HKII es troben disminuïdes. A diferència de l'HKII, l'enzim hepàtic glucoquinasa (Gck) té una elevada *K*m per a la glucosa, no és inhibida per la glucosa-6-fosfat i mostra cooperativitat cinètica amb la glucosa (Printz *et al*., 1993*b*). Quan vam expressar la Gck al múscul esquelètic de ratolins transgènics, vam observar que aquest enzim facilita la captació de glucosa només quan la glucosa en sang és elevada (Otaegui *et al*., 2000). No obstant això, durant la diabetis, es requereixen també nivells basals constants d'insulina per garantir la presència de GLUT4 a la membrana cel·lular i així permetre l'entrada de la

glucosa. Aquestes observacions van portar a la hipòtesi que la regulació de la glucèmia es podria aconseguir mitjançant la coexpressió al múscul esquelètic de la Gck, que incrementaria la fosforilació i el metabolisme de la glucosa, i de nivells baixos d'insulina (Ins), que permetria la presència de GLUT4 a la membrana de les fibres musculars. En aquest sistema, la captació de glucosa es regula mitjançant els nivells de glucosa en la circulació sanguínia, de manera que permet la captació de glucosa només quan hi ha hiperglucèmia. D'acord amb això, vam demostrar que l'administració intramuscular conjunta de vectors AAV de serotip 1 (AAV1) que expressen Ins i Gck a ratolins diabètics tenia com a resultat la correcció de totes les alteracions de la malaltia (Mas *et al*., 2006). Per tant, això demostrava que es podia generar un «sensor de la glucosa» al múscul esquelètic, mitjançant l'acció de la producció basal d'insulina conjuntament amb l'activitat Gck, que augmentava la captació de glucosa i portava a la correcció de la hiperglucèmia en ratolins diabètics (figura 19).

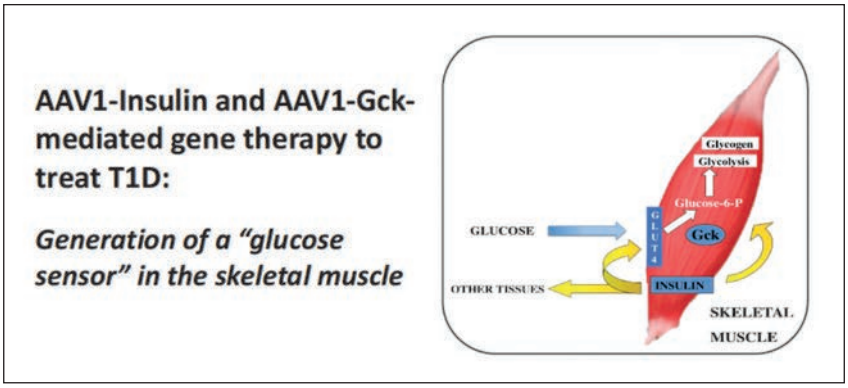

Fig. 19. Esquema representatiu de la teràpia gènica per a la DT1 centrada en la captació de glucosa pel múscul esquelètic. Expressió conjunta del gen de la insulina i el de la glucoquinasa al múscul esquelètic mitjançada per vectors AAV. Durant la diabetis, en presència d'hiperglucèmia, el múscul produiria nivells basals d'insulina, que incrementarien el transport de glucosa cap a l'interior de les fibres. Un cop dins, l'enzim Gck incrementaria la fosforilació i el metabolisme de la glucosa gràcies a la seva elevada *K*m. Treballant en concert, tots dos gens permetrien restablir la normoglucèmia.

A continuació, vam demostrar l'eficàcia a llarg termini d'aquesta aproximació en un model animal gran de diabetis (gossos Beagle als quals havíem induït diabetis experimental) com un pas necessari abans de poder aplicar-ho en pacients humans. Per això, en primer lloc, vam posar a punt la tècnica de transferència de gens a múscul esquelètic dels gossos mitjançant múltiples injeccions intramusculars per tal d'augmentar la biodistribució dels vectors AAV. Aquesta aproximació era segura i permetia l'expressió del gen d'interès a llarg termini en els músculs manipulats (figura 20).

Fig. 20. Administració intramuscular de vectors AAV1 al múscul esquelètic de gossos diabètics. Es tracta d'una tècnica poc invasiva que permet transduir molt eficientment el múscul esquelètic i obtenir l'expressió a llarg termini dels gens d'interès en aquest teixit.

Així, un únic tractament intramuscular de vectors AAV del serotip 1 (AAV1) que codificaven per a Gck i Ins en gossos diabètics va resultar en la normalització de la glucèmia en dejú i l'eliminació ràpida de la glucosa després d'una sobrecàrrega oral del sucre (test de tolerància oral a la glucosa). A més, en els animals tractats amb la teràpia gènica no es van observar episodis d'hipoglucèmia durant l'exercici. Això es va associar amb la recuperació del pes corporal, la reducció dels nivells de proteïnes plasmàtiques glicosilades i la supervivència a llarg termini sense desenvolupar complicacions secundàries (figures 21 i 22). Per contra, la transferència només del gen de la Ins o el de la Gck per separat no va aconseguir la correcció completa de la diabetis, cosa que indica que l'acció sinèrgica dels dos gens, Ins i Gck, és necessària per a obtenir un efecte terapèutic complet.

Així doncs, vam realitzar un seguiment a llarg termini (~8 anys) després d'una única administració de vectors terapèutics a gossos diabètics i es va aconseguir un control de glucèmia al llarg dels anys sense la necessitat de suplementar-ho amb injeccions d'insulina exògena. La correcció metabòlica també es va demostrar mitjançant la normalització dels nivells sèrics de fructosamina, triglicèrids i colesterol. A més, es va observar, vuit anys després de l'administració dels vectors, la persistència de genomes virals i l'expressió dels transgens terapèutics en múltiples mostres obtingudes dels músculs tractats, el quals també mostraven una morfologia completament normal (Callejas *et al*., 2013; Jaén *et al*., 2017)

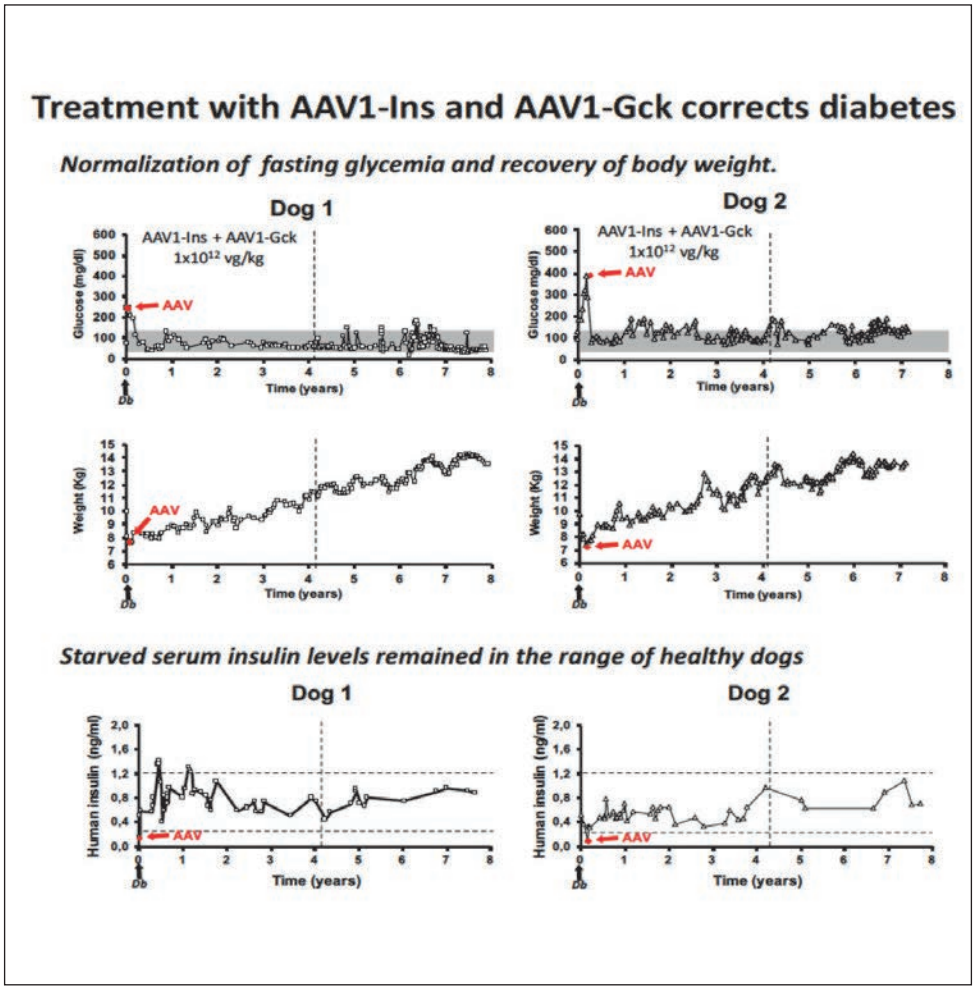

Fig. 21. Correcció de la diabetis durant vuit anys en gossos que van rebre un únic tractament amb teràpia gènica AAV1-Ins + Gck. Seguiment de la glucèmia, el pes corporal i la insulinèmia en els gossos diabètics 1 i 2 (*Dog 1* i *Dog 2*) tractats amb vectors AAV1-Ins i AAV1-Gck. «Temps 0» indica el moment d'inducció de la diabetis. Les fletxes vermelles assenyalen el moment de l'administració dels AAV. Les barres grises indiquen el rang de normoglucèmia en dejú en gossos. La insulinèmia es va mantenir dins del rang d'animals sans en dejú (línies discontínues) en ambdós gossos diabètics tractats amb AAV1 durant tot el període de seguiment.

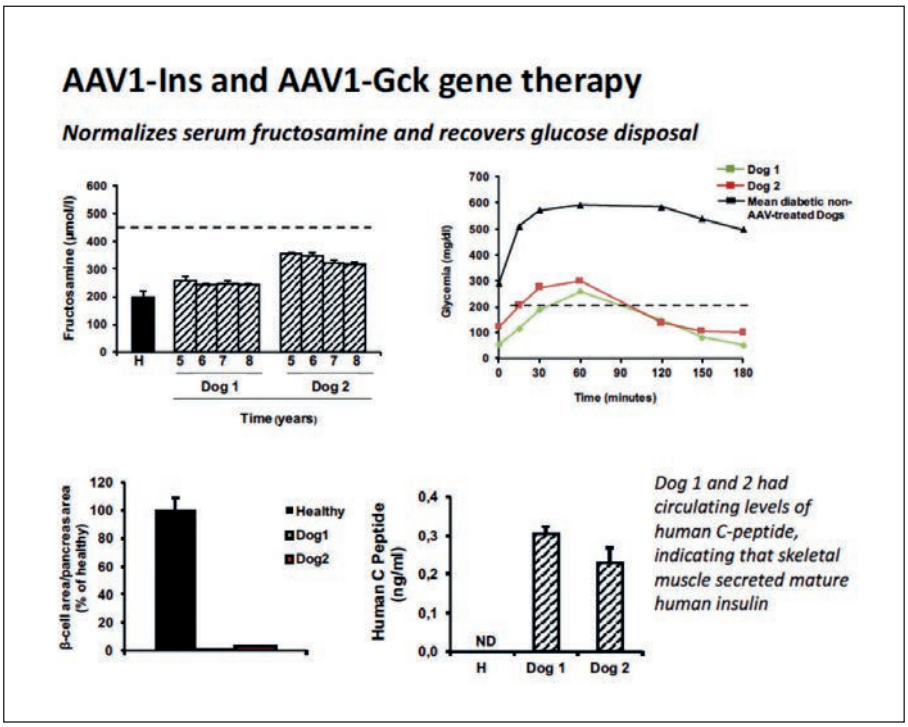

Fig. 22. Normalització dels paràmetres metabòlics després del tractament amb AAV1-Ins+Gck. *Seguiment dels nivells sèrics de fructosamina* en gossos 1 i 2. Cada barra representa la mitjana ± SEM de 5-12 determinacions realitzades durant un any concret després del tractament. Com a referència es proporciona el valor mitjà de fructosamina mesurat en quatre gossos sans (H) de la mateixa edat. La línia discontínua indica el límit del que es considera un bon control glucèmic en medicina veterinària. Concentracions > 500 mmol/L indiquen un control glucèmic deficient. *Test de tolerància oral a la glucosa* (OGTT) (1,75 g glucosa/kg en gossos en dejú de 12 h). Dues hores després de la càrrega oral de glucosa, la glucèmia va caure per sota de 200 mg/dL en ambdós gossos tractats amb Ins + Gck, és a dir, per sota del llindar per al diagnòstic de diabetis segons les directrius de l'Associació Americana de Diabetis. Les dades representen l'OGTT realitzat un mes abans del sacrifici, és a dir, 8 anys després del tractament amb teràpia gènica. Es presenta també la corba mitjana d'OGTT per a sis gossos diabètics no tractats (triangles negres). *Quantificació de l'àrea de cèl·lules β en mostres de pàncrees* d'un gos sa i dels gossos 1 i 2 obtingudes al final de l'estudi. La inducció de la diabetis va provocar una reducció de >95 % de l'àrea de cèl·lules β/àrea del pàncrees en ambdós gossos. La *detecció de nivells sèrics de pèptid C humà* en gossos sans i en els gossos 1 i 2, tractats amb AAV1-Ins + Gck, va demostrar que la proinsulina es produïa i es processava al múscul esquelètic manipulat genèticament.

Per tant, aquest estudi demostra l'eficàcia i la seguretat a llarg termini de la transferència dels gens de la insulina i la glucoquinasa en animals grans i, especialment, la capacitat del sistema per a respondre als canvis en les necessitats metabòliques a mesura que els animals envelleixen (figura 23).

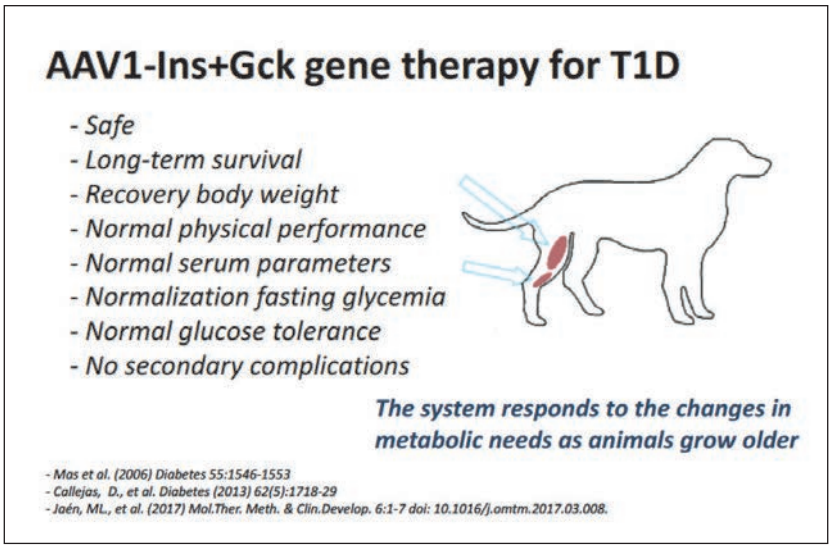

Fig. 23. Tractament amb la teràpia gènica de la DT1 centrat en la manipulació genètica del múscul esquelètic perquè expressi el gen de la insulina i el de la glucoquinasa. Els resultats dels nostres estudis demostren que, després d'una única injecció intramuscular dels vectors, els transgens Ins i Gck actuen sinèrgicament per aconseguir un control estret de la glucèmia i prevenir les alteracions metabòliques característiques de la DT1.

Aquest estudi proporciona la primera prova de concepte en un model animal gran d'una aproximació de transferència de gens segura i eficaç a llarg termini per a tractar la DT1, i posa les bases per a la translació clínica d'aquesta aproximació a pacients humans en un futur. En aquest sentit, molt recentment, el 2020, la UAB ha llicenciat aquest projecte a una nova empresa de teràpia gènica dels Estats Units, Kriya Therapeutics (*https://kriyatherapeutics.com/*), que ja ha iniciat tots els passos per portar a la clínica aquesta aproximació en un futur proper.

4.3. Teràpia gènica per a la diabetis de tipus 2 centrada en la transferència del factor FGF21 mitjançada per vectors AAV

A mesura que la prevalença de diabetis de tipus 2 i d'obesitat augmenta a tot el món, també ho fa la necessitat de trobar millors teràpies, més adequades per al

tractament de la població heterogènia de pacients amb DT2 o obesitat. Tot i que la majoria de les estratègies de teràpia gènica desenvolupades fins ara per a la diabetis *mellitus* s'han centrat en la DT1, a mesura que augmenta el coneixement de la fisiopatologia de la DT2, s'estan començant a realitzar estudis de transferència de gens en ratolins model per avaluar la possible eficàcia terapèutica de diversos «factors candidats» per al tractament d'aquesta malaltia.

Entre ells, el factor de creixement dels fibroblasts 21 (*fibroblast growth factor*, FGF21) es pot considerar un agent terapèutic prometedor per al tractament de la DT2 i l'obesitat. Es tracta d'una hormona peptídica que és secretada per diversos òrgans i pot actuar sobre múltiples teixits per regular l'homeòstasi energètica (Kharitonenkov i DiMarchi, 2017).

S'ha observat que l'administració de proteïna FGF21 recombinant a ratolins i a rates diabètiques i obeses afavoreix una reducció robusta de l'adipositat, redueix l'increment de glucosa i els triglicèrids a la sang i millora la sensibilitat a la insulina (Adams *et al*., 2013; Berglund *et al*., 2009). A més, també s'ha descrit que l'administració de FGF21 a primats diabètics obesos redueix notablement els nivells sèrics de glucosa, triglicèrids i insulina en dejú i indueix una pèrdua petita, però significativa, de pes corporal (Kharitonenkov *et al*., 2007). Tanmateix, tot i que el FGF21 podria ser un agent terapèutic prometedor per a la DT2 i l'obesitat, la proteïna FGF21 nativa presenta propietats farmacocinètiques deficients —ja que té una vida mitjana molt curta (que varia entre 0,5 h i 2 h), en part a causa de l'augment de la filtració glomerular al ronyó ateses la seva mida petita (~22 kDa) i una gran susceptibilitat a la degradació proteolítica quan s'administra *in vivo*— i presenta també agregació *in vitro*, la qual cosa ha impedit el desenvolupament farmacològic de productes farmacèutics basats en FGF21 (figura 24).

Actualment, la indústria farmacèutica està desenvolupant anàlegs o mimètics del FGF21 amb perfils farmacocinètics millorats com a possibles productes farmacèutics (So i Leung, 2016). S'ha observat que aquestes molècules anàlogues de FGF21 tenen una eficàcia terapèutica similar a la proteïna FGF21 nativa en models animals d'obesitat i DT2 petits i grans. De fet, alguns anàlegs de la FGF21 ja han arribat a fase clínica i els resultats dels assaigs clínics de fase I i II han demostrat una millora significativa de la dislipèmia, una pèrdua lleu de pes corporal i reduccions de la insulinèmia en dejú en pacients amb obesitat i DT2. Malgrat les millores farmacocinètiques, els anàlegs o mimètics del FGF21 requereixen injeccions periòdiques per a obtenir benefici clínic, que pot ser incòmode per als pacients i comprometre el compliment del tractament. A més, la seva administració també pot comportar problemes immunològics associats a l'administració de proteïnes exògenes que el cos pot no reconèixer com a pròpies (figura 24).

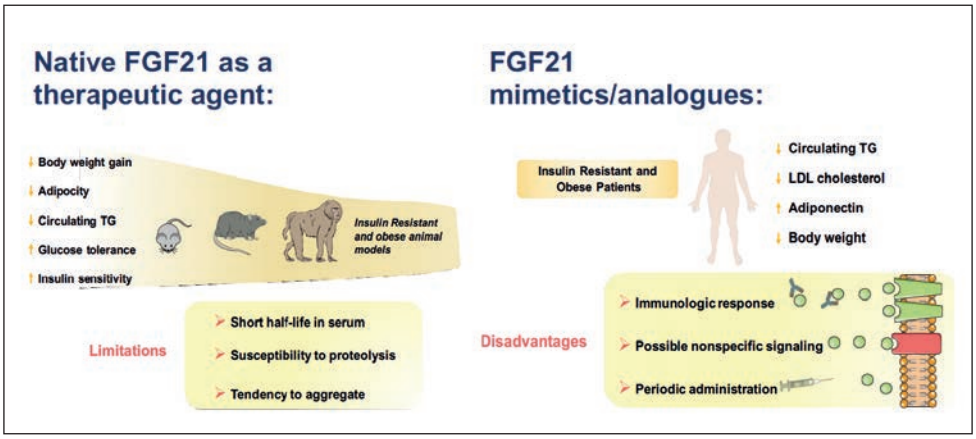

Fig. 24. Tractament de l'obesitat i la resistència a la insulina mitjançant la proteïna FGF21 nativa o bé amb proteïnes anàlogues o mimètiques de FGF21. Tot i que s'ha observat que el tractament amb la proteïna FGF21 o amb anàlegs o mimètics d'aquesta proteïna pot millorar l'obesitat i diferents alteracions metabòliques, aquestes teràpies presenten limitacions importants. El FGF21 natiu té una vida mitjana molt curta en sèrum, amb una gran susceptibilitat a ser degradat i a formar agregats. Els mimètics o anàlegs de FGF21, com que no són proteïnes pròpies de l'organisme, poden causar una resposta immunològica que els inactivi i també interactuar a través d'altres receptors no específics de FGF21 i provocar alteracions cel·lulars. A més, tots aquests tractaments requereixen una administració periòdica.

Els problemes associats amb els tractaments amb la proteïna FGF21 nativa o amb els seus anàlegs o mimètics fan que la teràpia gènica sigui una estratègia alternativa atractiva. Així, nosaltres vam aprofitar les característiques dels vectors AAV i la seva capacitat per a produir de manera constant proteïnes terapèutiques (Mingozzi i High, 2011) a fi de desenvolupar una estratègia de teràpia gènica per a l'obesitat i la DT2 basada en la transferència del gen del FGF21 al fetge, o bé al teixit adipós o al múscul esquelètic. La manipulació genètica d'un d'aquests teixits permetria la producció constant de la proteïna nativa i el seu alliberament a la circulació sanguínia de manera que el FGF21 podria distribuir-se a tot l'organisme (figura 25).

En el nostre grup, en primer lloc, vam utilitzar els vectors AAV per a manipular genèticament el fetge a fi de produir FGF21. El tractament únic amb AAV-FGF21 d'animals alimentats amb dieta alta en lípids o ratolins *ob/ob*, genèticament obesos i diabètics, va resultar en un increment a llarg termini dels nivells de FGF21 en circulació (>1 any). Això va provocar reduccions marcades del pes corporal, de la hipertròfia i la inflamació del teixit adipós, de l'esteatosi, de la inflamació i la fibrosi

hepàtica i, en darrer terme, reversió de la resistència a la insulina (figura 26). Les millores en la despesa energètica i l'homeòstasi de la glucosa es van relacionar amb l'augment de la termogènesi, la captació de glucosa en adipòcits marrons o blancs, la normalització dels nivells d'adiponectina i leptina, així com el fet de contrarestar la hiperplàsia dels illots amb la conseqüent reducció dels nivells d'insulina i glucagó circulants (figura 26). Aquests efectes terapèutics s'aconseguiren en absència d'efectes secundaris malgrat els nivells elevats d'una manera crònica de FGF21 en sèrum. A més, els ratolins tractats amb AAV-FGF21 no van desenvolupar neoplàsies hepàtiques associades a l'obesitat (Jiménez *et al*., 2018).

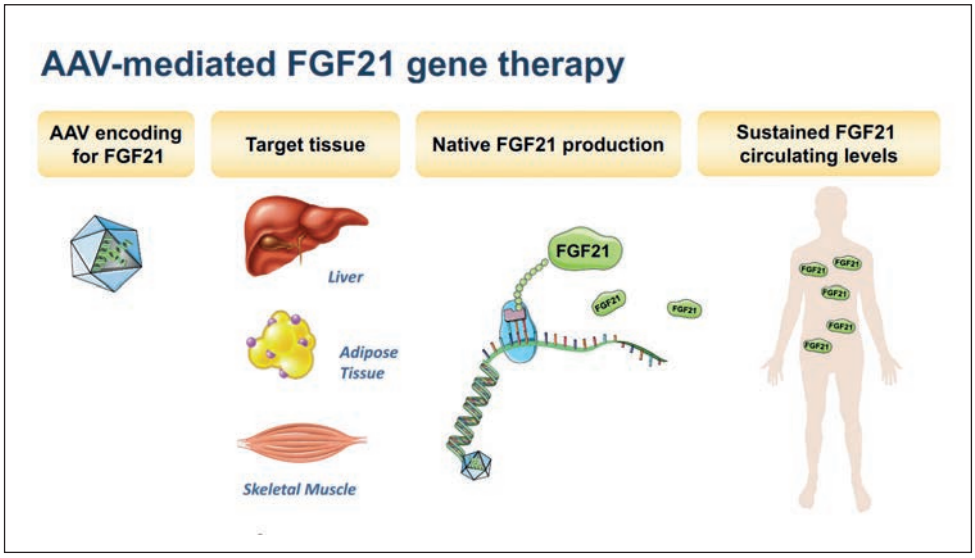

Fig. 25. Transferència mitjançant vectors AAV del gen del FGF21 al fetge, al teixit adipós blanc o al múscul esquelètic. La manipulació genètica de qualsevol d'aquests teixits perifèrics permetria la producció de la proteïna FGF21 nativa que seria secretada a la circulació sanguínia i distribuïda a tot l'organisme. Així, el fetge, el teixit adipós blanc o el múscul esquelètic actuarien com una bomba que produiria constantment FGF21 amb finalitats terapèutiques després d'una única administració dels vectors AAV-FGF21.

També, d'una manera semblant al fetge, hem demostrat en diferents ratolins model d'obesitat i resistència a la insulina que tant la manipulació genètica amb vectors AAV-FGF21 del teixit adipós blanc epididímic (*epididymal white adipose tissue*, eWAT) com del múscul esquelètic resulta en una gran reducció del pes corporal, de l'adipositat, de l'esteatosi hepàtica i de la resistència a la insulina a molt llarg termini (Jiménez *et al*., 2013 i 2018) (figura 27). Així mateix, hem observat en aquests

animals que el tractament amb AAV-FGF21 era capaç de contrarestar les alteracions neuromusculars (defectes en la coordinació, en l'equilibri i en la força muscular), i també de l'ansietat que desenvolupen els animals obesos i diabètics. D'altra banda, es va observar una millora en els dèficits cognitius, com la pèrdua de memòria, en comparació amb els ratolins malalts no tractats (figura 27).

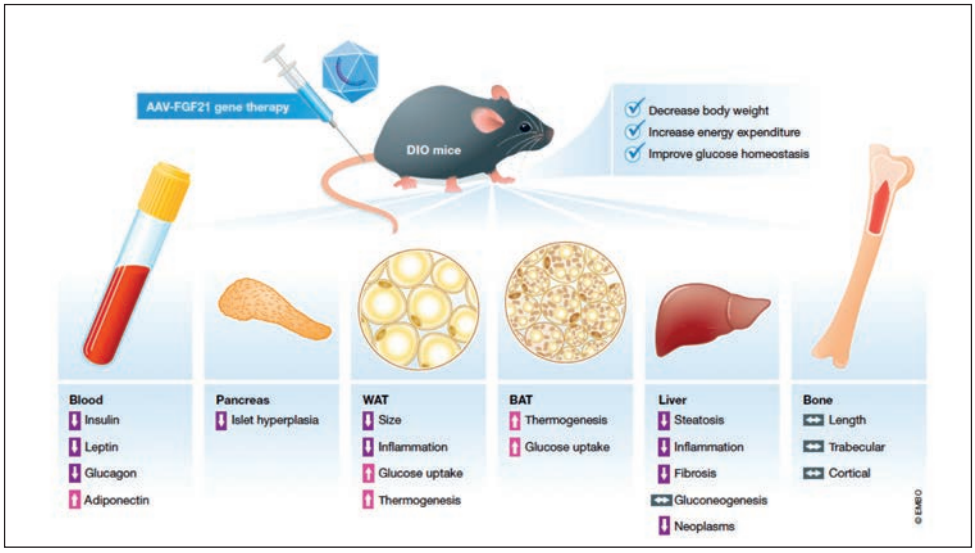

Fig. 26. Esquema representatiu de la reversió de la resistència a la insulina i l'obesitat en animals model mitjançant la manipulació genètica del fetge amb vectors AAV-FGF21. L'expressió de FGF21 mitjançada per AAV al fetge i la secreció constant de FGF21 a la circulació sanguínia promou un gran nombre de millores metabòliques en els teixits clau d'animals obesos i amb DT2, que resulta finalment en una reversió completa de la malaltia (Adaptat de Sponton & Kajimura, 2018)FGF21 is released into the circulation and acts as an endocrine hormone by binding with low affinity to FGF receptors (FGFRs.

També hem observat que la producció de FGF21 després de la manipulació genètica del múscul esquelètic d'animals sans alimentats amb una dieta estàndard de laboratori era capaç de prevenir l'augment de pes i la resistència a la insulina associats a l'envelliment. A més, els ratolins vells tractats amb AAV-FGF21 van presentar una gran millora en els nivells d'activitat física, en la coordinació, en l'equilibri i en la força del múscul esquelètic, paràmetres que es deterioren amb l'edat (figura 28). Cal destacar que els ratolins vells tractats amb AAV-FGF21 també van mostrar una gran millora en la pèrdua de memòria associada a l'envelliment, i presentaven uns

Fig. 27. Tractament del comportament i dèficits cognitius en models murins d'obesitat i resistència a la insulina mitjançant estratègies de teràpia gènica amb vectors AAV-FGF21. L'expressió de FGF21 mitjançada per AAV al múscul esquelètic o al teixit adipós blanc i la secreció constant de FGF21 a la circulació sanguínia normalitza el pes corporal i incrementa la sensibilitat a la insulina (test de tolerància a la insulina, ITT) d'una manera dependent de la dosi. A més, contraresta les alteracions neuromusculars (equilibri, coordinació, força muscular i activitat locomotora), així com l'ansietat, i reverteix la pèrdua de memòria associada a l'obesitat i resistència a la insulina.

nivells cognitius similars als d'animals joves (figura 28). És important remarcar que aquestes millores es van obtenir en absència d'efectes secundaris, malgrat l'elevació contínua en sèrum de FGF21 al llarg de tota la vida de l'animal. Així doncs, la teràpia gènica amb FGF21 en individus sans provoca un envelliment més saludable. Per tant, aquests estudis demostren clarament que la teràpia gènica amb FGF21 és segura a molt llarg termini (figura 28).

Els estudis en qüestió proporcionen la primera prova de concepte d'una aproximació de transferència de gens segura i eficaç a llarg termini per al tractament de la DT2, l'obesitat i les seves comorbiditats. També, mostren que la teràpia gènica amb FGF21 té un gran potencial translacional per trobar un tractament més efectiu per als pacients.

Amb aquesta finalitat, recentment hem creat d'una nova empresa derivada (*spin-off*) de teràpia gènica (Tramontane Therapeutics), centrada a desenvolupar tractaments

per a malalties metabòliques i neurodegeneratives d'alta prevalença que afecten una gran població de pacients. Esperem que en els propers mesos ja podrem iniciar les activitats de la nova companyia i posar en marxa el pla de desenvolupament per poder arribar a la clínica al més aviat possible.

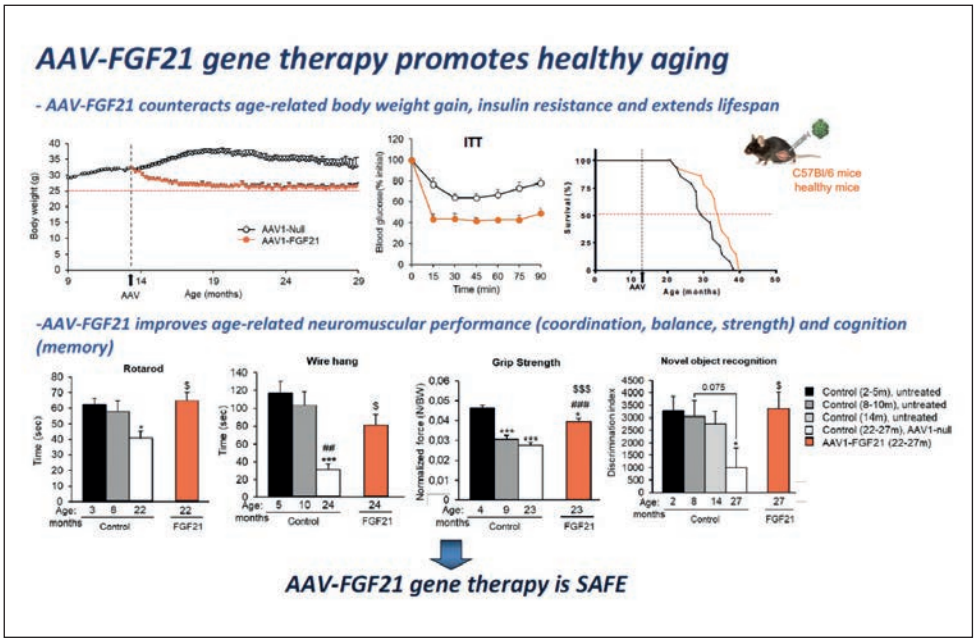

Fig. 28. Efectes a llarg termini en animals sans del tractament amb AAV-FGF21. L'expressió de FGF21 mitjançada per AAV al múscul esquelètic i la secreció constant de FGF21 a la circulació sanguínia contraresta el guany de pes i la resistència a la insulina, així com les alteracions neuromusculars (equilibri, coordinació, força muscular), i reverteix la pèrdua de memòria associada a l'edat. Aquests resultats demostren que la teràpia gènica amb FGF21 promou un envelliment saludable i és segura a llarg termini.

5. CONSIDERACIONS FINALS

La teràpia gènica és sens dubte l'àrea més emocionant de la biotecnologia en aquest moment, tant pels avenços recents com per les possibilitats a l'horitzó. Actualment, la teràpia gènica es troba en un punt d'inflexió. Els èxits recents en medicina genètica han obert el camí cap a una segona onada de teràpies més àmplia i han establert les bases per a tecnologies de nova generació.

En els darrers anys, s'han desenvolupat nombroses teràpies gèniques d'èxit centrades en malalties monogèniques minoritàries. A mesura que la teràpia gènica arriba finalment a l'edat madura, els coneixements adquirits en aquests primers tractaments representen un enorme potencial per a ampliar el camp i aplicar la teràpia gènica a malalties complexes, no hereditàries i d'alta prevalença que afecten grans poblacions de pacients.

En aquest context, en la present memòria es mostra de manera resumida la recerca que hem estat desenvolupant al nostre laboratori, primer per al tractament de malalties minoritàries (mucopolisacaridosis), que ja han arribat a la clínica, i després, a partir dels avenços i el coneixement adquirit, per al desenvolupament de noves teràpies adreçades a malalties com la diabetis de tipus 1 i la de tipus 2. Les expectatives d'aquests desenvolupaments són enormes i representaran un nou paradigma en el tractament de moltes malalties humanes en un futur proper.

BIBLIOGRAFIA

Adams, A. C.; Yang, C.; Coskun, T.; Cheng, C. C.; Gimeno, R. E.; Luo, Y.; Kharitonenkov, A. (2013). «The breadth of FGF21's metabolic actions are governed by FGFR1 in adipose tissue». *Mol. Metab.*, 2, p. 31-37.

Berglund, E. D.; Li, C. Y.; Bina, H. A.; Lynes, S. E.; Michael, M. D.; Shanafelt, A. B.; Kharitonenkov, A.; Wasserman, D. H. (2009). «Fibroblast growth factor 21 controls glycemia via regulation of hepatic glucose flux and insulin sensitivity». *Endocrinology*, 150, p. 4084-4093.

Braulke, T.; Bonifacino, J. S. (2009). «Sorting of lysosomal proteins». *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1793, p. 605-614.

Buchlis, G.; Podsakoff, G. M.; Radu, A.; Hawk, S. M.; Flake, A. W.; Mingozzi, F.; High, K. A. (2012). «Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer». *Blood*, 119, p. 3038-3041.

Callejas, D.; Mann, C. J.; Ayuso, E.; Lage, R.; Grifoll, I.; Roca, C.; Andaluz, A.; Ruiz-de Gopegui, R.; Montané, J.; Muñoz, S. [*et al.*] (2013). «Treatment of diabetes and long-term survival after insulin and glucokinase gene therapy». *Diabetes*, 62, p. 1718-1729.

Fedele, A. (2015). «Sanfilippo syndrome: causes, consequences, and treatments». *Appl. Clin. Genet.*, 8, p. 269.

Haslam, D. W.; James, W. P. T. (2005). «Obesity». *Lancet*, 366, p. 1197-1209.

Haurigot, V.; Bosch, F. (2013). «Toward a gene therapy for neurological and somatic MPSIIIA». *Rare Dis.*, 1, p. e27209.

Haurigot, V.; Marcó, S.; Ribera, A.; Garcia, M.; Ruzo, A.; Villacampa, P.; Ayuso, E.; Añor, S.; Andaluz, A.; Pineda, M. [*et al.*] (2013). «Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy». *J. Clin. Invest.*, 123, p. 3254-3271.

Jaén, M. L.; Vilà, L.; Elias, I.; Jimenez, V.; Rodó, J.; Maggioni, L.; Ruiz-de Gopegui, R.; Garcia, M.; Muñoz, S.; Callejas, D. [*et al.*] (2017). «Long-term efficacy and safety of insulin and glucokinase gene therapy for diabetes: 8-year follow-up in dogs». *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, 6, p. 1-7.

Jimenez, V.; Munoz, S.; Casana, E.; Mallol, C.; Elias, I.; Jambrina, C.; Ribera, A.; Ferre, T.; Franckhauser, S.; Bosch, F. (2013). «In vivo adeno-associated viral vector-mediated genetic engineering of white and brown adipose tissue in adult mice». *Diabetes*, 62, p. 4012-4022.

Jimenez, V.; Jambrina, C.; Casana, E.; Sacristan, V.; Muñoz, S.; Darriba, S.; Rodó, J.; Mallol, C.; Garcia, M., León, X. [*et al.*] (2018). «FGF21 gene therapy as treatment for obesity and insulin resistance». *EMBO Mol. Med.*, 10.

Kahn, B. B. (1996). «Glucose transport: Pivotal step in insulin action». *Diabetes*, 45, p. 1644-1654.

Kharitonenkov, A.; DiMarchi, R. (2017). «Fibroblast growth factor 21 night watch: advances and uncertainties in the field». *J. Intern. Med.*, 281, p. 233-246.

Kharitonenkov, A.; Wroblewski, V. J.; Koester, A.; Chen, Y.-F.; Clutinger, C. K.; Tigno, X. T.; Hansen, B. C.; Shanafelt, A. B.; Etgen, G. J. (2007). «The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21». *Endocrinology*, 148, p. 774-781.

Leal, A. F.; Espejo-Mojica, A. J.; Sánchez, O. F.; Ramírez, C. M.; Reyes, L. H.; Cruz, J. C.; Almeciga-Díaz, C. J. (2020). «Lysosomal storage diseases: current therapies and future alternatives». *J. Mol. Med*., 98, p. 931-946.

Marcó, S.; Haurigot, V.; Bosch, F. (2019). «In vivo gene therapy for mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome): A new treatment horizon». *Hum. Gene Ther.*, 30, p. 1211-1221.

Mas, A.; Montané, J.; Anguela, X. M.; Muñoz, S.; Douar, A. M.; Riu, E.; Otaegui, P.; Bosch, F. (2006). «Reversal of type 1 diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle». *Diabetes*, 55, p. 1546-1553.

Mayeux, R.; Stern, Y. (2012). «Epidemiology of Alzheimer disease». *Cold Spring Harb. Perspect. Med*., 2, p. a006239.

Mendell, J. R.; Al-Zaidy, S. A.; Rodino-Klapac, L. R.; Goodspeed, K.; Gray, S. J.; Kay, C. N.; Boye, S. L.; Boye, S. E.; George, L. A.; Salabarria, S. [*et al*.] (2020). «Current clinical applications of in vivo gene therapy with AAVs». *Mol. Ther.*

Mingozzi, F.; High, K. A. (2011). «Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: Progress and challenges». *Nat. Rev. Genet*., 12, p. 341-355.

Moller, D. E.; Flier, J. S. (1991). «Insulin resistance — mechanisms, syndromes, and implications». *N. Engl. J. Med*., 325, p. 938-948.

Motas, S.; Haurigot, V.; Garcia, M.; Marcó, S.; Ribera, A.; Roca, C.; Sánchez, X.; Sánchez, V.; Molas, M.; Bertolin, J. [*et al*.] (2016). «CNS-directed gene therapy for the treatment of neurologic and somatic mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome)». *JCI Insight*, 1, p. e86696.

Nagree, M. S.; Scalia, S.; McKillop, W. M.; Medin, J. A. (2019). «An update on gene therapy for lysosomal storage disorders». *Expert Opin. Biol. Ther.*, 19, p. 655-670.

Nathwani, A. C.; Rosales, C.; McIntosh, J.; Rastegarlari, G.; Nathwani, D.; Raj, D.; Nawathe, S.; Waddington, S. N.; Bronson, R.; Jackson, S. [*et al*.] (2011). «Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins». *Mol. Ther.*, 19, p. 876-885.

Okuyama, T.; Tanaka, A.; Suzuki, Y.; Ida, H.; Tanaka, T.; Cox, G. F.; Eto, Y.; Orii, T. (2010). «Japan Elaprase® Treatment (JET) study: Idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II)». *Mol. Genet. Metab*., 99, p. 18-25.

Otaegui, P. J.; Ferre, T.; Pujol, A.; Riu, E.; Jimenez, R.; Bosch, F. (2000). «Expression of glucokinase in skeletal muscle: a new approach to counteract diabetic hyperglycemia». *Hum. Gene Ther.*, 11, p. 1543-1552.

Parenti, G.; Andria, G.; Ballabio, A. (2015). «Lysosomal storage diseases: From pathophysiology to therapy». *Annu. Rev. Med.*, 66, p. 471-486.

Platt, F. M. (2018). «Emptying the stores: Lysosomal diseases and therapeutic strategies». *Nat. Rev. Drug Discov.*

Printz, R. L.; Koch, S.; Potter, L. R.; O'Doherty, R. M.; Tiesinga, J. J.; Moritz, S.; Granner, D. K. (1993*a*). «Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution». *J. Biol. Chem.*, 268, p. 5209-5219.

Printz, R. L.; Magnuson, M. A.; Granner, D. K. (1993*b*). «Mammalian glucokinase». *Annu. Rev. Nutr.*, 13, p. 463-496.

Ribera, A.; Haurigot, V.; Garcia, M.; Marcó, S.; Motas, S.; Villacampa, P.; Maggioni, L.; León, X.; Molas, M.; Sánchez, V. [*et al.*] (2015). «Biochemical, histological and functional correction of mucopolysaccharidosis Type IIIB by intra-cerebrospinal fluid gene therapy». *Hum. Mol. Genet.*, 24, p. 2078-2095.

Roberts, D. L.; Dive, C.; Renehan, A. G. (2010). «Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: New perspectives». *Annu. Rev. Med.*, 61, p. 301-316.

Roca, C.; Motas, S.; Marcó, S.; Ribera, A.; Sánchez, V.; Sánchez, X.; Bertolin, J.; León, X.; Pérez, J.; Garcia, M. [*et al.*] (2017). «Disease correction by AAV-mediated gene therapy in a new mouse model of mucopolysaccharidosis type IIID». *Hum. Mol. Genet.*, 26, p. 1535-1551.

Ruzo, A.; Garcia, M.; Ribera, A.; Villacampa, P.; Haurigot, V.; Marcó, S.; Ayuso, E.; Anguela, X. M.; Roca, C.; Agudo, J. [*et al.*] (2012*a*). «Liver production of sulfamidase reverses peripheral and ameliorates CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIA mice». *Mol. Ther.*, 20, p. 254-266.

Ruzo, A.; Marcó, S.; García, M.; Villacampa, P.; Ribera, A.; Ayuso, E.; Maggioni, L.; Mingozzi, F.; Haurigot, V.; Bosch, F. (2012*b*). «Correction of pathological accumulation of glycosaminoglycans in central nervous system and peripheral tissues of MPSIIIA mice through systemic AAV9 gene transfer». *Hum. Gene Ther.*, 23, p. 1237-1246.

So, W. Y.; Leung, P. S. (2016). «Fibroblast growth factor 21 as an emerging therapeutic target for type 2 diabetes mellitus». *Med. Res. Rev.*, 36, p. 672-704.

Valstar, M. J.; Ruijter, G. J.; van Diggelen, O. P.; Poorthuis, B. J.; Wijburg, F. A. (2008). «Sanfilippo syndrome: A mini-review». *J. Inherit. Metab. Dis.*, 31, p. 240-252.

Wang, D.; Tai, P. W. L.; Gao, G. (2019). «Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery». *Nat. Rev. Drug Discov.*, 18, p. 358-378.

Wraith, J. E.; Scarpa, M.; Beck, M.; Bodamer, O. A.; De Meirleir, L.; Guffon, N.; Meldgaard Lund, A.; Malm, G.; Van Der Ploeg, A. T.; Zeman, J. (2008). «Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): A clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy». *Eur. J. Pediatr.*, 167, p. 267-277.

Yamada, Y.; Tomatsu, S.; Sukegawa, K.; Suzuki, Y.; Kondo, N.; Hopwood, J. J.; Orii, T. (1993). «Mucopolysaccharidosis type II (Hunter disease): 13 gene mutations in 52 Japanese patients and carrier detection in four families». *Hum. Genet.*, 92, p. 110-114.

RESUM

La teràpia gènica representa una nova eina prometedora per al tractament més eficaç d'aquelles malalties que les teràpies convencionals amb medicaments no poden assolir. Una part important de la nostra investigació s'ha centrat a desenvolupar nous enfocaments de teràpia gènica basats en vectors virals adenoassociats (AAV) per al tractament de les mucopolisacaridosis (MPS), un grup de malalties monogèniques metabòliques i neurodegeneratives devastadores, caracteritzades per l'emmagatzematge lisosòmic de macromolècules. L'administració de vectors AAV que codificaven una còpia correcta del gen mutat al líquid cefalorraquidi va corregir tant les alteracions en el sistema nerviós central com la patologia somàtica en ratolins model de les diferents MPS (MPSII, MPSIIIA, MPSIIIB i MPSIIID). En tots els casos, l'activitat enzimàtica va augmentar al cervell en conjunt i al sèrum, cosa que va donar lloc a la correcció de la patologia lisosòmica en tot l'organisme, a la normalització dels dèficits de comportament i a un augment de la supervivència. Aquests resultats constitueixen la base per a la translació clínica d'aquestes teràpies per a les MPS en pacients.

Una part molt important de la nostra recerca s'ha centrat també a desenvolupar estratègies de teràpia gènica per a malalties d'alta prevalença, com la diabetis *mellitus* de tipus 1 i 2 (DT1 i DT2), causades per múltiples gens i factors ambientals. En aquest cas, la teràpia gènica s'enfronta a un paradigma nou a causa del repte que representa la identificació de gens potencialment terapèutics. En aquest context hem desenvolupat un tractament per a la DT1, caracteritzada per hiperglucèmia a causa de la deficiència d'insulina deguda a la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β pancreàtiques. El múscul esquelètic és el responsable principal de la captació de glucosa circulant. Al nostre grup, hem demostrat que és possible generar un «sensor de glucosa» al múscul esquelètic capaç d'incrementar la captació de glucosa en condicions de diabetis mitjançant l'expressió conjunta dels gens de la glucoquinasa (GCK) i la insulina (Ins). L'administració intramuscular d'AAV-Ins i AAV-GCK va corregir la hiperglucèmia a molt llarg termini tant en ratolins com en gossos diabètics. Aquest tractament està avui en fase de desenvolupament clínic per a la teràpia en pacients diabètics de tipus 1.

En paral·lel, el nostre grup també ha abordat el tractament mitjançant teràpia gènica de la DT2, la qual està molt associada amb l'obesitat. Vam identificar el factor de creixement del fibroblast 21 (FGF21), un dels principals reguladors del metabolisme de la glucosa i dels lípids, com a potencial gen candidat per a tractar la DT2. L'administració de vectors AAV que codificaven FGF21 va permetre un augment dels nivells circulants de FGF21, que va revertir l'obesitat, l'esteatosi hepàtica i la resistència a la insulina en diferents models murins d'obesitat i DT2. Aquests estudis demostren que la teràpia gènica amb FGF21 té un gran potencial translacional per trobar un tractament més efectiu per als pacients en un futur proper.

Així doncs, els estudis d'aquesta memòria mostren que la teràpia gènica obre un nou horitzó cap a la cura no només de malalties monogèniques sinó també de malalties d'alta prevalença.

RESUMEN

La terapia génica representa una nueva herramienta prometedora para el tratamiento más eficaz de aquellas enfermedades que las terapias convencionales con medicamentos no pueden conseguir. Una parte importante de nuestra investigación se ha centrado en el desarrollo de nuevos enfoques de terapia génica basados en vectores virales adenoasociados (AAV) para el tratamiento de las mucopolisacaridosis (MPS), un grupo de enfermedades monogénicas metabólicas y neurodegenerativas devastadoras, caracterizadas por el almacenamiento lisosómico de macromoléculas. La administración de vectores AAV que codificaban una copia correcta del gen mutado en el líquido cefalorraquídeo corrigió tanto las alteraciones en el sistema nervioso central como la patología somática en modelos de ratón de las diferentes MPS (MPSII, MPSIIIA, MPSIIIB y MPSIIID). En todos los casos, la actividad enzimática aumentó en el cerebro en conjunto y en el suero, dando lugar a la corrección de la patología lisosómica en todo el organismo, a la normalización de los déficits de comportamiento y a un aumento de la supervivencia. Estos resultados constituyen la base para la traslación clínica de estas terapias para las MPS en pacientes.

Una parte muy importante de nuestra investigación se ha centrado también en el desarrollo de estrategias de terapia génica para enfermedades de alta prevalencia, como la diabetes *mellitus* de tipo 1 y 2 (DT1 y DT2), causadas por múltiples genes y factores ambientales. En este caso, la terapia génica se enfrenta a un nuevo paradigma debido al reto que supone la identificación de genes potencialmente terapéuticos. En este contexto hemos desarrollado un tratamiento para la DT1, caracterizada por hiperglucemia a causa de deficiencia de insulina debida a la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. El músculo esquelético es el principal responsable de la captación de glucosa circulante. En nuestro grupo, hemos demostrado que es posible generar un «sensor de glucosa» en el músculo esquelético en condiciones de diabetes capaz de incrementar la captación de glucosa mediante la expresión conjunta de los genes de la glucoquinasa (GCK) y la insulina (Ins). La administración intramuscular de vectores AAV-Ins y AAV-GCK corrigió la hiperglucemia a largo plazo tanto en ratones como en perros diabéticos. Este tratamiento se encuentra actualmente en fase de desarrollo clínico para la terapia en pacientes diabéticos de tipo 1.

En paralelo, nuestro grupo también ha abordado el tratamiento mediante terapia génica de la DT2, que está muy asociada con la obesidad. Identificamos el factor de crecimiento del fibroblasto 21 (FGF21), uno de los principales reguladores del metabolismo de la glucosa y de los lípidos, como un potencial gen candidato para tratar la DT2. La administración de vectores AAV que codificaban FGF21 permitió un aumento de los niveles circulantes de FGF21, que revirtió la obesidad, la esteatosis hepática y la resistencia a la insulina en distintos modelos murinos de obesidad y DT2. Estos estudios demuestran que la terapia génica con FGF21 tiene un gran po-

tencial traslacional para encontrar un tratamiento más efectivo para los pacientes en un futuro próximo.

Así pues, los estudios de esta memoria muestran cómo la terapia génica abre un nuevo horizonte hacia la cura no solo de enfermedades monogénicas sino también de enfermedades de alta prevalencia.

SUMMARY

Gene therapy is a promising new tool for the effective treatment of those diseases that conventional drug therapies cannot achieve. An important part of our research has focused on the development of new gene therapy approaches based on adeno-associated vectors (AAV) for the treatment of mucopolysaccharidosis (MPS), a group of devastating metabolic and neurodegenerative monogenic diseases, characterized by the lysosomal storage of macromolecules. Administration of AAV vectors encoding a correct copy of the mutated gene in the cerebrospinal fluid corrected both the alterations in the central nervous system and the somatic pathology in mouse models of several MPSs (MPSII, MPSIIIA, MPSIIIB, and MPSIIID). In all cases, enzymatic activity increased throughout the brain and serum, leading to the correction of lysosomal pathology in the whole body, the normalization of behavioural deficits, and increased survival. These results constitute the basis for the clinical translation of these therapies for MPS patients.

A very important part of our research has also focused on the development of gene therapy strategies for highly prevalent diseases, such as type 1 and 2 diabetes *mellitus* (T1D and T2D), caused by multiple genes and environmental factors. In this case, gene therapy faces a new paradigm due to the challenge of identifying potentially therapeutic genes. In this context, we have developed a treatment for T1D, characterized by hyperglycemia due to insulin deficiency as a result of the autoimmune destruction of pancreatic β cells. Skeletal muscle is the most important tissue for glucose disposal from blood. In our group, we have demonstrated that it is possible to generate a "glucose sensor" in skeletal muscle, that can increase glucose uptake, through the co-expression of glucokinase (GCK) and insulin (Ins) genes. Intramuscular administration of AAV-Ins and AAV-GCK mediated long-term counteraction of hyperglycemia in both diabetic mice and dogs. This treatment is currently in clinical development for the treatment of type 1 diabetic patients.

In parallel, our group has also addressed the gene therapy treatment of T2D, which is closely associated with obesity. Our group identified the fibroblast growth factor 21 (FGF21), one of the major regulators of glucose and lipid metabolism, as a potential candidate gene to treat T2D. Administration of AAV vectors encoding FGF21 resulted in increased circulating levels of FGF21, which reversed obesity, hepatic steatosis, and insulin resistance in different murine models of obesity and T2D. These studies prove that FGF21 gene therapy has great translational potential to find a more effective treatment for obese and diabetic patients in the near future.

Altogether, these studies demonstrate how gene therapy opens a new horizon for the treatment of not only monogenic diseases but also of highly prevalent diseases.

DISCURS DE RESPOSTA PER L'ACADÈMIC NUMERARI EXCM. SR. DR. ERNEST GIRALT I LLEDÓ

Aquests darrers cent anys, la química ha contribuït d'una manera molt important a la lluita de la humanitat contra la malaltia. Primer van ser molècules petites, els fàrmacs tradicionals; després, pèptids i proteïnes, i els últims a incorporar-se a aquesta batalla han estat els àcids nucleics.

Un cop d'ull a la llista de científics premiats amb el Nobel de Química o de Medicina d'aquests darrers anys ens permet traçar, a grans trets, aquesta història.

Tot comença el 1957, quan Alexander Todd, de Cambridge, fou guardonat pel descobriment de l'estructura química dels àcids nucleics. Cinc any després, Crick i Watson rebrien el Nobel de Medicina pel descobriment de la conformació (l'estructura tridimensional) de l'ADN.

Har Gobind Khorana va ser el primer científic capaç de sintetitzar químicament cadenes d'àcids nucleics. Aquest descobriment va ser clau per a assolir una de les fites més importants del coneixement humà: el desxiframent del codi genètic. Aquest desxiframent li valgué a Khorana el Premi Nobel de Medicina de 1968, compartit amb Nirenberg i Holley. Onze anys més tard, el 1979, el mateix Khorana publicava a la revista Science la primera síntesi total d'un gen.

La manera com sintetitzem avui dia els àcids nucleics és molt diferent i extraordinàriament més eficaç que la utilitzada per Khorana. Està basada en el mètode de síntesi en fase sòlida descobert per Bruce Merrifield (Premi Nobel de Química el 1984). Aquesta eficàcia permet tenir un fàcil accés als àcids nucleics per a diferents aplicacions. En ciència de materials destaquen els origamis d'ADN; en diagnosi clínica, la tècnica PCR ('reacció en cadena de la polimerasa'), descoberta pel nord-americà Kary Mullis (Premi Nobel de Química el 1993), i, pel que fa a l'ús d'àcids nucleics com a fàrmacs, en el que portem de segle XXI s'han aprovat ja més d'una dotzena de medicaments basats en aquest tipus de composts i més d'un centenar es troben en fase d'assaig clínic.

La teràpia gènica, disciplina a la qual la professora Fàtima Bosch ha dedicat gairebé tota la seva carrera científica, representa, segons el meu parer, la darrera frontera d'aquest desenvolupament de la química dels àcids nucleics. *Reparar el genoma de les nostres cèl·lules quan aquest genoma és defectuós!*

Com deia abans, la professora Fàtima Bosch ha dedicat la seva carrera científica a explorar i intentar travessar aquesta frontera. En acabar la seva tesi doctoral en bioquímica a la Universitat de Barcelona, va dur a terme estades postdoctorals als Estats Units, a la Vanderbilt University, a la Case Western Reserve University i, finalment, l'any 1991, al NCI-Frederick Cancer Research and Development Center. Allà

es familiaritzà amb les tècniques més avançades per a produir animals transgènics i publicà els seus primers articles utilitzant aquesta tecnologia. A la seva tornada a Catalunya es reincorporà a la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), on des d'aleshores ha liderat un potent grup de recerca enfocat d'una manera prioritària a desenvolupar enfocaments de teràpia gènica, utilitzant virus adenoassociats, per a malalties metabòliques i neurodegeneratives. Al llarg de la seva carrera, la professora Bosch ha rebut nombrosos premis i distincions. Entre d'altres, el Premi Rey Don Juan Carlos I (1985), el Narcís Monturiol (2002), la Creu de Sant Jordi (2005), el Premi Alberto Sols (2006), l'ICREA Academia (2012 i 2018), el Jacob's Ladder Norman Saunders International Research Prize (2019) i els premis Transfer (2020) del Consell Social de la UAB. Ha estat membre fundadora de la Societat Europea de Teràpia Gènica i Cel·lular (1992), presidenta de la Societat Espanyola de Teràpia Gènica i Cel·lular (2007-2009), vicepresidenta de l'Associació Europea per a l'Estudi de la Diabetis (2009-2012)) i membre del grup d'experts en dopatge gènic de l'Agència Mundial Antidopatge (2013-actualitat).

Com deia abans, la doctora Bosch lidera un potent grup de recerca a la UAB, on des del 1999 és catedràtica de bioquímica. Les seves línies de recerca actuals se centren, d'una banda, en l'estudi de la diabetis *mellitus* i l'obesitat utilitzant models animals transgènics i explorant l'ús terapèutic d'aproximacions de teràpia gènica. De l'altra, el seu grup és també molt actiu en l'ús de teràpia gènica per al tractament de malalties metabòliques hereditàries, en especial, les mucopolisacaridosis (MPS).

Per acabar voldria destacar un aspecte, a parer meu, molt interessant, de la trajectòria científica de Fàtima Bosch. Em refereixo a la seva constant dedicació a la transferència des de la ciència bàsica cap a l'aplicació biomèdica. La seva llista de projectes en col·laboració amb empreses és, senzillament, impressionant. Des de 2010 ha signat contractes molt importants amb la farmacèutica Esteve per a desenvolupar tractaments per a la MPS i malalties minoritàries del sistema nerviós central. Així mateix, el 2020, la UAB va llicenciar a l'empresa Kriya Therapeutics dos nous programes de teràpia gènica desenvolupats al seu laboratori per al tractament de la diabetis de tipus 1. Col·labora també amb l'empresa Telomere Therapeutics en el desenvolupament de teràpies gèniques per a la fibrosi pulmonar. Tornant al desenvolupament de teràpies gèniques per a trastorns hereditaris greus, com ara la MPS, quatre medicaments per a teràpia gènica han rebut la designació de medicament orfe —Agència Europea de Medicaments (EMA) i Administració d'Aliments i Fàrmacs (FDA) americana—, i l'assaig clínic de fase I/II per a MPSIIIA està en curs.

Pionera en un país com el nostre, que no tenia cap tradició en el camp de la teràpia gènica, Fàtima Bosch ha aconseguit que la nostra comunitat científica participi d'aquesta cursa pel coneixement tan il·lusionant i important. Aquest és, segons la meva opinió, el seu mèrit principal.

Per tot això, prego a la Reial Acadèmia de Ciències i Arts de Barcelona que vulgui admetre com a acadèmica numerària la professora Fàtima Bosch, ja que estic segur que amb la seva experiència i amb la seva activitat científica prestigiarà aquesta institució.

Amiga Fàtima, benvinguda a aquesta casa, que d'ara endavant serà també la teva.