



MEDICINA CLÍNICA

www.elsevier.es/medicinaclinica



Revisión

Terapia génica en el tratamiento de los errores congénitos del metabolismo

Jordi Pérez-López

Unidad de Errores Congénitos del Metabolismo en el Adulto, Servicio de Medicina Interna, Hospital General Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 17 de marzo de 2013

Aceptado el 23 de mayo de 2013

On-line el xxx

Palabras clave:

Terapia génica

Errores congénitos del metabolismo,

Tratamiento enzimático sustitutivo

RESUMEN

En la mayoría de los errores congénitos del metabolismo existe un defecto enzimático que produce el bloqueo de una ruta metabólica y el acúmulo de metabolitos tóxicos. Para su tratamiento actualmente disponemos de la restricción dietética, la potenciación de otras vías metabólicas alternativas y la sustitución de la enzima deficitaria mediante el trasplante de células, el trasplante hepático o la administración de la enzima purificada. La terapia génica, mediante la transferencia en el organismo de una copia correcta del gen alterado mediante un vector, se perfila como el futuro en el tratamiento de este tipo de enfermedades. Sin embargo, la dificultad de los vectores actualmente empleados en atravesar la barrera hematoencefálica, su respuesta inmunitaria, su toxicidad celular, así como su potencial oncogénesis limitan enormemente su aplicación clínica en humanos.

© 2013 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Gene therapy for the treatment of inborn errors of metabolism

ABSTRACT

Due to the enzymatic defect in inborn errors of metabolism, there is a blockage in the metabolic pathways and an accumulation of toxic metabolites. Currently available therapies include dietary restriction, empowering of alternative metabolic pathways, and the replacement of the deficient enzyme by cell transplantation, liver transplantation or administration of the purified enzyme. Gene therapy, using the transfer in the body of the correct copy of the altered gene by a vector, is emerging as a promising treatment. However, the difficulty of vectors currently used to cross the blood brain barrier, the immune response, the cellular toxicity and potential oncogenesis are some limitations that could greatly limit its potential clinical application in human beings.

© 2013 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Los errores congénitos del metabolismo (ECM) son un conjunto muy heterogéneo de trastornos hereditarios originados fundamentalmente por una mutación en un gen que codifica la enzima que cataliza una reacción química celular. Como consecuencia, la enzima resulta cualitativa o cuantitativamente alterada y se produce un bloqueo metabólico a ese nivel. Su mecanismo de herencia es autosómico recesivo en la mayoría de los casos, y unos pocos se heredan de manera recesiva ligada al cromosoma X.

Existen más de 300 ECM descritos, y se consideran enfermedades raras por su baja prevalencia en la población general. A pesar de ello, se espera un incremento en su incidencia debido a la aparición de nuevas técnicas diagnósticas, los nuevos programas

de cribado neonatal instaurados en nuestro país, y su mayor conocimiento entre los profesionales sanitarios.

En la edad pediátrica, los trastornos del metabolismo intermedio pueden comenzar en forma de encefalopatía, acidosis metabólica e hiperamonemia agudas. Otras formas de presentación incluyen síntomas neurológicos progresivos y síntomas concretos que pueden orientar hacia el diagnóstico, como, por ejemplo, la esplenomegalia en la enfermedad de Gaucher o la mancha rojo cereza en la retina en la gangliosidosis GM1¹.

Las enfermedades por depósito lisosomal y mitocondriales son las entidades que más frecuentemente comienzan en la edad adulta, con una clínica insidiosa y lentamente progresiva^{2,3}. Con menor frecuencia que en los pacientes pediátricos, los trastornos del metabolismo intermedio pueden presentarse en forma de descompensación aguda desencadenada por situaciones especialmente catabólicas, como el parto, las intervenciones quirúrgicas, el ejercicio físico intenso, o las infecciones graves con repercusión sistémica^{4,5}.

Correo electrónico: jordpere@vhebron.net

0025-7753/\$ – see front matter © 2013 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2013.05.030>

Cómo citar este artículo: Pérez-López J. Terapia génica en el tratamiento de los errores congénitos del metabolismo. Med Clin (Barc). 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2013.05.030>

En la actualidad, y según el tipo de trastorno metabólico, existen diferentes tipos de tratamiento, siendo la terapia génica una opción terapéutica todavía experimental. Sin embargo, la reciente aprobación por parte de la Agencia Europea del Medicamento del primer fármaco huérfano de naturaleza génica en el déficit congénito de lipoproteína lipasa puede abrir una nueva etapa en el tratamiento de los ECM⁶.

Los objetivos de esta revisión son describir las principales opciones terapéuticas actualmente disponibles en los ECM y definir las bases y limitaciones de la terapia génica en el tratamiento de este tipo de enfermedades.

Tratamientos actualmente disponibles

Una dieta con restricción del producto que no puede ser metabolizado es el tratamiento de elección en algunos ECM, como la fenilcetonuria y la enfermedad del jarabe de arce. En caso de descompensación aguda, las acidurias orgánicas, los defectos del ciclo de la urea y algunos defectos de la beta-oxidación de los ácidos grasos pueden precisar de un tratamiento de urgencia con el objetivo de disminuir el metabolito tóxico proximal al punto del bloqueo metabólico. Para ello se puede realizar una estimulación del anabolismo mediante un aporte energético elevado o una estimulación de vías alternativas específicas. En casos especialmente graves se puede proceder a la eliminación exógena del metabolito tóxico mediante la diálisis⁷.

La idea de reponer la enzima deficitaria parte de los estudios con cultivos celulares realizados por Neufeld y su equipo a finales de la década de 1960. Estos investigadores descubrieron que el cultivo de fibroblastos con 2 formas diferentes de mucopolisacáridosis resultó en la corrección del defecto metabólico en ambas estirpes celulares, ya que los «mediadores» secretados por una estirpe para corregir el defecto metabólico de la otra eran en realidad la enzima deficitaria, que era endocitada y transportada a los lisosomas para realizar su función⁸.

Basada en esa idea, una forma de reposición enzimática es mediante la implantación de células con una actividad metabólica normal en el organismo con algún ECM. En este sentido, y a pesar de las limitaciones que conlleva la disponibilidad de un donante compatible y de los riesgos y la morbilidad asociada, el trasplante hepático o el de células hematopoyéticas ha demostrado, especialmente en la edad pediátrica, cierta eficacia. Entre las enfermedades en las se ha obtenido un beneficio clínico mediante el trasplante hepático cabe destacar el déficit de alfa-1-antitripsina, la enfermedad de Wilson, la tirosinemia y las glucogenosis tipo I y IV⁹. El trasplante de células hematopoyéticas, por otra parte, ha demostrado, si este se realiza en estadios precoces de la enfermedad, buenos resultados en la mucopolisacáridosis tipo I y VII, así como en la alfa-manosidosis o la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X¹⁰.

Durante las 2 últimas décadas, el mayor conocimiento de la fisiopatología de las enfermedades por depósito lisosomal ha permitido el tratamiento de reemplazo enzimático¹¹ mediante la infusión directa intravenosa de la enzima deficitaria (tabla 1). Aparte del impacto en la calidad de vida del paciente por la necesidad de infusiones repetidas y de por vida, y el elevado coste que supone para el sistema sanitario, una limitación importante de este tipo de tratamiento es su escaso efecto en los síntomas neurológicos, presentes en más del 75% de este tipo de enfermedades¹², debido a la imposibilidad de la molécula enzimática de atravesar la barrera hematoencefálica. Además, en fenotipos especialmente graves, en los que la enzima natural es casi inexistente, esta infusión puede producir una respuesta inmunológica a la enzima exógena, que puede influir en la eficacia del tratamiento¹³. Ambos factores han contribuido a poner en marcha nuevas estrategias para mitigar las limitaciones de este tratamiento, como, por ejemplo, regímenes de tolerancia inmunológica¹⁴, terapia de reducción del sustrato¹⁵, utilización de chaperonas¹⁶ o nuevos métodos experimentales de liberación farmacológica¹⁷.

Lo anteriormente expuesto hace necesaria la creación de nuevas opciones terapéuticas con el objetivo de mejorar la eficacia y la calidad de vida de los pacientes y de sus familias, así como aliviar el peso económico que suponen los tratamientos actualmente existentes.

Definición de terapia génica

La terapia génica se puede definir como la transferencia de material genético en un individuo con una finalidad terapéutica. En términos generales existen 3 técnicas principales utilizadas: 1) transferencia de ADN codificante de una proteína, de manera que se introduce una copia normal del gen con un promotor que induce su expresión; es la técnica más utilizada en trastornos monogénicos recesivos y, por tanto, en los ECM; 2) transferencia de ARN de interferencia o algún oligonucleótido antisentido para inhibir la expresión de un gen, que es una estrategia empleada en los trastornos de herencia mendeliana dominante, y 3) reparación de un gen defectuoso en lugar de aportar copias adicionales, que es la técnica menos utilizada y su aplicación clínica todavía parece lejana.

La introducción de material genético puede llevarse a cabo directamente sobre el organismo mediante administración intravenosa o intraórgano en un vector de empaquetamiento y transporte que hace posible su supervivencia sistémica y su introducción en las células (terapia génica *in vivo*), o bien a través de células extraídas del paciente, cultivadas y manipuladas genéticamente y reintroducidas tras su modificación (terapia génica *ex vivo*). Esta última técnica se ha utilizado en trasplante de médula ósea y tiene la ventaja de permitir el trasplante autólogo celular, con lo que se reducen las posibilidades de reacción injerto contra huésped.

Tabla 1
Tratamientos disponibles actualmente en Europa para las enfermedades por depósito lisosomal

Enfermedad	Enzima deficitaria	Fármaco	Compañía farmacéutica	Indicación
Gaucher tipo 1	Glucocerebrosidasa	Imiglucerasa Velaglucerasa Miglustat	Genzyme Shire Actelion	TSE TSE TRS
Fabry	Alfa-galactosidasa A	Agalsidasa α Agalsidasa β	Shire Genzyme	TSE TSE
Pompe	Alfa-glucosidasa	Alglucosidasa α	Genzyme	TSE
MPS tipo I (síndromes de Hurler, Hurler-Scheie y Scheie)	Alfa-L-iduronidasa	Laronidasa	BioMarin-Genzyme	TSE
MPS tipo II (síndrome de Hunter)	Iduronato-2-sulfatasa	Idursulfasa	Shire	TSE
MPS tipo VI (síndrome de Maroteaux-Lamy)	Arilsulfatasa B	Galsulfasa	BioMarin	TSE
Niemann-Pick tipo C	Ninguno	Miglustat	Actelion	TRS

MPS: mucopolisacáridosis; TRS: tratamiento de reducción del sustrato, TSE: tratamiento de sustitución enzimática.

Tabla 2

Ensayos clínicos con terapia génica en errores congénitos del metabolismo (1989-2012)

Enfermedad	País	ID	Fase	Estado	Año	Sistema utilizado
Gaucher	EE. UU.	US-0046	I	Cerrado	1993	TMO + RV
	EE. UU.	US-0047	I/II	Cerrado	1993	TMO + RV
	EE. UU.	US-0061	I	Cerrado	1994	CSP + RV
Fabry	EE. UU.	US-0377	I	Retirado	2000	SCM + RV
	Francia	FR-0005	I	Abierto	-	RV
	Reino Unido	UK-0011	I/II	Cerrado	1997	TMO + RV
MPS I	Reino Unido	UK-0043	I	Cerrado	1997	TMO + RV
	EE. UU.	US-0087	I	Cerrado	1995	LSP + RV
	Francia	FR-0049	I/II	Abierto	2011	VAA
MPS II	EE. UU.	US-0758	I	Cerrado	2006	TCH + LV
MPS III A	EE. UU.	US-0931	I/II	Abierto	2008	VAA
MPS VII	Reino Unido	UK-0197	II	Abierto	2012	VAA
Pompe	Nueva Zelanda	NZ-0001	I	Abierto	1996	Lipofección (liposoma catiónico)
Tay-Sachs	EE. UU.	US-0211	I	Cerrado	1997	AV
	EE. UU.	US-0222	I	Cerrado	1997	AV
	EE. UU.	US-0381	I	Abierto	2000	VAA
Canavan	EE. UU.	US-0619	I	Abierto	2003	VAA
	EE. UU.	US-0977	I	Abierto	2009	VAA
	EE. UU.	US-1064	I	Abierto	2010	VAA
GSL	EE. UU.	US-1068	I	Abierto	2010	VAA
LDM	Italia	I-0019	I/II	Abierto	2010	TCH + LV
X-ALD	Francia	FR-0028	I/II	Cerrado	2005	LV
	Francia	FR-0042	III	Cerrado	2009	TCH + LV
	EE. UU.	US-1073	II/III	Abierto	2010	TCH + LV
OTC	EE. UU.	US-0139	I	Abierto	1996	AV
HF	EE. UU.	US-0012	I	Abierto	1991	RT
	EE. UU.	US-1144	I	Abierto	2012	VAA
DLPL	Holanda	NL-0008	I/II	Abierto	2005	VAA
PAI	España	ES-0020	I	Abierto	2012	VAA

AV: adenovirus; CSP: células de sangre periférica; DLPL: déficit de lipoproteína lipasa; GLS: galactosialidosis; HF: hipercolesterolemia familiar; LC: lipofuscinosis ceroidea neuronal; LDM: leucodistrofia metacromática; LSP: linfocitos de sangre periférica; LV: lentivirus; MPS: mucopolisacaridosis; OTC: déficit de ornitín transcarbamilasa; PAI: porfiria aguda intermitente; RT: retrovirus; SCM: *stem cells* («células madre») mesenquimales; TCH: trasplante de células hematopoyéticas; TMO: trasplante de médula ósea; VAA: virus adenoasociado; X-ALD: adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X.

Datos de la Whiley Database on Gene Therapy Clinical Trials Worldwide.

Ensayos clínicos con terapia génica

Los ECM, y especialmente las enfermedades por depósito lisosomal, son especialmente adecuadas para la terapia génica debido a que son enfermedades monogénicas recesivas y únicamente se necesita la transferencia de una copia correcta del gen defectuoso. Además, ya que en la mayoría de los casos actividades enzimáticas de tan solo 1-20% son suficientes para normalizar la función celular, los niveles de expresión génica inducida no son generalmente críticos en el éxito terapéutico.

De los 1.743 ensayos clínicos con terapia génica aprobados desde 1989 (según datos obtenidos de la *Whiley Database on Gene Therapy Clinical Trials Worldwide*), solo 28 (1'6%) se han desarrollado

en el campo de los EMC. Y de todos ellos, solo un estudio utiliza vectores no víricos (tabla 2).

Vectores

Un vector es un medio de transporte, biológico o no, utilizado para la introducción del material genético en el organismo y en las células (tabla 3).

Vectores víricos

Se aprovecha el tropismo de los virus y su capacidad para infectar las células para introducir el material genómico en el

Tabla 3

Características de los principales métodos víricos y no víricos

Vector vírico	Célula diana	Ventajas	Desventajas
Adenovirus	Amplio tropismo. Células respiratorias, gastrointestinales y de la córnea	Alta eficiencia de infección.	Expresión génica transitoria.
Oncorretrovirus	Células en proliferación	Fácil fabricación. Alta estabilidad	Fuerte respuesta inmunitaria
Lentivirus	Amplio tropismo	Expresión génica muy prolongada	Dificultad en obtener grandes cantidades.
Herpes virus	Células del sistema nervioso	Expresión génica prolongada	Posibilidad de mutagénesis y oncogénesis
Virus adenoasociados	Amplio tropismo	No respuesta inflamatoria	Posibilidad de reversión a VIH, oncogénesis y mutagénesis
Vector no vírico	Características	Ventajas	Fuerte respuesta inflamatoria, neurotoxicidad
ADN desnudo	ADN libre sin ligando	Seguridad, fácil de elaborar	Difícil fabricación
Lípidos catiónicos	Lípidos con carga positiva unidos a ADN	Coste bajo	Baja transferencia y expresión génica.
Polímeros catiónicos	Polímeros con carga positiva unidos a ADN	Estabilidad química, gran variedad de formulaciones	Respuesta inmunitaria
			Vida media baja. Toxicidad y respuesta inmunitaria
			Toxicidad y respuesta inmunitaria

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

organismo. Con respecto a la terapia no vírica, la utilización de vectores víricos es generalmente más eficiente y la que ha conseguido resultados más satisfactorios. La mayor parte de los vectores víricos derivan de retrovirus murinos, lentivirus, adeno-virus, virus adenoasociados y herpes virus.

Retrovirus y lentivirus tienen una cadena simple y abierta de ARN de la que la transcriptasa inversa vírica fabrica en la célula infectada el ADN complementario de doble cadena. Los retrovirus murinos derivan del retrovírido de la leucemia murina de Moloney, y los lentivirus derivan del virus de la inmunodeficiencia humana. Tras eliminar determinados genes del ARN vírico, la ingeniería virológica ha perfeccionado su capacidad para infectar y vehiculizar el material genético dentro de las células, y ha introducido mecanismos de seguridad para impedir su replicación libre. A pesar de ello, su mayor limitación es el riesgo de mutagénesis insercional y oncogénesis. Este riesgo parece pequeño para la infección de células somáticas, pero es mucho mayor en el caso de la utilización de técnicas *ex vivo* con células troncales que van a replicarse y repoblar el individuo¹⁸.

Los adenovirus han sido muy utilizados en ensayos clínicos por su amplio tropismo celular y porque no precisan de células en fase replicativa para introducir su material genético. Son muy eficaces en la expresión de los genes terapéuticos vehiculizados, pero desafortunadamente esta ha demostrado ser transitoria en el tiempo. En su uso clínico esto obligaría a administrar la dosis de vectores repetidamente, siendo las readministraciones posteriores mucho menos eficaces por el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra el virus. Además, se han descrito en algún estudio reacciones adversas graves tras la administración de dosis elevadas de este tipo de virus¹⁹.

Los virus adenoasociados no pueden replicarse por sí solos sin la colaboración de otros virus, como los adenovirus o los herpes virus. Son de pequeño tamaño y portan una cadena simple de ADN, lo que limita mucho el tamaño del ácido nucleico que pueden transportar. Aunque no producen enfermedad, también generan una respuesta inmunitaria con la producción de anticuerpos neutralizantes.

Los virus del herpes simple presentan algunas ventajas sobre el resto de estirpes celulares, como su gran tamaño genómico, que permite transferir mayor cantidad de material genético, y su tropismo por células del sistema nervioso.

Vectores no víricos

En este caso, mediante métodos físicos y químicos se consigue de manera temporal una permeabilidad de los tejidos, permitiendo que el ADN entre en el núcleo celular. Este mecanismo de transferencia génica depende, entre otros factores, de la fase del ciclo celular, ya que durante la mitosis el núcleo celular es más asequible^{20,21}. La poración celular mediante láser, ultrasonidos u otros métodos electromagnéticos es uno de los mecanismos físicos más utilizados. Los procedimientos químicos combinan la utilización de polímeros y lípidos catiónicos unidos al material genético, de manera que tras interactuar electrostáticamente con la membrana celular son introducidos mediante endocitosis²².

Limitaciones de la terapia génica

El vector ideal sería aquel dotado de una total seguridad para el paciente y su entorno, que protegiera el material genético frente a la degradación, que fuera selectivo para un tipo específico de órgano, tejido o célula, que entregara este material de manera eficaz, que hiciese posible la expresión génica del material transportado, y que no generase respuesta inmunitaria, inflamatoria u oncogénica. Actualmente no hay ningún vector con estas características.

En los estudios clínicos y preclínicos realizados hasta el momento se han descrito fenómenos de inmunogenicidad, inflamación, toxicidad celular e incluso oncogénesis relacionados con la administración de vectores víricos²³. La inmunogenicidad es especialmente importante si se utilizan vectores víricos con expresión génica transitoria, ya que la producción de anticuerpos contra los vectores y su posterior neutralización obligarían a administrar dosis repetidas en el organismo. Algunos trabajos apoyan el hecho de que la utilización de vectores no víricos, en forma de lípidos y polímeros catiónicos, así como nanomateriales, disminuiría los fenómenos de inmunidad y especialmente la oncogénesis²⁴.

Tanto en la utilización de vectores víricos como no víricos, la barrera hematoencefálica y la eficacia terapéutica en los síntomas derivados de la afectación del sistema nervioso central en los ECM que cursan con acúmulo de depósito a este nivel continúan siendo un desafío para la terapia génica. En este sentido, a pesar de la reducción en los depósitos lisosomales conseguida en algunos modelos animales mediante la inyección directa del vector vírico en el cerebro, la expresión génica tras inyecciones repetidas y la toxicidad celular alcanzada hacen inviable, por el momento, su aplicación clínica en humanos²⁵.

Aparte de la inyección directa intracerebral, se han estudiado otras vías de acceso al sistema nervioso central, como la intravítrea²⁶, la olfatoria²⁷ y la trigeminal²⁸.

La administración sistémica intravenosa de vectores con ligandos dirigidos a uno de los receptores de la endocitosis expresados en las células de la barrera hematoencefálica, con nanomateriales como el polietilenglicol²⁹ o con otros ligandos como la apolipoproteína E³⁰, podría facilitar el paso de esta barrera biológica.

Conclusiones

A pesar de que no existen numerosos estudios realizados con terapia génica en el campo de los ECM en las 2 últimas décadas, debido en parte a la baja prevalencia de este tipo de enfermedades, los progresos han sido lentos, pero constantes. Los avances obtenidos en otras áreas científicas han permitido la aparición de vectores con estructuras moleculares más estables, de fácil fabricación y de menor coste, y también con una eficacia en transferencia y expresión génicas muy superiores.

Su utilización en la práctica clínica tendría enormes beneficios. Aparte de la mejoría sintomática y la alteración del curso natural de la enfermedad, la expresión génica alcanzada tras una única dosis de vector podría ser suficiente para cubrir las necesidades metabólicas del paciente, con lo que se evitarían las infusiones periódicas que requieren los pacientes con alguno de los pocos ECM en los que existe tratamiento enzimático sustitutivo.

Lamentablemente todavía existe en la actualidad un largo camino que recorrer en lo referente a su seguridad, ya que los datos de los que disponemos hasta el momento ponen de manifiesto la presencia de fenómenos de inmunidad, toxicidad celular y oncogénesis en los modelos animales actualmente en uso.

La dificultad que han demostrado los vectores en atravesar la barrera hematoencefálica podría limitar mucho su eficacia en la mejoría de los síntomas neurológicos debidos a la lesión cerebral causada por depósito de macromoléculas no degradadas, como es el caso, por ejemplo, de las enfermedades por depósito lisosomal.

Conflicto de intereses

No existen conflictos de intereses.

Bibliografía

1. Leonard JV, Morris AA. Diagnosis and early management of inborn errors of metabolism presenting around the time of birth. *Acta Paediatr.* 2006;95:6–14.
2. Giraldo P. Guía de pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1. *Med Clin (Barc)*. 2011;137 Supl 1:55–60.
3. Barba Romero MA, Rivera Gallego A, Pintos Morell G. Comparación de los pacientes de un registro español de enfermedad de Fabry en dos periodos de tiempo. *Med Clin (Barc)*. 2012;139:379–84.
4. Saudubray JM, Nuoffer JM, de Lonlay P, Castelnaud P, Touati G. [Hereditary metabolic diseases in adults]. *Rev Med Interne*. 2008;19 Suppl 3:S366–75.
5. Gray R, Preece M, Green S, Whitehouse W, Winer J, Green A. Inborn error of metabolism as a cause of neurological disease in adults: An approach to investigation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000;69:5–12.
6. Wierzicki AS, Viljoen A. Alipogen tiparvec: Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13:7–10.
7. Prietsch V, Lindner M, Zschocke J, Nyhan WL, Hoffmann GF. Emergency management of inherited metabolic diseases. *J Inher Metab Dis*. 2002;25:531–46.
8. Frattantonio JC, Hall CW, Neufeld EF. Hurler and Hunter syndromes: Mutual correction of the defect in cultured fibroblasts. *Science*. 1968;162:570–2.
9. Kren BT, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Steer CJ. Gene therapy as an alternative to liver transplantation. *Liver Transpl*. 2002;8:1089–108.
10. Boelens JJ. Trends in haematopoietic cell transplantation for inborn error of metabolism. *J Inher Metab Dis*. 2006;29:413–20.
11. Giraldo P, Latre P. Tratamiento actual de la enfermedad de Gaucher y nuevas perspectivas. *Med Clin (Barc)*. 2011;137 Supl 1:50–4.
12. Sands MS, Haskins ME. CNS-directed gene therapy for lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr Suppl*. 2008;97:22–7.
13. Ponder KP. Immune response hinders therapy for lysosomal storage diseases. *J Clin Invest*. 2008;118:2686–9.
14. Kakkis E, Lester T, Yang R, Tanaka C, Anand V, Lemontt J, et al. Successful induction of immune tolerance to enzyme replacement therapy in canine mucopolysaccharidosis I. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:829–34.
15. Giraldo P, Alfonso P, Atutxa K, Fernández-Galán MA, Barez A, Franco R, et al. Real-world clinical experience with long-term miglustat maintenance therapy in type 1 Gaucher disease: The ZAGAL Project. *Haematologica*. 2009;94:1771–5.
16. Valenzano KJ, Khanna R, Powe AC, Boyd R, Lee G, Flanagan JJ, et al. Identification and characterization of pharmacological chaperones to correct enzyme deficiencies in lysosomal storage disorders. *Assay Drug Dev Technol*. 2011;9:213–35.
17. Begley DJ, Pontikis CC, Scarpa M. Lysosomal storage diseases and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des*. 2008;14:1566–80.
18. Staal FJ, Pike-Overzet K, Ng YY, van Dongen JJ. Sola dosis facit venenum. Leukemia in gene therapy trials: A question of vectors, inserts and dosage? *Leukemia*. 2008;22:1849–52.
19. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*. 2003;80:148–58.
20. Zhang S, Zhao Y, Zhao B, Wang B. Hybrids of nonviral vectors for gene delivery. *Bioconjug Chem*. 2010;21:1003–9.
21. Al-Dosari MS, Gao X. Nonviral gene delivery: Principle, limitations, and recent progress. *AAPS J*. 2009;11:671–81.
22. Tros de Ilarduya C, Sun Y, Duzgunes N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur J Pharm Sci*. 2010;40:159–70.
23. Tomanin R, Scarpa M. Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vector transduction. *Curr Gene Ther*. 2004;4:357–72.
24. Roy I, Stachowiak MK, Bergey EJ. Nonviral gene transfection nanoparticles: Function and applications in the brain. *Nanomedicine*. 2008;4:89–97.
25. Thomas CE, Birkett D, Anozie I, Castro MG, Lowenstein PR. Acute direct adenoviral vector cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain. *Mol Ther*. 2001;3:36–46.
26. Griffey M, Macauley SL, Ogilvie JM, Sand MS. AAV2-mediated ocular gene therapy for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Mol Ther*. 2005;12:413–21.
27. Hanson LR, Frey 2nd WH. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci*. 2008;9 Suppl 3:S5.
28. Kykanides S, Yang M, Tallents RH, Miller JN, Brouxhon SM, Olschowka JA. The trigeminal retrograde transfer pathway in the treatment of neurodegeneration. *J Neuroimmunol*. 2009;209:139–42.
29. Jain KK. Nanobiotechnology-based drug delivery to the central nervous system. *Neurodegener Dis*. 2007;4:287–91.
30. Michaelis K, Hoffmann MM, Dreis S, Herbert E, Alyautdin RN, Michaelis M, et al. Covalent linkage of apolipoprotein to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;317:1246–53.