

TERAPIA GÉNICA

PROYECTO EDITORIAL
MANUALES DE GENÉTICA

Coordinador:

César Benito Jiménez



Queda prohibida, salvo excepción prevista en la ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra sin contar con autorización de los titulares de la propiedad intelectual. La infracción de los

derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual (arts. 270 y sigs. Código Penal). El Centro Español de Derechos Reprográficos (www.cedro.org) vela por el respeto de los citados derechos.

TERAPIA GÉNICA

Ana del Pozo Rodríguez
Alicia Rodríguez Gascón
María Ángeles Solinís Aspiazu



EDITORIAL
SÍNTESIS

Consulte nuestra página web: **www.sintesis.com**
En ella encontrará el catálogo completo y comentado

© Ana del Pozo Rodríguez
Alicia Rodríguez Gascón
María Ángeles Solinís Aspiazu

© EDITORIAL SÍNTESIS, S. A.
Vallehermoso, 34 - 28015 Madrid
Teléf.: 91 593 20 98
<http://www.sintesis.com>

ISBN: 978-84-9171-206-0
Depósito Legal: M. 24.850-2018

Impreso en España - Printed in Spain

Reservados todos los derechos. Está prohibido, bajo las sanciones penales y el resarcimiento civil previstos en las leyes, reproducir, registrar o transmitir esta publicación, íntegra o parcialmente, por cualquier sistema de recuperación y por cualquier medio, sea mecánico, electrónico, magnético, electroóptico, por fotocopia o por cualquier otro, sin la autorización previa por escrito de Editorial Síntesis, S. A.

Índice

PRÓLOGO.....	13
1. CONCEPTO DE TERAPIA GÉNICA.....	15
Conceptos por estudiar.....	15
Objetivos para el aprendizaje.....	15
1.1. Concepto de terapia génica y marco legal.....	15
1.2. Tipos de terapia génica.....	17
1.2.1. <i>Tipos de terapia génica en función de la célula que se va a transfectar..</i>	18
1.2.2. <i>Tipos de terapia génica en función de la estrategia de transfección</i>	18
1.3. Enfermedades que pueden ser tratadas mediante terapia génica.....	20
1.4. Sistemas de administración de ácidos nucleicos para terapia génica.....	21
1.5. Ensayos clínicos de productos basados en terapia génica.....	23
1.6. Aspectos éticos de la terapia génica.....	25
Enlaces.....	25
Resumen conceptual.....	26
Actividades propuestas.....	26
Preguntas de autoevaluación.....	27
2. ÁCIDOS NUCLEICOS TERAPÉUTICOS.....	29
Conceptos por estudiar.....	29
Objetivos para el aprendizaje.....	29
2.1. Ácidos nucleicos como agentes terapéuticos.....	29
2.2. Suplementación génica.....	30

2.2.1. Plásmidos de ADN.....	30
2.2.2. ARNm	31
2.3. Supresión génica.....	32
2.3.1. Oligonucleótidos antisentido.....	32
2.3.2. Aptámeros.....	33
2.3.3. Ribozimas.....	33
2.3.4. ARN circular.....	33
2.3.5. ARN de interferencia.....	34
2.4. Edición génica.....	37
2.4.1. Nucleasas de dedos de zinc.....	37
2.4.2. TALEN.....	38
2.4.3. Meganucleasas.....	39
2.4.4. CRISPR/Cas9.....	40
Resumen conceptual.....	42
Actividades propuestas.....	43
Preguntas de autoevaluación.....	43
3. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO.....	45
Conceptos por estudiar.....	45
Objetivos para el aprendizaje.....	45
3.1. Introducción.....	45
3.2. Administración sistémica de material genético.....	47
3.2.1. Administración intravenosa.....	47
3.2.2. Administración intramuscular.....	53
3.2.3. Administración subcutánea.....	53
3.3. Administración local de material genético.....	54
3.3.1. Administración locorregional.....	55
3.3.2. Administración intratumoral.....	55
3.3.3. Administración oral.....	56
3.3.4. Administración pulmonar.....	57
3.3.5. Administración nasal.....	59
3.3.6. Administración en la piel.....	59
3.3.7. Administración ocular.....	61
3.3.8. Administración vaginal.....	62
3.3.9. Administración cardíaca.....	62
3.3.10. Administración en el sistema nervioso central.....	63
Resumen conceptual.....	64
Actividades propuestas.....	66
Preguntas de autoevaluación.....	66

4. BARRERAS PARA LA TRANSFERENCIA GÉNICA	69
Conceptos por estudiar	69
Objetivos para el aprendizaje	69
4.1. Introducción	69
4.2. Barreras extracelulares	70
4.3. Internalización celular	72
4.3.1. <i>Interacción con la membrana celular</i>	74
4.3.2. <i>Entrada a la célula</i>	75
4.3.3. <i>Estrategias para optimizar el proceso de internalización celular</i>	76
4.4. Disposición intracelular	78
4.4.1. <i>Vías endocíticas y disposición intracelular</i>	78
4.4.2. <i>Estrategias para optimizar la disposición intracelular</i>	79
4.5. Entrada al núcleo	83
4.6. Control de la expresión génica	84
4.6.1. <i>Estrategias para optimizar la expresión génica</i>	85
Resumen conceptual	86
Actividades propuestas	87
Preguntas de autoevaluación	88
5. SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN EN TERAPIA GÉNICA: VECTORES VIRALES... ..	91
Conceptos por estudiar	91
Objetivos para el aprendizaje	91
5.1. Definición y componentes de un vector viral	91
5.2. Tipos de vectores virales	93
5.3. Vectores retrovirales	95
5.3.1. <i>Estructura de los retrovirus</i>	95
5.3.2. <i>Ciclo replicativo de los retrovirus</i>	96
5.3.3. <i>Aplicación de los retrovirus en terapia génica</i>	97
5.4. Vectores lentivirales	97
5.4.1. <i>Estructura de los lentivirus</i>	98
5.4.2. <i>Ciclo replicativo de los lentivirus</i>	98
5.4.3. <i>Aplicación de los lentivirus en terapia génica</i>	98
5.5. Vectores adenovirales	99
5.5.1. <i>Estructura de los adenovirus</i>	99
5.5.2. <i>Ciclo replicativo de los adenovirus</i>	100
5.5.3. <i>Aplicación en terapia génica de los adenovirus</i>	100
5.6. Vectores virales adenoasociados	101
5.6.1. <i>Estructura de los virus adenoasociados</i>	101
5.6.2. <i>Ciclo replicativo de los virus adenoasociados</i>	102
5.6.3. <i>Aplicación en terapia génica de los virus adenoasociados</i>	102

5.7. Otros vectores virales.....	103
5.8. Ventajas e inconvenientes de los vectores virales.....	103
Resumen conceptual.....	104
Actividades propuestas.....	105
Preguntas de autoevaluación	106
6. SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN EN TERAPIA GÉNICA: SISTEMAS NO VIRALES.....	107
Conceptos por estudiar	107
Objetivos para el aprendizaje.....	107
6.1. Definición y clasificación de los sistemas no virales	108
6.2. Métodos físicos.....	108
6.2.1. <i>Inyección con aguja</i>	109
6.2.2. <i>Microinyección</i>	109
6.2.3. <i>Inyección balística</i>	109
6.2.4. <i>Electroporación</i>	110
6.2.5. <i>Sonoporación</i>	111
6.2.6. <i>Magnetofección</i>	112
6.3. Métodos químicos.....	112
6.3.1. <i>Partículas inorgánicas</i>	112
6.3.2. <i>Vectores poliméricos</i>	115
6.3.3. <i>Vectores lipídicos</i>	119
6.3.4. <i>Vectores peptídicos</i>	121
6.4. Ventajas e inconvenientes de los vectores no virales.....	124
Resumen conceptual.....	125
Actividades propuestas.....	126
Preguntas de autoevaluación	126
7. APLICACIÓN DE LA TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES MONOGÉNICAS (I).....	129
Conceptos por estudiar	129
Objetivos para el aprendizaje.....	129
7.1. Introducción.....	130
7.2. Fibrosis quística.....	131
7.2.1. <i>Terapia génica para tratar la fibrosis quística</i>	134
7.3. Hemofilia.....	136
7.3.1. <i>Terapia génica para el tratamiento de la hemofilia</i>	137
7.4. Distrofia muscular de Duchenne.....	140
7.4.1. <i>Terapia génica para la distrofia muscular de Duchenne</i>	142
7.5. Deficiencia en lipoproteína lipasa y otras hiperlipidemias.....	146

7.5.1. <i>Terapia génica para el tratamiento de hiperlipidemias</i>	147
7.6. Epidermólisis bullosa.....	148
7.6.1. <i>Terapia génica para tratar la epidermólisis bullosa</i>	149
7.7. Porfiria.....	152
7.7.1. <i>Terapia génica para el tratamiento de la porfiria aguda intermitente</i> ...	155
Resumen conceptual.....	157
Actividades propuestas.....	158
Preguntas de autoevaluación	159
8. APLICACIÓN DE LA TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES MONOGÉNICAS (II). ENFERMEDADES DE DEPÓSITO LISOSOMAL.....	161
Conceptos por estudiar	161
Objetivos para el aprendizaje.....	161
8.1. Introducción.....	162
8.2. Enfermedad de Fabry	162
8.2.1. <i>Terapia génica para la enfermedad de Fabry</i>	163
8.3. Enfermedad de Gaucher.....	164
8.3.1. <i>Terapia génica para la enfermedad de Gaucher</i>	166
8.4. Enfermedad de Pompe	167
8.4.1. <i>Terapia génica para el tratamiento de la enfermedad de Pompe</i>	168
8.5. Mucopolisacaridosis.....	169
8.5.1. <i>Terapia génica para el tratamiento de las mucopolisacaridosis</i>	171
Resumen conceptual.....	176
Actividades propuestas.....	177
Preguntas de autoevaluación	178
9. APLICACIÓN DE LA TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES MONOGÉNICAS QUE AFECTAN A LA MÉDULA ÓSEA	179
Conceptos por estudiar	179
Objetivos para el aprendizaje.....	179
9.1. Introducción.....	180
9.2. Inmunodeficiencias primarias	180
9.2.1. <i>Deficiencia en adenosina deaminasa (ADA-SCID)</i>	181
9.2.2. <i>Inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X (XI-SCID)</i> ...	184
9.2.3. <i>Síndrome Wiskott-Aldrich</i>	185
9.2.4. <i>Enfermedad granulomatosa crónica</i>	186
9.2.5. <i>Deficiencia en Jak3</i>	187
9.2.6. <i>Edición génica para las inmunodeficiencias combinadas graves</i>	187
9.3. Anemia de Fanconi	188
9.3.1. <i>Terapia génica para la anemia de Fanconi</i>	190

9.4. Hemoglobinopatías: β -talasemia y anemia falciforme.....	192
9.4.1. <i>Terapia génica para las hemoglobinopatías</i>	194
9.4.2. <i>Edición génica</i>	195
Resumen conceptual.....	196
Actividades propuestas.....	197
Preguntas de autoevaluación.....	198
10. TERAPIA GÉNICA OCULAR.....	199
Conceptos por estudiar.....	199
Objetivos para el aprendizaje.....	199
10.1. Introducción.....	199
10.2. Estrategias terapéuticas.....	201
10.3. Terapia génica en el segmento posterior del ojo.....	204
10.3.1. <i>Distrofias hereditarias de la retina</i>	206
10.3.2. <i>Glaucoma</i>	214
10.3.3. <i>Degeneración macular asociada a la edad</i>	215
10.4. Terapia génica en la córnea.....	219
10.4.1. <i>Mucopolisacaridosis tipo VII</i>	220
10.4.2. <i>Curación de heridas y cicatrización corneal</i>	220
10.4.3. <i>Neovascularización corneal</i>	221
10.4.4. <i>Trasplante de córnea</i>	222
10.4.5. <i>Infecciones por el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1)</i>	222
Resumen conceptual.....	223
Actividades propuestas.....	224
Preguntas de autoevaluación.....	225
11. TERAPIA GÉNICA EN EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES VIRALES.....	227
Conceptos por estudiar.....	227
Objetivos para el aprendizaje.....	227
11.1. Introducción.....	228
11.2. Estrategias de tratamiento de las infecciones virales mediante terapia génica....	228
11.3. Terapia génica en el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1).....	229
11.3.1. <i>Estructura del VIH y ciclo de replicación</i>	230
11.3.2. <i>Dianas de la terapia génica frente a la infección por VIH-1</i>	233
11.4. Terapia génica en el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis B....	240
11.4.1. <i>Estructura del virus de la hepatitis B y ciclo de replicación</i>	241
11.4.2. <i>Dianas de la terapia génica frente a la infección por el virus de la hepatitis B</i>	242
11.5. Terapia génica en el tratamiento de la infección crónica por virus de la hepatitis C	245

11.5.1. Estructura del virus de la hepatitis C y ciclo de replicación	246
11.5.2. Dianas de la terapia génica frente a la infección por el virus de la hepatitis C	248
11.6. Terapia génica en el tratamiento de infecciones respiratorias víricas	250
11.6.1. Terapia génica frente al virus respiratorio sincitial	251
11.6.2. Terapia génica frente al virus influenza	251
11.6.3. Terapia génica frente a otros virus responsables de infecciones respiratorias	252
11.7. Terapia génica en el tratamiento de otras infecciones víricas	253
Resumen conceptual	254
Actividades propuestas	255
Preguntas de autoevaluación	256
12. TERAPIA GÉNICA Y CÁNCER	257
Conceptos por estudiar	257
Objetivos para el aprendizaje	257
12.1. Introducción	257
12.2. Estrategias relacionadas con el mecanismo de acción	258
12.2.1. Control de la proliferación de células tumorales	259
12.2.2. Inducción de muerte celular en células tumorales	264
12.2.3. Inhibición de la angiogénesis tumoral	268
12.2.4. Activación del sistema inmune frente al tumor	269
12.3. Vías de administración de la terapia génica para el tratamiento del cáncer	271
12.4. Sistemas de administración en la terapia génica frente al cáncer	272
12.5. Estrategias para mejorar la especificidad tumoral	273
12.5.1. Ligandos específicos de células tumorales	273
12.5.2. Control de la transcripción	274
Resumen conceptual	276
Actividades propuestas	277
Preguntas de autoevaluación	277
13. TERAPIA GÉNICA EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS	279
Conceptos por estudiar	279
Objetivos para el aprendizaje	279
13.1. Introducción	279
13.2. Estrategias terapéuticas	281
13.3. Terapia génica en la enfermedad de Alzheimer	284
13.3.1. Terapia génica neuroprotectora para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer	287
13.3.2. Otras estrategias de terapia génica	287
13.4. Terapia génica en la enfermedad de Parkinson	288

13.4.1. <i>Estrategias de terapia génica para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson</i>	290
13.5. <i>Terapia génica en otras enfermedades neurológicas</i>	293
13.5.1. <i>Terapia génica en la atrofia muscular espinal</i>	293
13.5.2. <i>Terapia génica en enfermedades de almacenamiento lisosomal con afectación del sistema nervioso central</i>	295
13.5.3. <i>Terapia génica en la adenoleucodistrofia ligada al cromosoma X</i>	297
13.5.4. <i>Terapia génica en la enfermedad de Huntington</i>	298
13.5.5. <i>Terapia génica en la esclerosis lateral amiotrófica</i>	299
13.5.6. <i>Terapia génica en la esclerosis múltiple</i>	300
13.5.7. <i>Terapia génica en las ataxias</i>	300
13.5.8. <i>Terapia génica en la miastenia gravis</i>	301
13.5.9. <i>Terapia génica en la epilepsia</i>	302
13.5.10. <i>Terapia génica en el dolor y la neuropatía sensorial</i>	302
Resumen conceptual.....	303
Actividades propuestas.....	305
Preguntas de autoevaluación	305
SOLUCIONARIO	307
BIBLIOGRAFÍA.....	315

2

Ácidos nucleicos terapéuticos

CONCEPTOS POR ESTUDIAR

- ✓ Ácidos nucleicos terapéuticos.
 - ✓ Suplementación génica.
 - ✓ Supresión génica.
 - ✓ Edición génica.
-

Objetivos para el aprendizaje

- Ser capaz de diferenciar entre procesos de suplementación, supresión y edición génica.
 - Conocer los tipos de ácidos nucleicos disponibles para terapia génica.
 - Identificar los componentes mínimos que tiene que tener un plásmido de ADN.
 - Poder distinguir entre las diferentes estrategias para inhibir la expresión de un gen mediante ARN de interferencia.
 - Ser capaz de identificar los diferentes tipos de herramientas disponibles para llevar a cabo la edición génica.
-

2.1. Ácidos nucleicos como agentes terapéuticos

Los *ácidos nucleicos terapéuticos* son ácidos nucleicos o compuestos estrechamente relacionados que se utilizan para tratar o prevenir una determinada enfermedad. Pueden estar basados en ADN o en ARN. Excepto en el caso de los plásmidos de ADN para expresar una determinada proteína, comparten un mecanismo de acción común, basado en el reconocimiento de ácidos nucleicos endógenos por interacción específica entre pares de bases según el modelo de Watson y Crick. Son moléculas cargadas, de alto peso molecular y con características fisicoquímicas muy diferentes a los fármacos tradicionales (mucho más pequeños). Son inestables en el medio biológico, y deben

acceder a un compartimento intracelular específico (generalmente el citoplasma o el núcleo); por ello, el desarrollo de productos terapéuticos con ácidos nucleicos es mucho más costoso y lento, y el proceso de aprobación para la realización de ensayos clínicos por parte de las administraciones sanitarias regulatorias es mucho más complejo.

En *función de la enfermedad a la que van destinados*, el objetivo de los ácidos nucleicos terapéuticos puede ser:

- Suplementación génica.
- Supresión génica.
- Edición génica.

2.2. Suplementación génica

Con la *suplementación génica* conseguimos expresar una secuencia nucleotídica para inducir la producción de una determinada proteína que no se expresa o que se sintetiza de forma defectuosa en un paciente, y así revertir los síntomas de la enfermedad. La suplementación génica se puede conseguir con la administración de *plásmidos de ADN o ARN mensajero (ARNm)*.

2.2.1. Plásmidos de ADN

Son constructos de ADN de doble cadena, con alto peso molecular, que contienen *genes exógenos o transgenes*, y que codifican proteínas específicas. Desde un punto de vista molecular, se pueden considerar como *profármacos*, que, tras la internalización celular, utilizan los procesos de transcripción y traducción de ADN de la célula para dar lugar a la proteína terapéutica, pero que se replican de manera independiente al cromosoma de la célula hospedadora. Para ello, es necesario que el plásmido sea capaz de llegar al núcleo de la célula, siendo la internalización nuclear uno de los pasos limitantes que controlan la eficacia de la expresión génica. El ADN penetra en el núcleo celular principalmente durante la mitosis; por tanto, la expresión de la proteína es más efectiva en células con alta tasa de división.

Un plásmido está formado por al menos los siguientes elementos:

- *Origen de replicación (ORI)*. Es una secuencia de ADN que permite la iniciación de la replicación de manera independiente al ADN cromosómico.
- *Gen marcador de selección*. Generalmente es un gen de resistencia a un antibiótico. Permite la identificación y selección de las células que contienen el fragmento de ADN de interés.
- *Sitio de multiclonación*. Es un pequeño segmento de ADN que contiene varios sitios de restricción para una inserción fácil del ADN de interés.
- *Gen de interés*.
- *Promotor*. Es el que dirige la transcripción del gen. Es un componente de vital importancia para la expresión, ya que determina en qué tipo de célula se expresa el gen y la cantidad de proteína recombinante obtenida.

En la figura 2.1 se recogen los principales elementos de un plásmido de ADN.

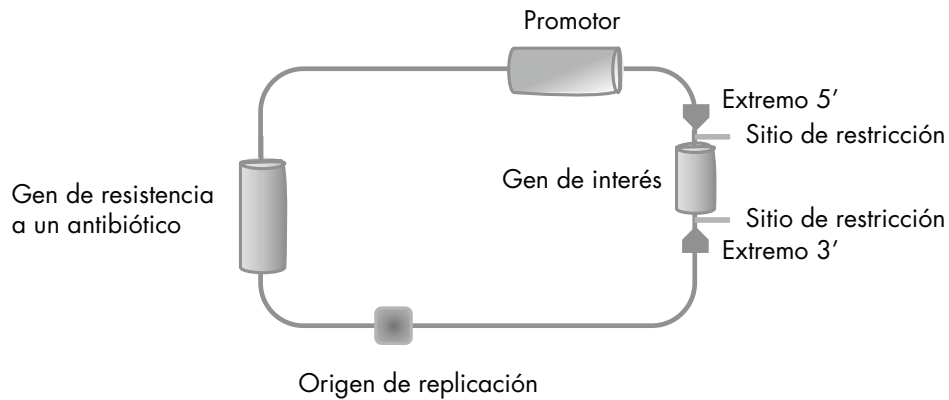


FIGURA 2.1. Componentes mínimos de un plásmido de ADN.

La producción y purificación de plásmidos es relativamente sencilla. Los mayores inconvenientes están relacionados con su degradación rápida y su expresión a lo largo del tiempo.

Los plásmidos de ADN pueden utilizarse para tratar enfermedades debidas al déficit de una proteína como consecuencia de la mutación de un gen. Por ejemplo, en la hemofilia A, por una mutación en un gen, no se produce el factor VIII de la coagulación. La administración de un plásmido con el gen que codifica para el factor VIII dará lugar a la formación de este, revirtiendo los síntomas de la enfermedad. También se pueden utilizar en otras enfermedades más complejas, como las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad de Parkinson o el Alzheimer, entre otras, en las que la expresión de una determinada proteína es capaz de producir una mejora en la enfermedad. Por ejemplo, el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) se ha evaluado en el tratamiento de la enfermedad arterial coronaria, y la tirosina GTP-ciclohidrolasa 1 dopa descarboxilasa para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Los plásmidos de ADN también se pueden utilizar en vacunación (vacunas de ADN, en las que se administra un plásmido que codifica una proteína inmunogénica para inducir inmunidad tanto celular como humoral).

2.2.2. ARNm

La utilización de ARNm para producir una proteína específica en las células es también una prometedora estrategia para el tratamiento de numerosas enfermedades. Para ejercer su efecto, no es necesario que el ARNm acceda al núcleo, uno de los pasos más limitantes en el proceso de transfección con ADN, por lo que esta es generalmente más rápida y más efectiva, aunque también menos duradera. Además, no se integra en el genoma de la célula hospedadora, que se asocia con riesgo de mutagénesis, lo que le confiere una importante ventaja desde el punto de vista de la

seguridad. Otra diferencia con respecto al ADN es que el ARNm induce la expresión de la proteína tanto en células que se dividen como en células que no se dividen. Por todo ello, el ARNm se considera una estrategia terapéutica *más potente y más segura que el ADN*.

El ARNm puede ser sintetizado fácilmente a partir del ADN que codifica la proteína de interés. Además, puede ser modificado para mejorar la estabilidad, incrementar la eficacia, y reducir la inmunogenicidad. Sin embargo, su producción a gran escala con alta reproducibilidad bajo Normas de Correcta Fabricación (NCF) es todavía una limitación.

En células eucariotas, el ARNm puede interactuar con receptores relacionados con el sistema inmune (por ejemplo, los Toll-like receptors 3), lo que les confiere propiedades inmunoadyuvantes. Así, el ARNm puede ser utilizado para expresar antígenos, lo que hace que pueda ser aplicado en vacunación, por ejemplo, en inmunoterapia para el cáncer, vacunas profilácticas, o protocolos de inmunosensibilización. También puede ser utilizado para transfectar células dendríticas *ex vivo* para posteriormente ser reimplantadas en el paciente. Así, en un ensayo clínico en Fase I se demostró que células dendríticas maduras transfectadas mediante electroporación con un ARNm que codificaba un antígeno tumoral eran capaces de inducir respuesta inmune asociada al tumor (células T) en pacientes con mieloma.

2.3. Supresión génica

El objetivo de supresión génica es *disminuir o anular la expresión de una proteína específica*. Este proceso (terapia antisentido) se puede conseguir con numerosas estrategias que incluyen:

- Oligonucleótidos antisentido.
- Aptámeros.
- Ribozimas.
- ARN circular.
- ARN de interferencia (ARNi).

2.3.1. Oligonucleótidos antisentido

Los *oligonucleótidos antisentido* son fragmentos de ADN de cadena simple que tras la internalización celular pueden inhibir de forma selectiva la expresión de una determinada proteína. En el citoplasma celular interactúan y forman un complejo con el ARNm o con el pre-ARNm, bloqueando el proceso de traducción, con la consiguiente inhibición de la síntesis de la proteína. En terapéutica, los oligonucleótidos se pueden utilizar para *bloquear la expresión de una proteína* implicada en una determinada enfermedad. El primer producto a base de oligonucleótidos aprobado para su uso en clínica en 1998 fue el fomivirsén, dirigido al tratamiento de retinitis por citomegalovirus (CMV) en pacientes con sida. Es un oligonucleótido que se une al fragmento IE2 del ARNm del CMV, inhibiendo la replicación viral, y se administra a nivel ocular mediante una inyección intravítrea. Otro producto a base de oligonucleótidos es el mipomersén, que actúa inhibiendo la síntesis de apolipoproteína B-100, un componente esencial de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL). Está aprobado para el tratamiento de

la hipercolesterolemia familiar homocigótica, una enfermedad genética autosómica dominante. Otras enfermedades para las que se han evaluado los oligonucleótidos son el cáncer, la atrofia muscular espinal y la hepatitis C, entre otras.

2.3.2. Aptámeros

Los *aptámeros*, también llamados “*anticuerpos químicos*”, son ácidos nucleicos de doble cadena (ADN) o de cadena simple (ARN) que pueden interactuar directamente con las proteínas. En comparación con los anticuerpos tradicionales, los aptámeros son más específicos, no son inmunogénicos, y presentan mayor estabilidad en las preparaciones farmacéuticas. Los aptámeros pueden interactuar directamente con las proteínas involucradas en el desarrollo de una enfermedad o con sus factores de transcripción. Los aptámeros han sido evaluados como potencial tratamiento de varias enfermedades como la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana o la hepatitis B. En el año 2004, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó un aptámero para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (pegaptanib). Este compuesto se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), con actividad angiogénica (formación de vasos sanguíneos), inhibiendo por tanto la neovascularización.

2.3.3. Ribozimas

Son *moléculas de ARN que actúan como enzimas*, de tal forma que se unen al ARNm diana y lo destruyen. Poseen una gran especificidad y un amplio rango de actuación, y pueden ser utilizados para silenciar genes. También se han utilizado para validar genes relacionados con determinadas enfermedades como potenciales genes diana y diseñar nuevas estrategias terapéuticas. Entre otras enfermedades, se han estudiado para el cáncer, y para enfermedades víricas. Una limitación de los ribozimas es la inestabilidad, ya que son susceptibles de ser degradados por RNasas.

2.3.4. ARN circular

Normalmente las moléculas de ARN son lineales, con los extremos 3' y 5' libres. El ARN circular tiene un *enlace covalente entre los extremos y se presenta en forma de anillo*. Este hecho le confiere resistencia a la degradación por las exonucleasas, por lo que son más estables y abundantes en el citoplasma. Otra diferencia con el ARN lineal es que mayoritariamente es no codificante. Recientemente se ha visto que los ARN circulares se unen a proteínas de unión a ARN o complejos de ribonucleoproteínas, actuando como “esponjas” de micro-ARN (miARN). Hasta este momento, no existe ninguna molécula terapéutica aprobada por las agencias reguladoras basada en ARN circular. Sin embargo, sí se sabe que juegan un papel crucial en algunas enfermedades humanas. Por ejemplo, el cANRIL, un ARN circular, es un factor de riesgo de arterioesclerosis. Otros ARN circulares parece que están implicados en la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, cáncer colorrectal, y adenocarcinoma ductal pancreático. Algunos estudios también indican que los ARN circulares pueden ser unos potentes marcadores del envejecimiento.

2.3.5. ARN de interferencia

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo de regulación de la expresión génica que ha tenido un gran impacto en el campo de la investigación biomédica. Es un proceso natural que lleva al silenciamiento de la expresión de un determinado gen por un mecanismo postranscripcional. El ARNi fue descubierto por Fire y Mello, quienes publicaron sus trabajos en 1998 y recibieron el Premio Nobel de Medicina en el año 2006. El silenciamiento se puede producir con ARN endógeno o micro-ARN (miARN) o con ARN exógeno (ARN de doble cadena o siARN –del inglés *short interfering*– y horquillas de ARN o shARN –del inglés *short hairpin*–).

A) miARN

Los *miARN* son moléculas de ARN pequeñas (entre 15 y 22 nucleótidos), de una sola cadena y no codificantes que existen de forma natural. Estas moléculas son parcialmente complementarias a un ARNm, y *su función es bloquearlo*. Los miARN son transcritos en el núcleo por la ARN polimerasa II, que origina un miARN primario (pri-miARN), que a su vez es procesado para dar lugar a un pre-miARN por la enzima Drosha y el cofactor Pasha. Los pre-miARN son transportados al citoplasma por la exportina 5 y procesados por la RNasa de tipo III (Dicer) para obtener el miARN. Estos se incorporan al complejo RISC (del inglés *RNA induced silencing complex*), que separa las dos cadenas. Una de las cadenas se mantiene unida al complejo RISC y es la que ejercerá la función de silenciamiento, y la otra se degrada. El mecanismo por el cual un miARN ejerce su función depende del grado de complementariedad entre el miARN y la región 3'-UTR de su ARNm diana. Si la complementariedad entre ambas secuencias es completa, el ARNm diana será degradado por el RISC. Sin embargo, si el emparejamiento entre las bases no es perfecto, como ocurre con la mayoría de los miARN de mamíferos, se producirá la inhibición de la traducción. En la figura 2.2 se representa el funcionamiento del miARN.

Los miARN pueden utilizarse como *agentes terapéuticos*, y tienen como ventaja su capacidad para actuar sobre múltiples moléculas, siendo por tanto muy eficientes en la regulación de diferentes procesos biológicos. Numerosos estudios han puesto de manifiesto la implicación de los miARN en cáncer, y de hecho han sido propuestos como potencial estrategia para el tratamiento de esta enfermedad. También se ha observado que en otras enfermedades hay una mayor expresión de miARN en los tejidos afectados que en los tejidos sanos, por ejemplo, en diabetes, obesidad, Alzheimer, Parkinson, enfermedades cardiovasculares y enfermedades autoinmunes.

B) siARN

Los *siARN* son moléculas pequeñas de doble cadena formadas por 21-23 nucleótidos, y son generalmente producidos por síntesis química. En el citoplasma celular, el siARN se incorpora al complejo RISC, y como ocurre con el miARN, este separa las dos cadenas y guía una de ellas al correspondiente ARNm, degradándolo o inhibiendo la traducción. La figura 2.3 recoge el mecanismo de actuación del siARN.

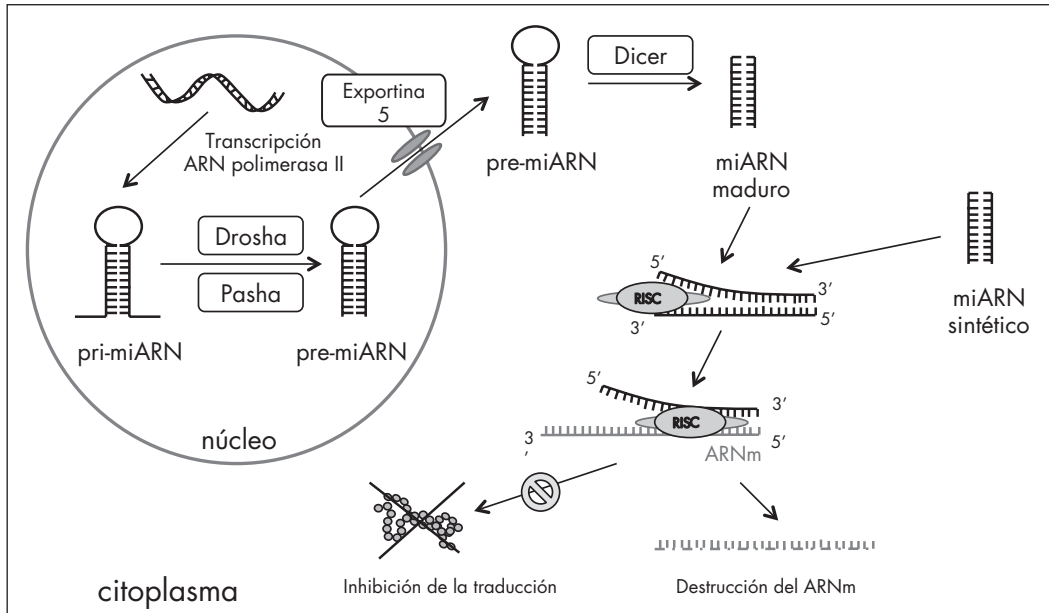


FIGURA 2.2. Funcionamiento del miARN.

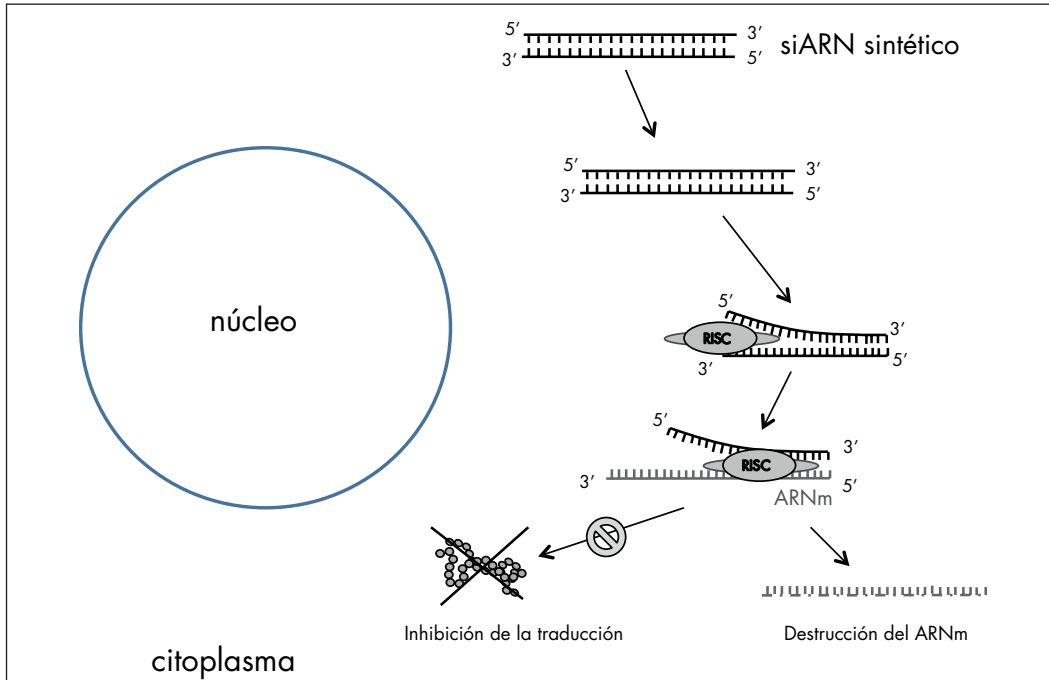


FIGURA 2.3. Funcionamiento del siARN.

Los siARN son más estables que los oligonucleótidos de ADN, pero un inconveniente es que pueden suprimir genes diferentes al gen diana debido a la similitud parcial de secuencias con otros ARNm diferentes al ARNm diana. Además, son reconocidos por inmunorreceptores, como los receptores tipo Toll, que inducen la liberación de citoquinas y la alteración de la expresión génica. Según la base de datos de ensayos clínicos, un total de 40 siARN se encuentran en diferentes etapas del desarrollo clínico y varios podrían recibir la aprobación en los próximos años. Entre las indicaciones para las que van destinados los siARN en estudios clínicos están la degeneración macular asociada a la edad, el glaucoma, el carcinoma hepatocelular, la fibrosis hepática, el síndrome de ojo seco, el trasplante renal, el melanoma y el carcinoma ductal de páncreas.

C) *shARN*

Las horquillas de ARN o *shARN* están formadas por dos secuencias complementarias de ARN de 19-22 pares de bases unidas por un pequeño arco de 4-11 nucleótidos, formando una especie de horquilla. Los shARN se sintetizan en la célula cuando se administra un plásmido de ADN, por lo que debe ser capaz de llegar al núcleo, donde se expresa y da lugar a la formación del shARN. El shARN es procesado en el núcleo por la ARN polimerasa I o III, que genera una estructura en forma de horquilla que es procesada en el núcleo por un complejo que contiene la enzima RNasa II (Drosha), formándose un pre-shARN que es transportado fuera del núcleo por la exportina 5. Una vez en el citoplasma, el complejo Dicer rompe la horquilla para dar el siARN correspondiente. La figura 2.4 recoge el mecanismo de actuación del shARN.

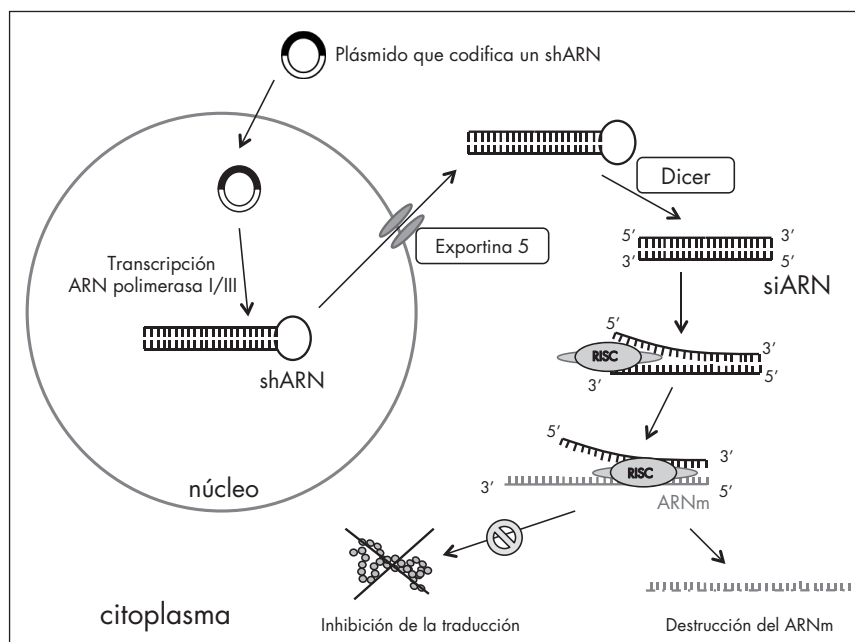


FIGURA 2.4. Mecanismo de actuación del shARN.

En el hígado, la administración de un shARN frente al virus de la hepatitis C (VHC) ha sido estudiado en un modelo de primate no humano de infección por el VHC, y propuesto para ensayos clínicos. Sin embargo, debido a la alta eficacia de los nuevos medicamentos inhibidores del VHC, los estudios están siendo dirigidos al tratamiento de la hepatitis B. Otras enfermedades para las que han sido estudiados los shARN son las distrofias musculares, la degeneración macular asociada a la edad, la retinitis pigmentosa, y algunas enfermedades neuronales.

2.4. Edición génica

La tecnología de *edición génica* ha emergido recientemente como herramienta para el tratamiento de numerosas enfermedades. Esta tecnología permite la modificación del genoma de células eucariotas de una manera muy precisa. Se basa en la utilización de nucleasas de edición génica, compuestas por un dominio que reconoce una secuencia específica de ADN, y una nucleasa, que produce un corte en la doble cadena. Tras la *rotura* del ADN, la *reparación* se puede producir por dos mecanismos: recombinación homóloga, o recombinación no homóloga. En la recombinación no homóloga, se elimina la secuencia específica, y puede ser utilizada para silenciar o corregir un gen patogénico. En la reparación homóloga, se inserta una secuencia de ADN “donante” para corregir un gen o para añadir uno nuevo.

Existen cuatro tipos de nucleasas de edición génica:

- Nucleasas de dedos de zinc (ZFN) (Zinc Finger Nucleases).
- Nucleasas tipo activadores de transcripción (TALEN) (Transcription Activator-Like Effector Nucleases).
- Meganucleasas.
- Nucleasas de secuencias repetidas palindrómicas cortas regularmente interespaciadas agrupadas (CRISPR-Cas9) (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats).

2.4.1. Nucleasas de dedos de zinc

Las nucleasas de dedos de zinc (ZFN), conocidas como “*tijeras moleculares*”, son proteínas formadas por un dominio de unión a ADN (formado por varios dedos de Zinc, ZF) fusionado con un dominio de rotura de ADN (habitualmente la enzima de restricción FokI). Los dedos de zinc pueden diseñarse para la unión específica a una región del genoma, y esto provoca una rotura de la doble cadena del ADN que se repara mediante recombinación homóloga u otro sistema de reparación del ADN. Una ventaja importante con respecto a la suplementación y a la supresión génica es que el efecto que produce es permanente.

Cada dedo de zinc contiene aproximadamente 30 aminoácidos, y reconoce una secuencia específica de ADN de 3 pares de bases, por lo que normalmente se asocian varios. Una vez que los dedos de zinc se unen al ADN, la enzima de restricción FokI es la que rompe el ADN. En general, si hay más de 3 módulos de dedos de zinc, se necesita generar dímeros de corte simétricos para conseguir una mayor especificidad y eficiencia. Aunque los ZFN han demostrado su potencial como “*tijeras genéticas*” en células de mamíferos, esta estrategia tiene limitaciones, ya que la

secuencia de reconocimiento en el ADN tiene que contener la secuencia 5'-GNNGNNGNN-3'. Además, la construcción de ZFN es un procedimiento caro y largo. En la figura 2.5 se recoge el funcionamiento de las ZFN.

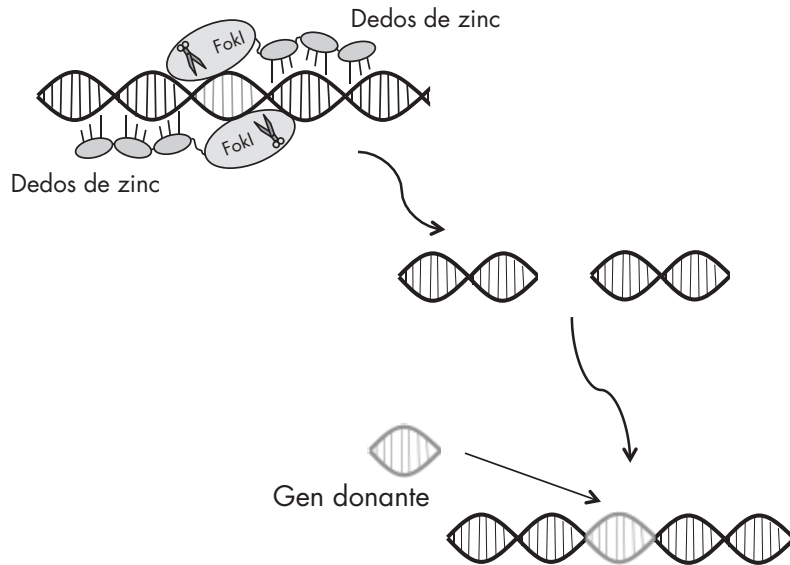


FIGURA 2.5. Mecanismo de funcionamiento de las ZFN.

2.4.2. TALEN

Se caracterizaron por primera vez en el patógeno de plantas *Xantomonas campestris*, que lo utiliza para promover su replicación en las células huésped. El dominio de unión al ADN, denominado *TALE*, contiene 34-35 aminoácidos por módulo, dos de los cuales determinan la secuencia específica de reconocimiento de un par de bases del ADN. Al igual que los ZFN, también utilizan FokI como enzima de restricción, aunque las TALEN son más fáciles de diseñar. No obstante, ambas resultan difíciles de administrar en las células debido a su tamaño, complicando la capacidad de generar múltiples cambios genéticos simultáneos. El reconocimiento de un único par de bases de ADN por un TALE supone una ventaja para la selección de la región objetivo, ya que se pueden generar secuencias personalizadas de TALE para reconocer secuencias genómicas únicas; sin embargo, el complicado procedimiento de ingeniería genética necesario para sintetizar un TALEN para el reconocimiento de una amplia variedad de secuencias de genes hace que esta estrategia no sea muy accesible. Para resolver este problema, los investigadores han desarrollado una *librería de plásmidos de TALEN* que reconocen 14-18 pares de bases y que pueden ser dirigidos contra 18 742 genes humanos. En la figura 2.6 se recoge el funcionamiento de las TALEN.