

Modulación génica terapéutica con oligonucleótidos antisentido

Ariadna Bargiela, Rubén Artero

Instituto de Biotecnología y Biomedicina de la Universidad de Valencia

INTRODUCCIÓN

Tenemos asumido que la expresión de los genes, junto con el ambiente, determina las características de los seres vivos. Este axioma de la biología molecular se extiende a los estados patológicos de modo que podemos decir que todas las enfermedades tienen su origen en una alteración en la homeostasis génica o, al menos, que todas podrían encontrar una solución o alivio si consiguiésemos controlar la expresión génica de un modo eficiente. En el caso de las enfermedades de base genética esto es evidente, pero incluso como resultado de infecciones, accidentes cardiovasculares o hasta traumatismos, es claro que conseguir controlar la expresión génica de manera precisa podría ofrecer terapias para patologías actualmente intratables. En condiciones patológicas como la isquemia, por ejemplo, se promueve el desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad del tejido afectado de eliminarlas mediante sistemas antioxidantes endógenos. Las ROS activan vías de señalización, que afectan al DNA y componentes celulares. Estas alteraciones conducen en última instancia a la muerte celular. Modular la respuesta a la hipoxia

mediante la inhibición de las vías activadas por ROS sería, por tanto, un tratamiento eficaz para limitar el daño tras isquemia en la retina, cerebro o corazón.

La estrategia terapéutica basada en modular la expresión génica endógena para aliviar una determinada situación patológica se denomina modulación génica terapéutica (MGT) y constituye un concepto de aplicación incluso más general en el desarrollo de terapias que la propia edición génica vía CRISPR. El problema, claro está, es con qué herramientas contamos para poner en práctica la MGT. Aunque regular la actividad de las proteínas mediante pequeñas moléculas resulta técnicamente menos complejo que actuar sobre los ácidos nucleicos, las estrategias desarrolladas en los últimos años hacen que sea ya posible modificar la expresión génica por medio de técnicas como el RNA de interferencia (RNAi) y oligonucleótidos antisentido (ASO, *antisense oligonucleotides*), que interactuando mediante complementariedad de secuencia con las dianas apropiadas consiguen reducir (o silenciar), o potenciar (o desreprimir), de forma precisa la expresión de transcritos diana concretos.



ESTRATEGIAS BASADAS EN RNA PARA SILENCIAR LA EXPRESIÓN

En el año 2001, Elbashir y Caplen describieron la existencia de RNAs de doble cadena con una longitud de 21-22 nucleótidos capaces de inducir el silenciamiento de RNAs concretos en células de mamíferos. Estos pequeños RNA de interferencia (siRNA) pronto se convirtieron en una herramienta ampliamente utilizada en el laboratorio ya que permitía de manera sencilla silenciar cualquier gen por medio de la utilización de, solamente, dos oligonucleótidos complementarios de secuencia definida. De este modo, resultaba posible silenciar genes codificantes para proteínas para las que no se dispone de inhibidores químicos

conocidos. Así fue como en el año 2003 se crearon las primeras empresas para explotar el potencial terapéutico del RNAi.

El RNAi utiliza siRNA y microRNAs (miRNA) con químicas naturales para regular la expresión génica. Los siRNA y miRNA regulan *in vivo* los niveles de proteína reconociendo de forma específica sus RNA codificantes. La enzima Dicer, una RNasa III, corta el RNA de doble cadena (dsRNA) y el RNA de horquilla corto (shRNA) en pequeñas moléculas de RNA bicatenario de entre 21 y 23 nucleótidos, denominados siRNA. Argonata (Ago) se une y separa el siRNA bicatenario de modo que una cadena se utiliza para guiar el complejo proteico hacia su diana y la otra hebra es degradada. Una vez que la hebra guía del siRNA reconoce y se une específicamente al RNA diana con una secuencia complementaria, el mRNA diana es degradado. Un mecanismo similar ocurre con la regulación mediada por miRNA. Los precursores de miRNAs son procesados por Dicer para generar miRNA maduros. Posteriormente, son reconocidos por el complejo de Argonata y conducidos a los transcritos diana a los que regulan. En este caso, el miRNA se une a una secuencia parcialmente complementaria normalmente localizada en el extremo 3'-UTR del transcrito promoviendo su desestabilización para reducir su traducción. Desde una perspectiva terapéutica, los siRNAs y los miméticos de miRNAs (también conocidos como agomiRs) se pueden sintetizar químicamente para que sus dianas sean transcritos donde resida la causa de alguno de los síntomas de una patología, por ejemplo mRNAs codificantes para proteínas tóxicas o que se sobreexpresen en la enfermedad. De este modo, se reprime la expresión y se busca potencialmente aliviar los síntomas causados por su actividad. Las estrategias terapéuticas basadas en RNAi se han desarrollado para diferentes patologías, algunas ya se encuentran en ensayo clínico y unas pocas, ya han alcanzado la autorización de las agencias regulatorias, como *Patisiran* (comercializado como *Onpattro* por *Amylin*), un siRNA terapéutico para la amiloidosis hereditaria por transtiretina.

El uso farmacológico de oligonucleótidos que desencadenan RNAi debe ser cuidadosamente optimizado en dos aspectos clave. Por un lado, para mejorar su estabilidad *in vivo*, los siRNAs y agomiRs terapéuticos son moléculas híbridas en las que mientras las cadenas guía mantienen químicas naturales para ser eficientemente reconocidas por las proteínas Ago endógenas, las cadenas pasajeras son portadoras de gran número de modificaciones artificiales en los enlaces internucleosídicos y la pentosa que previenen su degradación por RNasas. Por otro lado, la entrega de estas moléculas de RNA de doble cadena (dsRNAs) a las

células diana constituye un reto en sí mismo pues los dsRNAs son polianiones hidrofílicos que no se unen eficientemente a proteínas séricas y son rápidamente excretadas. Esto obliga a formular estas moléculas en nanopartículas lipídicas, o de otro tipo, o a modificarlas químicamente y conjugarlas con una molécula que interaccione con un receptor de membrana de elevada capacidad para su entrega eficiente al tejido diana. El ejemplo de mayor éxito es el uso de conjugados con GalNAC para su entrega a hepatocitos, que expresan fuertemente el receptor de asialoglucoproteínas, que es la estrategia utilizada por *Amylin* para desarrollar *Govisiran* para el tratamiento de adultos con porfiria hepática aguda.

Otra estrategia represora son los ASO de cadena sencilla, que entran en la célula mediante endocitosis y se unen al mRNA diana en el citoplasma. De manera similar a lo que ocurre con las estrategias que desencadenan RNAi, los ASO bloquean la expresión génica, pero pueden hacerlo a través de diferentes mecanismos. Por un lado, está el bloqueo estérico de una secuencia con una función crítica para el mRNA como es un codón de inicio, la adición de la modificación CAP, o una secuencia reguladora del splicing alternativo para promover o impedir la inclusión de un exón. Por otro lado, está la posibilidad de desencadenar degradación específica de un transcrito activando el corte endonucleolítico por la RNasa H. De manera similar a lo que ocurre con los fármacos basados en RNAi, los tratamientos basados en ASO tienen grandes desafíos relacionados con la entrega a las células diana. Sin embargo, en este caso, al tratarse de moléculas intrínsecamente anfipáticas, parten de la ventaja de una unión eficiente a proteínas séricas, y a proteínas de la superficie celular e intracelular. Este hecho facilita su ingreso en la célula y distribución sistémica, lo que permite su uso clínico sin necesidad de ninguna formulación específica.

Por medio de modificaciones químicas en su estructura, se ha conseguido (y se está mejorando) optimizar los principales parámetros farmacocinéticos (lo que el cuerpo hace al fármaco: absorción, distribución, metabolismo, excreción) y farmacodinámicos (lo que el fármaco hace al cuerpo: actividad) de los oligonucleótidos terapéuticos. Por ejemplo, una modificación básica para prevenir el corte por endonucleasas y promover la distribución a través del torrente sanguíneo son los enlaces internucleosídicos de tipo fosforotioato (PS) en los que un oxígeno que no participa en los enlaces éster se sustituye por un azufre. En conjunción con esta modificación principal, se incorporan cambios químicos en la ribosa para hacer las moléculas de RNA resultantes más estables químicamente, por sustitución en el C2' dando 2'-O-metilo (2'-OMe) >>>

y 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), y para mantener a la pentosa en una conformación endo para optimizar la afinidad en el reconocimiento de la complementariedad y la estabilidad de los híbridos, con modificaciones tales como locked nucleic acid (LNA) o *constrained Ethyl* (cEt). También son posibles los ASO basados en químicas mucho menos naturales como las basadas en morfolinos fosforodiamidados (PMO) y en ocasiones los ASO terapéuticos pueden estar conjugados a otras moléculas en 5' o 3'. Sin embargo, aunque una determinada combinación de estas modificaciones puede conducir a una molécula particularmente efectiva y poco tóxica cuando tiene que bloquear una secuencia crítica para la actividad de un mRNA, estas moléculas no son funcionales para desencadenar corte por RNasa H y se requiere una configuración específica para ello. Los ASO con estas características son los denominados *gapmers* y requieren una región central del DNA de al menos 10 nucleótidos flanqueados por ribonucleótidos modificados químicamente (entre 3 y 5 unidades) a ambos lados que protegen a la molécula de la degradación. De este modo, cuando un gapmer se une a su mRNA diana, se crea un híbrido DNA/RNA en la región central de la molécula que es reconocida por la RNasa H para su corte.

Algunos fármacos basados en ASO ya han sido aprobados para uso clínico por la Food and Drug Administration (FDA) americana, como *Casimersen*, *Eteplirsén*, *Golodirsén* y *Viltolarsén* para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, donde provocan salto de exones, y *Nusinersén*, comercializado como *Spinraza*, para el tratamiento de la atrofia muscular espinal, donde promueve la inclusión del exon 7 en los transcritos de *SMN2* bloqueando un elemento silenciador del *splicing*.

POTENCIAL TERAPÉUTICO DEL RNA PARA AUMENTAR LA EXPRESIÓN

Mientras que las estrategias para silenciar la expresión génica mediante RNAi o RNasa H se conocen desde hace décadas, y se trata de procesos rápidos que directamente afectan la estabilidad de los transcritos diana (aunque también hay siRNAs que pueden regular a nivel de transcripción), los mecanismos que permiten aumentar la expresión génica mediante oligonucleótidos terapéuticos son relativamente recientes. El principal actor en este campo es el proceso del RNA de activación (RNAa), desencadenado por RNAs pequeños de activación (saRNAs), equivalentes a los siRNAs pero con unas dianas y mecanismo de acción diferente.

El RNAa se descubrió hacia 2006 cuando los investigadores diseñaron dsRNAs con secuencias complementarias a la región promotora del gen de E-cadherina, en células de mamífero y detectaron la activación

de la transcripción del mRNA del gen diana y de su expresión génica. Los saRNA son RNA pequeños no codificantes de 21 nucleótidos con una estructura y una composición química idéntica a la de los siRNA. Sin embargo, sus funciones biológicas son completamente opuestas. La diferencia clave entre ambos radica en el mecanismo de acción pues los saRNA directamente activan la transcripción induciendo modificaciones epigenéticas en el promotor diana. El saRNA citosólico se une específicamente a la proteína AGO2, a diferencia de los RNA que desencadenan interferencia, que pueden unirse a AGO1-4 para desarrollar su actividad. Para activar la transcripción, el complejo saRNA-AGO2 es transportado al núcleo, probablemente por la importina-8. Una vez en el núcleo, el complejo AGO2-saRNA recluta proteínas clave para el inicio de la transcripción, como la RNA helicasa A (RHA), la proteína CTR9 homóloga asociada a la RNA polimerasa (CTR9) y el factor 1 homólogo asociado a la RNA polimerasa II (PAF1) en el sitio del promotor diana.

La utilización de saRNA como terapia resulta muy atractiva no sólo por su mecanismo de activación génica, que permite efectos potentes y a largo plazo al actuar a nivel de la transcripción, sino también por su química y diseño. Al tratarse de un RNA pequeño, se puede sintetizar químicamente con facilidad y con un alto rendimiento. También se encuentran disponibles herramientas bioinformáticas para predecir secuencias de saRNA que actúan sobre promotores específicos para activar la transcripción. Sin embargo, al igual que ocurre con otras estrategias terapéuticas basadas en RNAi, al tratarse de RNAs de doble cadena la administración clínica requiere el uso de vectores lipídicos y todavía es necesario superar varios retos, entre ellos la posible activación de la respuesta inmunitaria innata, los efectos *off target* y la escasa estabilidad.

La empresa MiNA Therapeutics comenzó ya en 2006 el desarrollo de saRNAs (cuando todavía no se conocía prácticamente nada de cómo funcionaban los saRNAs) para potenciar la expresión del factor de transcripción *CEBPA* en pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC) avanzado y en 2016 inició un ensayo clínico fase 1 con el fármaco MTL-CEBPA. Los resultados iniciales fueron prometedores, pero menos claros de lo inicialmente anticipado, y actualmente se sigue evaluando su aplicación en combinación con sofenib en la misma indicación. Otras empresas han apostado por la explotación comercial del proceso del RNAa como por ejemplo la compañía Reactigen que está llevando a cabo la caracterización preclínica de una molécula para promover la expresión de *SMN2* como aproximación terapéutica para el tratamiento de atrofia muscular espinal.

Una alternativa a la activación directa de la expresión génica de un gen diana en una patología es desreprimir su expresión. Se estima que al menos el 70% de los transcritos humanos están sometidos a algún tipo de represión por miRNAs. Por lo tanto, utilizar ASO modificados químicamente cuya secuencia es complementaria a la del miRNA objetivo (conocidos como antagomiRs o antimiriRs), ofrece una opción para potenciar la expresión génica por desrepresión. Los antagomiRs actúan, por tanto, como un señuelo que impide que el miRNA diana bloquee la expresión de sus dianas. Los antagomiRs se describieron por primera vez en 2005 en un estudio en el que la actividad de miR-16, miR-122, miR-192 y miR-194 fue inhibida en ratones utilizando un RNA modificado químicamente de cadena sencilla y con una secuencia complementaria a la de los miRNA.

El virus de la hepatitis C (VHC) fue una de las primeras indicaciones propuestas para la terapia basada en antagomiRs pues se sabe que miR-122 estimula la replicación y la traducción del genoma del VHC (de RNA) uniéndose a dos regiones adyacentes en su 5'UTR. La inhibición de miR-122 por antimiriRs reduce significativamente el número de copias del VHC en células infectadas *in vitro* y en ratones, primates

y humanos. Una molécula candidata, miravirsén (15 nucleótidos con modificaciones PS y LNA), contra el VHC está siendo desarrollada por Santaris Pharma y se encuentra en ensayo clínico fase 2.

En el contexto de las enfermedades neuromusculares cabe destacar la distrofia miotónica tipo 1. Esta patología está causada por la expansión patológica del triplete CTG en 3'-UTR del gen DMPK que, en los transcritos DMPK portadores de las expansiones, genera unas horquillas de RNA capaces de secuestrar proteínas reguladoras del splicing alternativo, entre las que se encuentra MBNL1. De este modo, se reduce la disponibilidad de MBNL1 causando algunos de los síntomas más relevantes de la enfermedad. Se ha demostrado que la traducción de MBNL1 y de su parálogo MBNL2 está regulada por miR-218 y miR-23b. Actualmente, la empresa *spin-off* de la Universidad de Valencia ARTHEx Biotech está llevando a cabo el desarrollo preclínico regulatorio de antagomiRs contra miR-218 y miR-23b. De este modo, se inhibe la actividad represora de los miRNAs sobre los transcritos de MBNL1 y 2, desreprimiendo la traducción de las respectivas proteínas que aumentan su disponibilidad en la célula y revierten fenotipos característicos de la enfermedad tanto en cultivos de células musculares





humanas como en modelos murinos de la enfermedad. Se espera que estas moléculas inicien su ensayo en la clínica en 2023.

Una estrategia relacionada con esta última es la utilización de competidores de miRNAs conocidos como blockmiRs. Estas moléculas compiten con el miRNA por su secuencia diana en un mRNA concreto, impidiendo su efecto represivo de forma específica de transcrito. En 2007 se publicó el primer trabajo basado en esta aproximación en Danio rerio. Se utilizaron morfolidos complementarios a los sitios de unión de miR-430 en los transcritos *ift2* y *sqt*. Como resultado, los autores detectaron aumento de la expresión de las respectivas proteínas. Actualmente, la compañía Mirrx, en colaboración con Biolink, está trabajando en el desarrollo preclínico del blockmiR CD5-2. CD5-2 aumenta selectivamente la cadherina endotelial vascular al unirse a su mRNA inhibiendo así la regulación negativa mediada por miR-27a. De este modo, el CD5-2 se ha diseñado para utilizarse en combinación con inmunoterapias como los inhibidores de *checkpoints* y vacunas contra el cáncer.

De manera global, los blockmiRs y los antagoniRs se pueden plantear como estrategias complementarias. La primera resulta adecuada en casos en los que se busca impedir la unión de un miRNA a una o unas pocas dianas. Esta situación puede darse cuando la regulación de otras dianas por un miRNA concreto es beneficiosa o incluso necesaria para la homeostasis celular. Alternativamente, cuando un miRNA concreto está sobreexpresado en la condición patológica, resulta conveniente recurrir a un antagoniR para reducir la actividad global del miRNA.

Los ejemplos previos para implementar TGM anticipan que estamos al inicio de una revolución en el

desarrollo de terapias porque, fundamentalmente, a diferencia de las tradicionales pequeñas moléculas, los fármacos basados en oligonucleótidos ofrecen una plataforma común para afrontar cualquier mecanismo patogénico a través de ASO complementarios contra una secuencia crítica. Ser capaz de diseñar fármacos oligonucleotídicos abre, a su vez, la posibilidad de plantear tratamientos individualizados y su desarrollo en tiempos récord, como demuestran los apenas 9 meses que llevó pasar de la identificación de la mutación en el gen CLN7 responsable de la enfermedad de Batten en la niña Mila Makovec y el desarrollo del oligonucleótido Milasen. Desgraciadamente, Milasen no fue capaz de salvar la vida de Mila, pero sin duda la acumulación de conocimiento sobre la actividad de estas moléculas y de los métodos para su entrega efectiva en las células diana ofrecerá pronto nuevas opciones terapéuticas que sí salvarán la vida de futuras Milas. ■

PARA LEER MÁS

- Cerro-Herreros E, Sabater-Arcis M, Fernández-Costa JM, Moreno N, Pérez-Alonso M, Llamusi B, Artero R. “miR-23b and miR-218 silencing increase Muscblind-like expression and alleviate myotonic dystrophy phenotypes in mammalian models”. *Nat Commun.* 26 (2018).
- Kim J, Hu C, Moufawad C, Achkar E, Black LE, Douville J, et al. “Patient-Customized Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease” *N Engl J Med.* 38 (2019).
- Kwok A, Raulf N, Habib N. “Developing small activating RNA as a therapeutic: current challenges and promises”. *Ther Deliv.* 10 (2019) 151-64.
- Rizk M, Tüzmen S. “Update on the clinical utility of an RNA interference-based treatment: focus on Patisiran”. *Pharmgenomics Pers Med.* 10 (2017).
- Sheikh O, Yokota T. “Assessing the Current State of Exon Skipping/Inclusion and Gene Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy and Spinal Muscular Atrophy”. *BioDrugs;* 35 (2021) 389-99.