

Terapias basadas en oligonucleótidos antisentido para el tratamiento de distrofias hereditarias de la retina

Irene Vázquez-Domínguez¹, Alejandro Garanto².

¹Department of Human Genetics and Donders

Institute for Brain, Cognition and Behaviour,

Radboud University Medical Center, Nijmegen (Países Bajos).

²Department of Pediatrics, Department of Human Genetics,

Amalia Children's Hospital and Radboud Institute of Molecular

Life Sciences (RIMLS), Radboud University Medical Center, Nijmegen (Países Bajos).

1. DISTROFIAS HEREDITARIAS DE LA RETINA

El ojo es la ventana al mundo exterior y es uno de los órganos más complejos del cuerpo humano. Está constituido por diferentes tejidos como la córnea, el iris o el cristalino en la parte frontal y por la retina en la parte posterior. Esta última es un complejo tejido formado por millones de células neuronales sensibles a la luz o fotorreceptores, pero también contiene otras

células que ayudan a recibir, organizar y transmitir las diferentes señales, que son finalmente enviadas al cerebro a través del nervio óptico.

El ojo, como el cerebro, está protegido por una barrera; en este caso, la barrera hematorretiniana, que está formada por la membrana de Bruch y por el epitelio pigmentario de la retina (EPR), y se sitúa entre los fotorreceptores y la coroides (*Figura 1*).

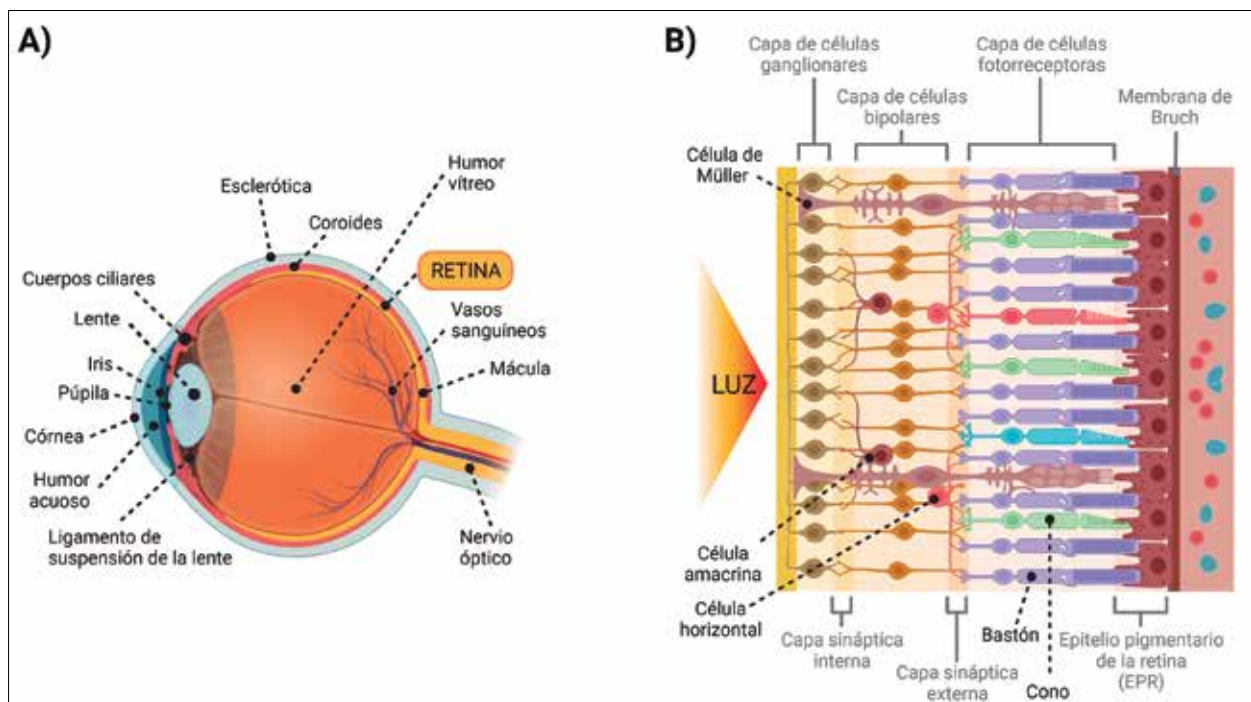


Figura 1

Estructura del ojo y de la retina. A) Esquema del ojo, donde la retina se localiza en la parte posterior (en amarillo). B) Estructura de la retina con los diferentes tipos celulares organizados en capas. Principalmente, los fotorreceptores (conos y bastones) y EPR son las células que degeneran progresivamente en las distrofias hereditarias de la retina (DHR). (*Figura creada usando BioRender.com*).

»» Las distrofias hereditarias de la retina (DHR) engloban a un conjunto heterogéneo de enfermedades genéticas en las que retina se degenera progresivamente, conllevando la pérdida de la visión. Estas distrofias afectan en torno a 1 de cada 3000 personas en todo el mundo. Actualmente, se han identificado variantes genéticas en más de 250 genes asociados con estas enfermedades. Principalmente, los fotorreceptores son las células más afectadas en esta patología, aunque también existen subtipos en los que otras células de la retina se ven igualmente afectados, como el EPR o las células bipolares. Finalmente, las DHR pueden presentar todos los tipos conocidos de herencia: autosómico dominante o recesivo, ligada al cromosoma X, así como asociados a herencia mitocondrial, o en casos aislados herencia digénica o disomía uniparental. A pesar de todos los esfuerzos para encontrar las causas genéticas de las DHR, alrededor del 30-35% de los pacientes aún no dispone de un diagnóstico genético firme.

2. TERAPIAS ACTUALES EN DHR

Desde el punto de vista terapéutico, el ojo puede considerarse como un órgano modelo para el tratamiento. En primer lugar es muy accesible, facilitando aproximaciones quirúrgicas relativamente sencillas para administraciones locales como la intravítrea (directamente en la cavidad intravítrea) y la subretiniana (directamente entre el espacio situado entre fotorreceptores y EPR). Además, la barrera hematorretiniana otorga al ojo de un entorno inmunitario privilegiado. Esto implica que si se introduce un antígeno extraño (como un vector viral), éste es generalmente bien tolerado y por tanto no se inducen respuestas inflamatorias graves. Asimismo, el riesgo de una difusión generalizada del vector administrado localmente es bajo, previniendo efectos sistémicos no deseados. Por otro lado, el tamaño del ojo y el hecho de que sus células no se dividan por ser de tipo neuronal, hace que pequeñas dosis de estos vectores consigan una respuesta terapéutica que se mantiene en el tiempo. Además, las DHR son progresivas, con lo que existe una ventana de posibilidades para la intervención. En ese caso, los exámenes oftalmológicos no son invasivos, facilitando la evaluación y reduciendo riesgos para el paciente.

Aunque algunos enfoques terapéuticos han obtenido resultados prometedores, aún existen muchos obstáculos que deben ser superados para poder conseguir una implementación amplia de los tratamientos actuales para estas patologías. Por ejemplo, la gran diversidad de variantes génicas dificulta considerablemente el desarrollo de un tratamiento común, dejando los tratamientos personalizados como única opción. Esto, a su vez, reduce la cantidad de pacientes que pueden ser tratados. Entre las terapias que abarcan a

un mayor número de pacientes se encuentran las terapias génicas de reemplazamiento. Estas se basan en vectores, principalmente virales, que llevan la copia correcta del gen mutado. Sin embargo, el tamaño de los principales genes implicados en el desarrollo de DHR excede la capacidad de estos vectores virales, como los vectores virales adenoasociados o AAVs, que son precisamente los preferidos para la administración retiniana pero sólo admiten un cargo de 4,7 kb. El primer tratamiento de reemplazamiento aprobado por la FDA y EMA para DHR es Luxturna. Esta terapia introduce una copia sana del gen *RPE65*, recuperando la funcionalidad proteica. La disfunción de *RPE65* es principalmente responsable de un subtipo de amaurosis congénita de Leber (LCA). A pesar de que las terapias de reemplazamiento han demostrado muy buenos resultados, en este artículo nos vamos a centrar en un tipo de terapia de ARN, cuyo uso se ha incrementado en la última década y ha resultado ser de gran utilidad para esos genes que exceden la capacidad máxima de los vectores.

3. TERAPIAS DEL ARN BASADAS EN OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO (AON)

Las terapias del ARN engloban todas las moléculas que actúan a nivel del ARN. La gran ventaja de estas aproximaciones es que no realizan cambios permanentes sobre el ADN y, se consideran más seguras, aunque la administración deba repetirse periódicamente para mantener el tratamiento durante la vida del paciente. En este artículo nos centraremos exclusivamente en los oligonucleótidos antisentido (AONs) de cadena simple. Éstos son pequeñas moléculas modificadas de ARN o de ADN complementarias a una región específica del (pre-)ARNm diana, permitiéndoles unirse a él e impedir o mejorar la unión de los distintos complejos ARN-proteína esenciales para el *splicing*, modificar de expresión mediante la degradación del (pre-)ARNm diana, o bloquear la traducción del ARNm. En nuestro laboratorio, empleamos los AONs para corregir defectos en el proceso de *splicing* que ocurren en torno al 15% de los casos de DHR. En el proceso de *splicing* las regiones no informativas (intrones) son eliminadas, dejando las regiones informativas (exones) juntas formando el ARNm que será posteriormente traducido a una proteína. Este proceso puede verse alterado por variantes genéticas. Normalmente, las variantes exónicas causan un salto de exón (el exón no se introduce en el ARNm final), la elongación del exón (la parte más inmediata del intrón es reconocida como exón y se incluye en el ARNm) y la retención del intrón (el intrón entre dos exones no se elimina). La mejora en técnicas de secuenciación masiva ha permitido identificar un alto número de variantes intrónicas causantes de DHR.

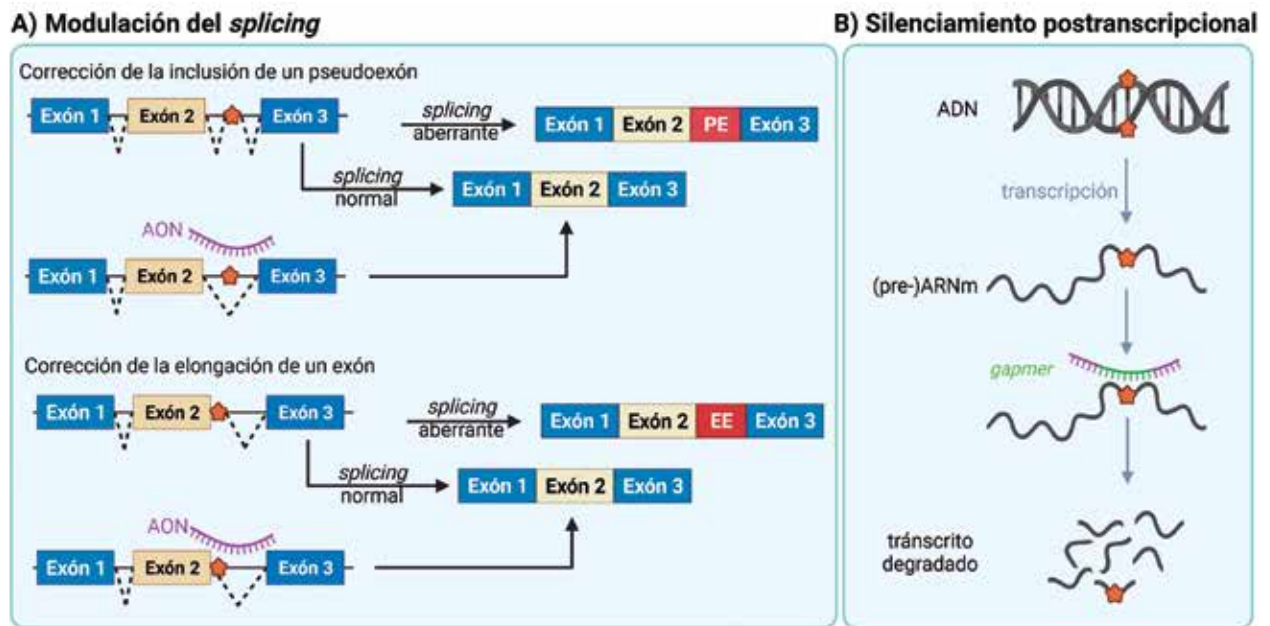


Figura 2

Representación esquemática de las terapias basadas en AONs aplicadas a las DHR. Se pueden discernir entre el uso para modular el *splicing* y las que generan un silenciamiento genético postranscripcional. PE: pseudoexón; EE: elongación de exón (Figura creada usando *BioRender.com*).

Estas variantes introducen generalmente nuevos sitios de *splicing* que promueven el reconocimiento de una parte del intrón como un exón, comúnmente llamados pseudoexones. En la gran mayoría de todos los casos mencionados, la pauta de lectura del ARNm se ve alterada, introduciendo codones de terminación prematuros, y a menudo son degradados por la célula disminuyendo dramáticamente la cantidad de proteína funcional. Afortunadamente, todos estos defectos pueden ser modulados usando AONs.

En un comienzo, los AONs eran sencillas moléculas de ARN antisentido que se administraban directamente sobre las células u organismos para investigación básica. Con los años, estas moléculas han sido optimizadas para su uso terapéutico, aumentando la absorción, biodistribución, afinidad y estabilidad, a la vez reduciendo su toxicidad. En la retina, estas moléculas pueden introducirse en las células sin necesidad de usar un vector transportador. Sin embargo, se requieren administraciones múltiples durante la vida del paciente. Métodos que emplean AAVs están siendo estudiados para así reducir la periodicidad de las inyecciones.

Nuestro grupo se ha centrado en corregir las mutaciones intrónicas que afectan el proceso de *splicing* (Figura 2A). La primera prueba de concepto fue realizada

para la mutación c.2991+1665A>G del gen *CEP290*. Ésta causa un subtipo de LCA por la inserción de un pseudoexón con un codón de stop prematuro. El uso de AONs permitió eliminar el pseudoexón aberrante y corregir el fenotipo celular de las células del paciente. Actualmente, este AON ha llegado a ensayos clínicos con resultados prometedores. El éxito de este trabajo nos llevó a expandir el uso de AONs para otros defectos de *splicing* en DHR.

El gen *ABCA4* es responsable de la enfermedad de Stargardt, que causa una degeneración precoz de la mácula (parte central de la retina) causando una pérdida de la visión central seguida de una pérdida progresiva de la visión periférica. Gracias a la secuenciación masiva del locus de *ABCA4* liderada por el Prof. Cremers, se ha identificado un gran número de variantes intrónicas que generan pseudoexones. Es importante mencionar que algunos de estos defectos son sólo detectados en la retina, y que gracias a la tecnología de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), hoy en día podemos generar fotorreceptores en cultivo para usarlos como modelo para estudios funcionales y evaluar moléculas terapéuticas, como los AONs. En varios estudios publicados por nuestro laboratorio se demuestra el gran potencial de los AONs para corregir defectos en el *splicing* causantes de la enfermedad de Stargardt. En total, más de 25 defec- >>>

»» tos de *splicing* han podido ser corregidos usando AONs y actualmente estamos investigado cómo llevar estos AONs a la clínica. Además, tanto nuestro grupo como otros, han desarrollado ensayos preclínicos para distintos genes asociados con DHR como son *OPA1*, *CHM* o *USH2A*.

Los AONs también pueden ser diseñados para causar la degradación del (pre)mRNA (Figura 2B). En este caso, se denominan ‘*gapmer*’ y son moléculas híbridas de ADN y ARN que pueden activar la función de la ribonucleasa H1 intracelular (RNAsaH1). La RNAsaH1 reconoce los dúplex ARN-ADN y cataliza una escisión no específica de la hebra de ARN de dicho dúplex. La gran ventaja de este sistema es que una pequeña cantidad de AON es suficiente para inducir esta reacción catalítica. La eficiencia de los AON de tipo *gapmer* ya ha sido testada in vitro e in vivo en enfermedades de la retina. En 2015, Murray y colaboradores usaron un modelo de ratón para el gen de la rodopsina (*RHO*, p.Pro23Hys) expresado en bastones, junto con estos *gapmer* AONs. Sus resultados demostraron que la reducción del transcrito mutante conllevaba a una reducción de la degradación de los fotorreceptores, preservando, con ello, su función. Como se mencionará posteriormente, esta molécula está actualmente en un ensayo clínico de fase I/II. Más recientemente, el grupo de la Prof. De Baere usó *gapmers* para disminuir el transcrito patológico del gen *NR2E3*, que genera una variante autosómica dominante de retinitis pigmentaria.

4. ESTADO ACTUAL DE LAS TERAPIAS DEL ARN EN DHR

Curiosamente, en 1998 el primer AON aprobado por la FDA era para una enfermedad ocular, Formivirsén (o Vitravene), servía para tratar la retinitis por

citomegalovirus en pacientes cuyo sistema inmunitario estaba comprometido. Desde entonces, diversos ensayos clínicos en los que se emplean terapias del ARN para tratar diversas enfermedades asociadas al ojo han sido desarrollados, **y en particular para las DHR (Tabla 1)**. En DHR existen principalmente dos moléculas terapéuticas cuyos ensayos clínicos se encuentran más avanzados: QR-110 (o Sepofarsen) y QR-421a. QR-110 es el AON anteriormente indicado capaz de corregir la mutación c.2991+1655A>G en el gen *CEP290*. Esta mutación causa hasta el 15% de los casos de LCA en algunas poblaciones. Los resultados del ensayo clínico de fase I/II demostraron que la mayoría de los pacientes mejoró tras la administración de QR-110. Además, este estudio corroboró que los AONs son seguros y bien tolerados por el ojo humano. Actualmente esta molécula está en fase III. QR-421a, en cambio, ha sido diseñado para tratar el síndrome de Usher tipo 2a y retinosis pigmentaria no sindrómica debidas a la presencia de variantes patológicas en el exón 13 del gen *USH2A*. QR-421a emplea también un AON, pero en este caso, el mecanismo terapéutico consiste en la escisión del exón 13, para generar una proteína más pequeña, pero con actividad residual. Los primeros resultados publicados mediante una nota de prensa han confirmado una mejora de los pacientes. Recientemente, un ensayo clínico de fase II para QR-421a ha sido aprobado. Tanto QR-110 como QR-421a están siendo administrados a través de inyecciones intravítreas en el ojo con la designación de medicamento huérfano en los Estados Unidos y la Unión Europea, y de enfermedad pediátrica rara y de vía rápida de la FDA. Más recientemente, se ha aprobado un nuevo ensayo clínico empleando *gapmers* para la mutación con efecto dominante negativo p.Pro23Hys (P23H) del gen *RHO*. En particular, esta molécula está

Gen	Molécula terapéutica	Identificador	Estado	Tipo de ensayo clínico
<i>CEP290</i>	QR-110	NCT03140969	Completado	Fase I/II
		NCT03913130	Activo	Fase I/II
		NCT03913143	Activo	Fase II/III
		NCT04855045	Reclutando pacientes	Fase II/III
<i>RHO</i>	QR-1123	NCT04123626	Reclutando pacientes	Fase I/II
<i>USH2A</i>	QR-421a	NCT03780257	Activo	Fase I/II
		NCT05085964	Inscripción por invitación	Fase II

Tabla 1. Fuente: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home> (datos correspondientes a noviembre de 2021).



diseñada para degradar el transcrito de ARN mutado, sin alterar la copia correcta. Hasta ahora, todos los ensayos clínicos basados en AON para DHR están siendo realizados por la empresa biotecnológica neerlandesa Pro-QR (Leiden, Países Bajos). Sin embargo, a nivel preclínico, los AONs están demostrando resultados prometedores para una variedad más amplia de genes, y otras farmacéuticas están trabajando en llevar estos AONs a la clínica. Otras iniciativas como el Centro Neerlandés para Terapias de ARN (*Dutch Center for RNA Therapeutics*) o n-LoRem, tienen como objetivo usar AONs para corregir mutaciones ultra raras sin, desafortunadamente, interés comercial para las empresas farmacéuticas.

5. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Como se ha observado en otros órganos, la eficacia, biodistribución y toxicidad pueden variar dependiendo de las modificaciones químicas del AON. Además, mejores modelos humanos son necesarios para poder evaluar la eficacia de estas moléculas con más rigurosidad. Nuestro grupo está investigando cómo dichas modificaciones alteran estos parámetros en la retina para optimizar el tratamiento mediante el uso de AONs. Actualmente, estamos desarrollando modelos celulares más complejos que permitan generar una retina en una placa usando la tecnología de órgano en un chip. A pesar de todo el progreso y el gran potencial demostrado, aún quedan muchas incógnitas por responder, no sólo a nivel molecular y bioquímico, sino también a nivel clínico. Por ejemplo, ¿cuál es el punto de no retorno de las DHR para determinar

el éxito de la terapia? ¿Cómo determinar el potencial terapéutico a largo plazo? ¿Puede el ojo aceptar/resistir las inyecciones periódicas cada 3-6 meses durante la vida restante del paciente? En cualquier caso, los AONs han demostrado ser moléculas de gran potencial para tratar las distrofias de retina. Su alta tolerancia y eficacia en el ojo, así como su baja toxicidad y fácil administración no hacen más que afianzar su futuro prometedor. ■

PARA LEER MÁS

- Albert, S, Garanto, A, et al. "Identification and Rescue of Splice Defects Caused by Two Neighboring Deep-Intronic *ABCA4* Mutations Underlying Stargardt Disease". *Am J Hum Genet* (2018) 102(4):517-27.
- Collin, R.W.J., Garanto, A. "Applications of antisense oligonucleotides for the treatment of inherited retinal diseases". *Curr Opin Ophthalmol* 28(3) (2017). 260-6.
- Dulla, K., et al., "Splice-Modulating Oligonucleotide QR-110 Restores CEP290 mRNA and Function in Human c.2991+1655A>G LCA10 Models". *Mol Ther Nucleic Acids* (2018). 12: p. 730-40.
- Hammond, S.M., et al. "Delivery of oligonucleotide-based therapeutics: challenges and opportunities". *EMBO Mol Med*, 13(4) (2021) e13243.
- Tomkiewicz, T.Z., et al. "Antisense Oligonucleotide-Based Rescue of Aberrant Splicing Defects Caused by 15 Pathogenic Variants in *ABCA4*". *Int J Mol Sci* 22(9) (2021) 4621.
- Vázquez-Domínguez, I, Garanto, A, Collin, R.W.J. "Molecular Therapies for Inherited Retinal Diseases—Current Standing, Opportunities and Challenges". *Genes* (Basel) 10(9) (2019) 654.