

Terapias basadas en el ARN

Tertulias tecnológicas con los amigos del profesor Ramón Salazar. BCN 2022

Formación y Función del ARN mensajero
Departamento de Biología Molecular
IPBLN - Granada



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



“Dado el carácter y la finalidad exclusivamente docente y eminentemente ilustrativa de las explicaciones en clase de esta presentación, el autor se acoge al artículo 32 de la Ley de Propiedad Intelectual vigente respecto del uso parcial de obras ajenas como las imágenes, gráficos u otros materiales contenidos en las diferentes diapositivas”.



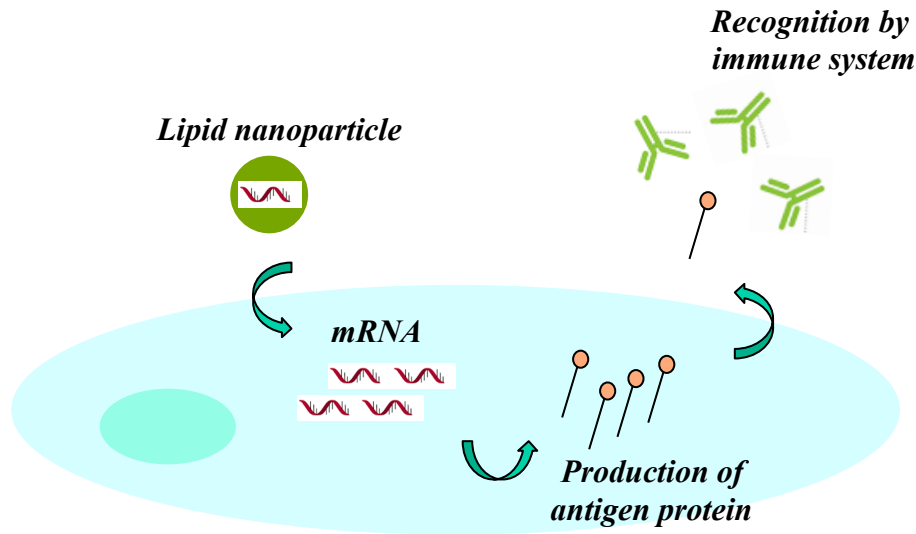
MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



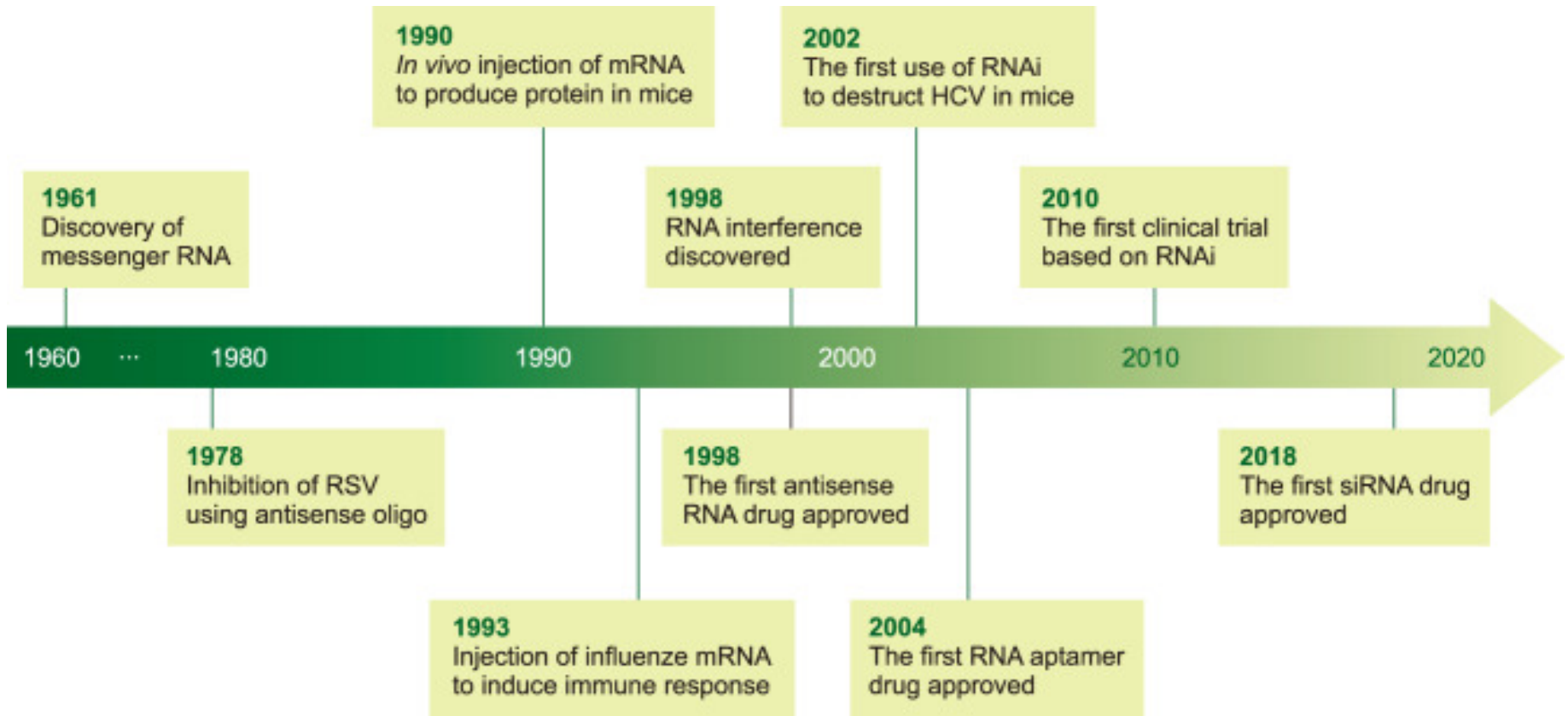
Terapias basadas en el ARN

La terapia del ARN se refiere al tratamiento o prevención de enfermedades utilizando moléculas basadas en el ARN

La eficacia sin precedentes de las vacunas de ARN mensajero (ARNm) contra la COVID-19 ha permitido el desarrollo de nuevas terapias basadas en el ARN para el tratamiento de enfermedades humanas



Cronograma histórico de los desarrollos clave en la terapia de ARN



Source: PMID: 32509554

Ventajas de los fármacos basados en el ARN frente a compuestos terapéuticos más convencionales

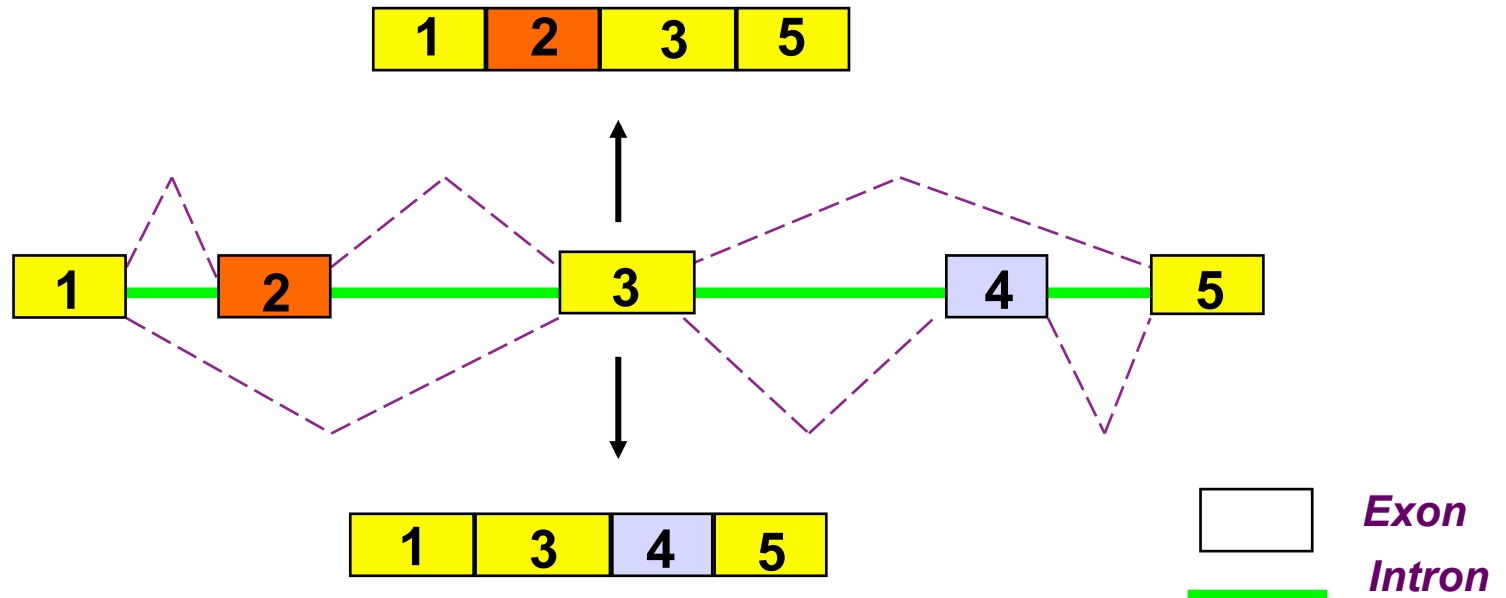
- Reconocen componentes genéticos dentro de la célula, que de otro modo no pueden ser alcanzados mediante el uso de moléculas pequeñas o anticuerpos
- Producción rápida y rentable (por ejemplo, vacunas contra el SARS-CoV-2)
- Efecto a largo plazo: siRNA Inclisaran dirigido al ARNm de PCSK9, que dura más de seis meses después de una sola inyección
- Útil para las enfermedades raras: Milasen, el primer fármaco diseñado para una sola persona (Mila Makovec, diagnosticada con una forma inusual de la enfermedad de Batten, un trastorno neurológico letal de rápida progresión. *Kim et al.*, PMID 31597037)
- Sin riesgo de genotoxicidad, en comparación con la terapia de ADN



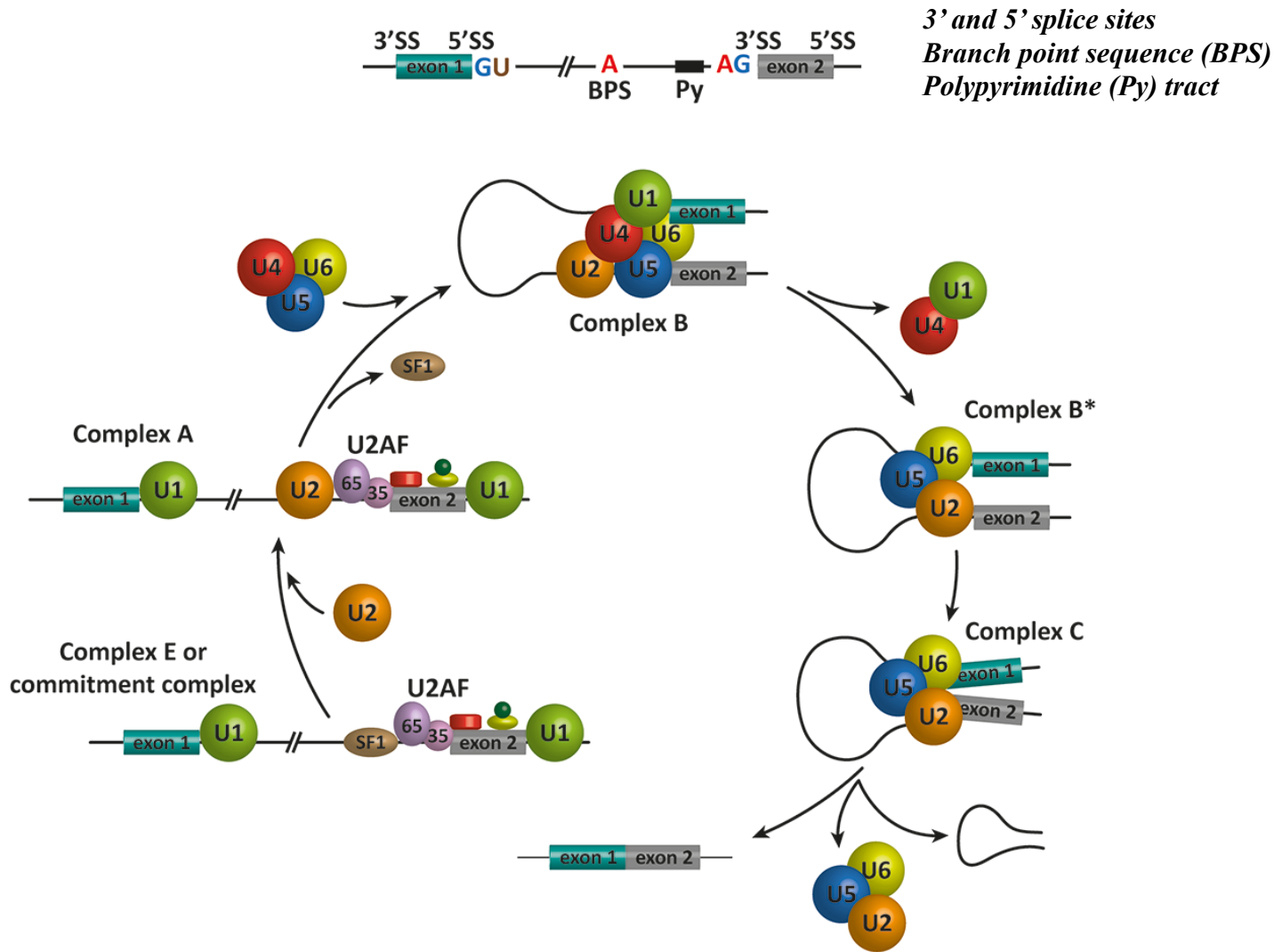
Splicing del precursor del ARNm (pre-ARNm)

El **splicing convencional** es el proceso de eliminación de intrones y unión de exones en el orden en que aparecen en un gen.

El **splicing alternativo** es el proceso de selección de diferentes exones dentro de un precursor del ARN mensajero (pre-ARNm) para producir diferentes transcritos a partir del mismo gen.



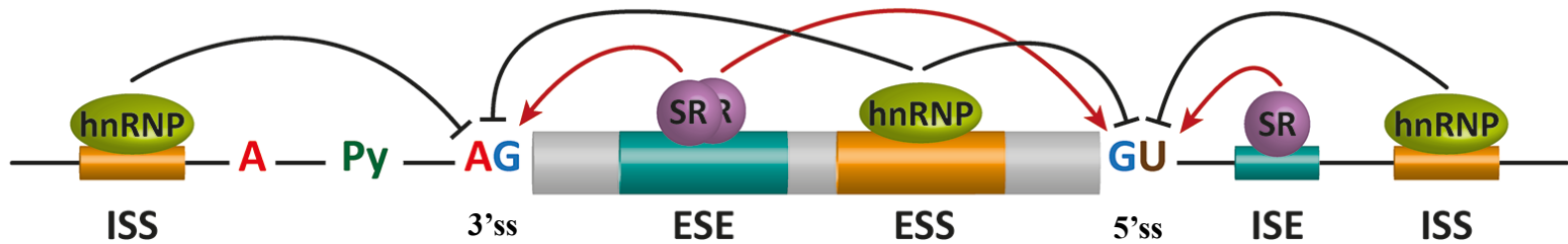
Representación esquemática del ensamblaje de los distintos complejos de splicing (spliceosoma) sobre el pre-ARNm



MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN



Regulación del splicing alternativo por secuencias génicas en *cis* y por factores proteicos en *trans*

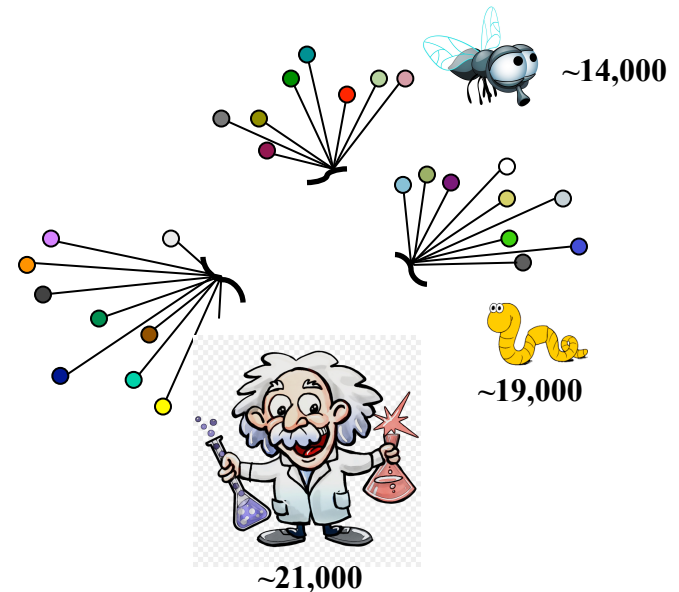


ESE: exonic splicing enhancers
ESS: exonic splicing silencers
ISE: intronic splicing enhancers
ISS: intronic splicing silencers

hnRNPs: heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
SR: serine/arginine-rich proteins

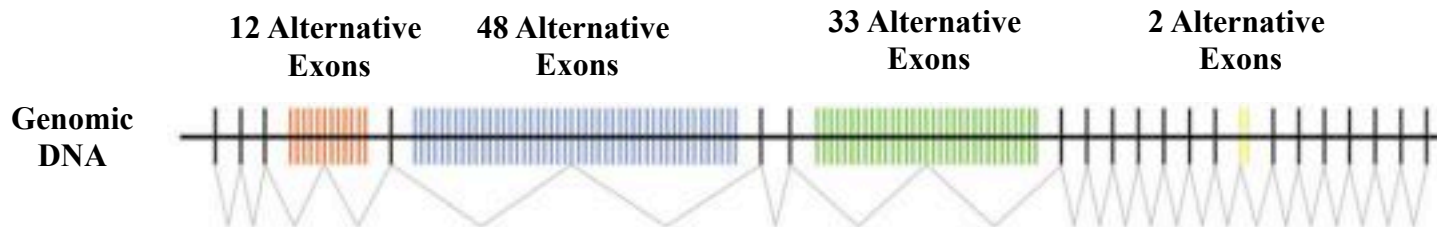
¿Por qué este proceso es tan importante?

El splicing alternativo es el mecanismo regulador postranscripcional más importante de la diversidad proteómica y la complejidad funcional



El ejemplo más conocido de la enorme diversidad que causa este proceso es el gen de la molécula de adhesión celular del síndrome de Down (**Dscam**) de *Drosophila*, que potencialmente puede dar lugar a **38.016** proteínas generadas a través del splicing alternativo

El número de isoformas de Dscam supera el número total de genes codificados en el genoma de *D. melanogaster*

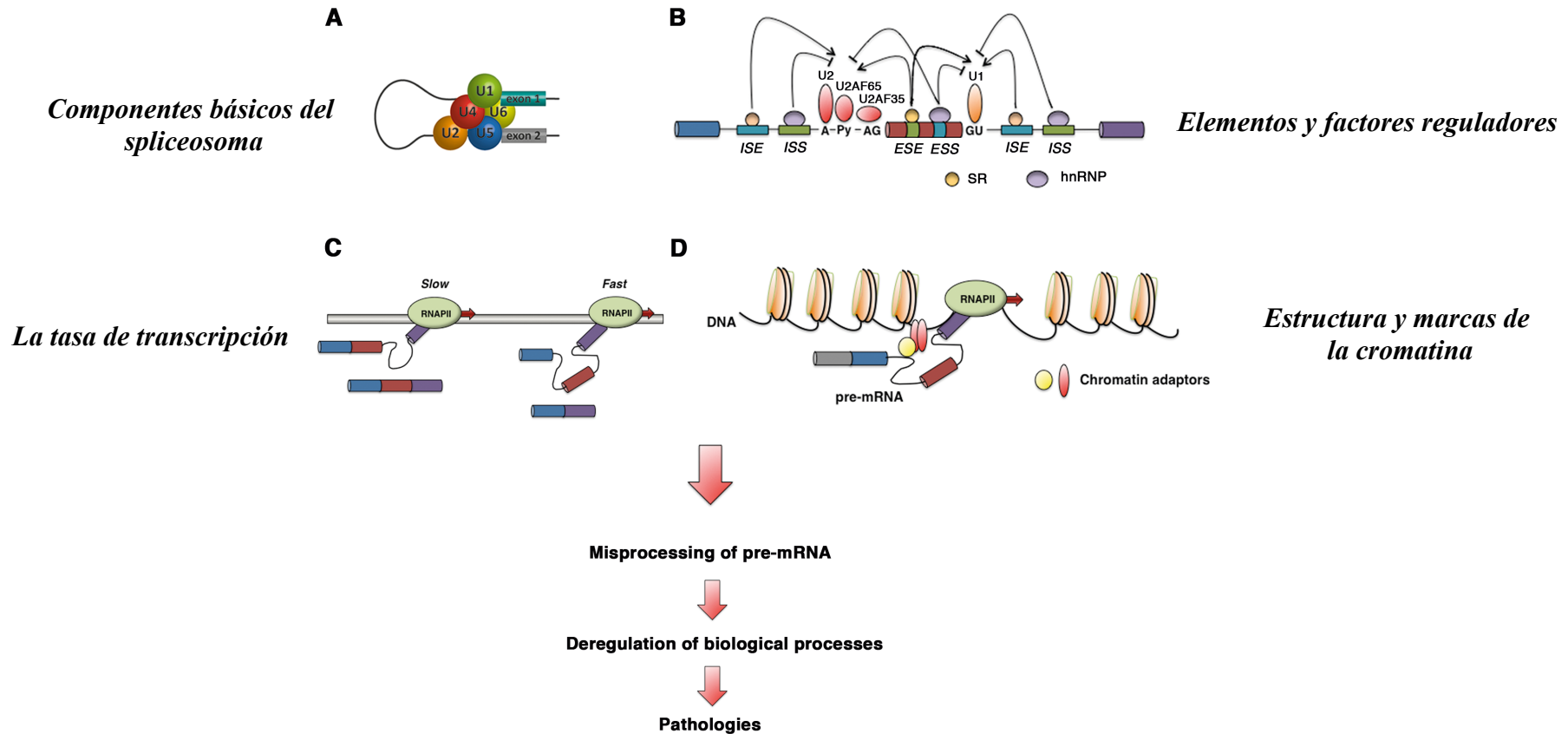


Splicing y enfermedad (15%) !!

≈ 95% de los genes multiexónicos experimentan splicing alternativo. La mala regulación de este mecanismo puede tener efectos graves y causar enfermedades

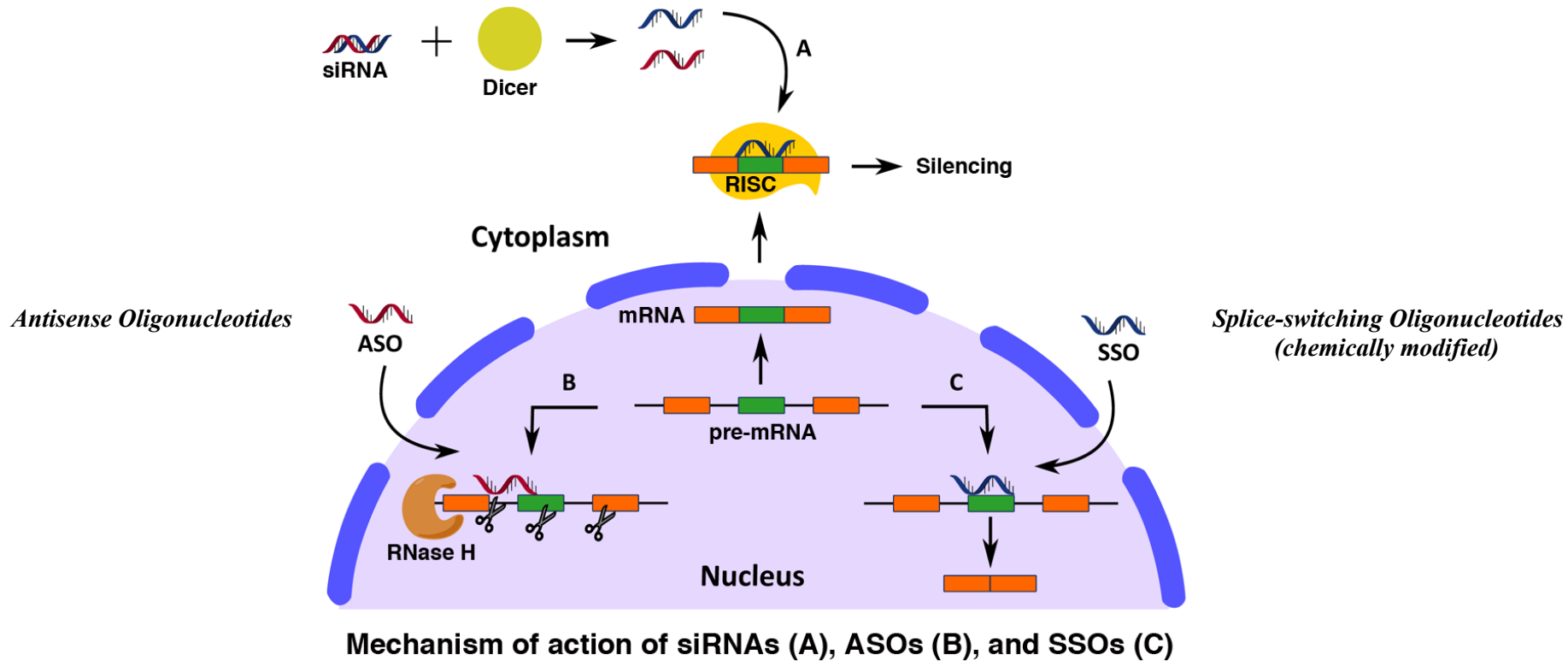
Hasta la fecha, se han identificado 20.879 (8,89%) mutaciones responsables de enfermedades hereditarias humanas con efectos en el splicing del ARNm (The Human Gene Mutation Database, HGMD, consultado en octubre de 2022)

El control defectuoso en el splicing del pre-ARNm conduce a enfermedades humanas



APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS

I. Oligonucleótidos antisentido (ASOs), Oligonucleótidos Splice-Switching (SSOs), y ARNs pequeños de interferencia (siRNAs)



Suñé-Pou et al., PMID: 32760425



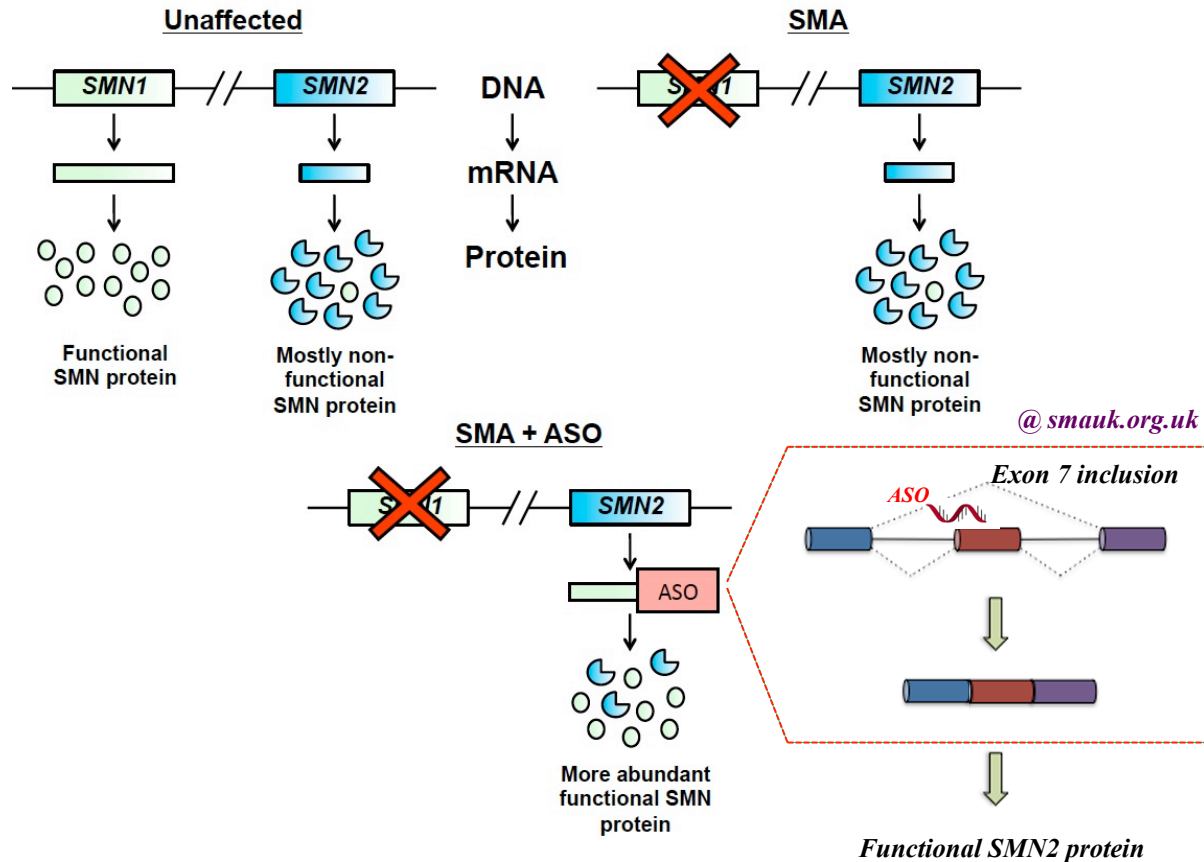
MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Fármacos basados en oligonucleótidos antisentido (ASOs)

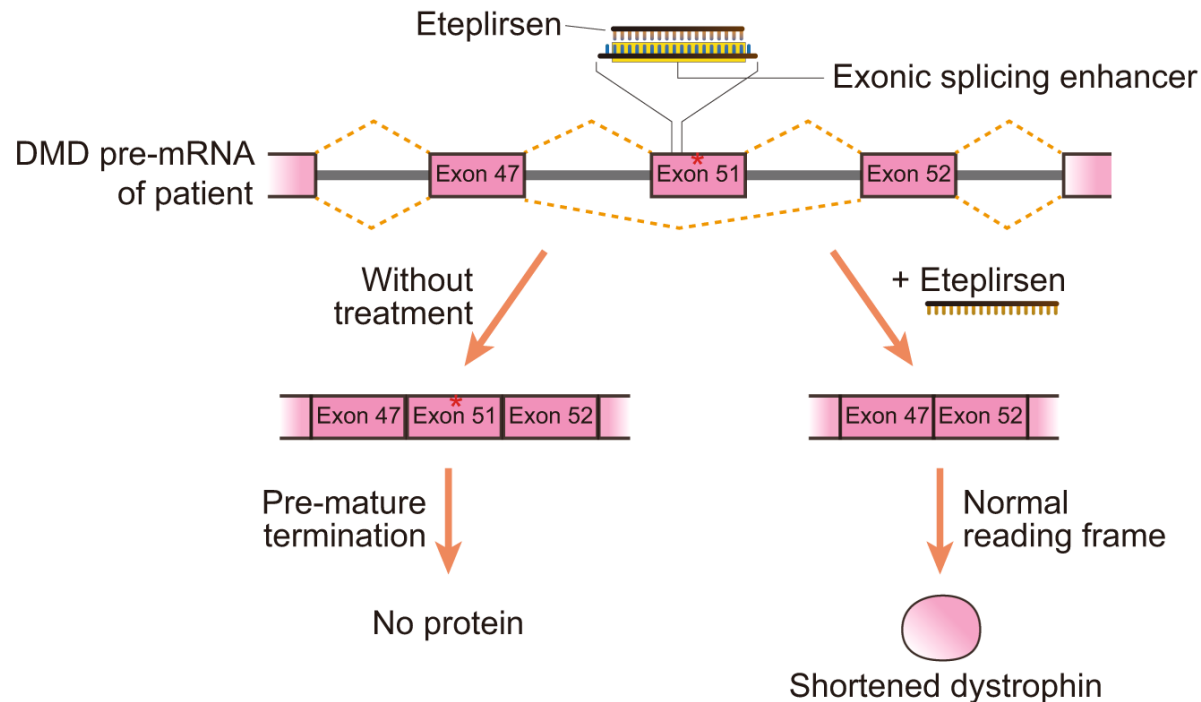
Nusinersen (Aprobado por la FDA, dic 2016; Ionis Pharmaceuticals/Biogen) es un fármaco **ASO** que se usa para tratar la **atrofia muscular espinal (SMA)** que bloquea la unión de factores de splicing al intrón 7 del pre-ARNm de **SMN2**, provocando la inclusión del exón 7 y generando una proteína SMA funcional (US\$ 750.000 por el primer año de tratamiento)



Adrian Krainer @ CSHL

Fármacos basados en oligonucleótidos antisentido (ASOs)

Eteplirsen and Golodirsen (aprobados por la FDA, sept 2016 y dic 2019; Sarepta Therapeutics) son fármacos basados en ASOs que se usan para tratar la **distrofia muscular de Duchenne (DMD)** que inducen la inclusión u omisión de un exón para producir una versión funcional de la proteína distrofina (US\$ 300.000 coste promedio por paciente/año)



Young-Kook Kim, PMID: 35440755



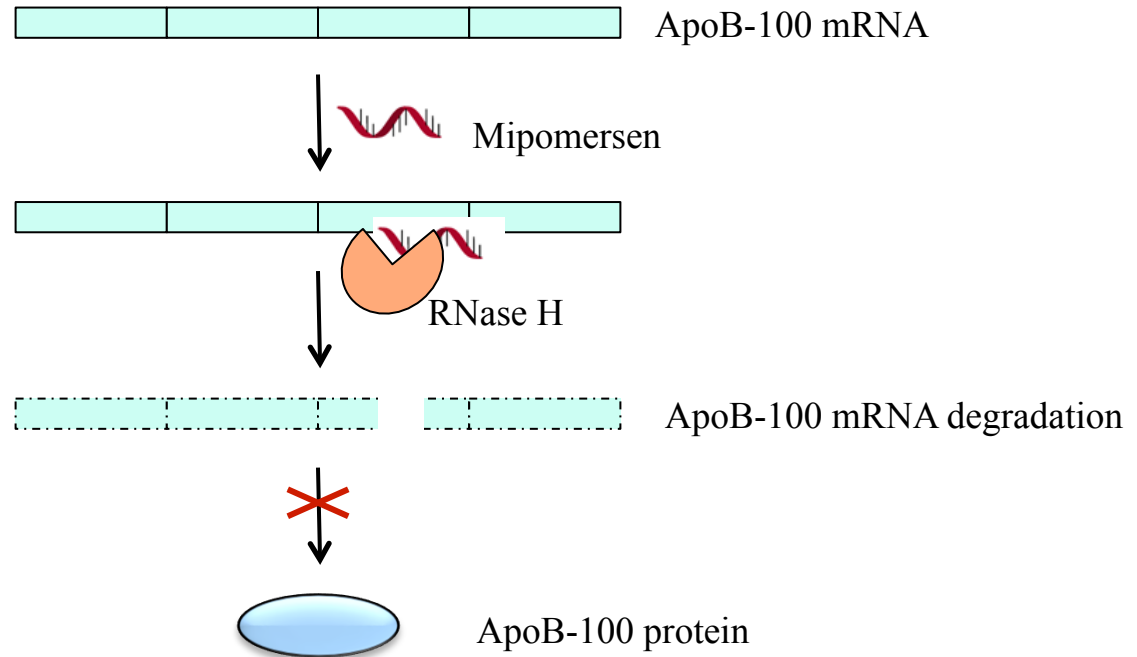
MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN

 **CSIC**
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Fármacos basados en oligonucleótidos antisentido (ASOs)

Mipomersen (aprobado por la FDA, ene 2013; Genzyme/Sanofi Aventis) es un fármaco **ASO** que se usa para tratar la **hipercolesterolemia familiar homocigótica (HoFH)** que induce la degradación del ARNm de apoB-100 (US\$ 300.000 coste promedio por paciente/año)



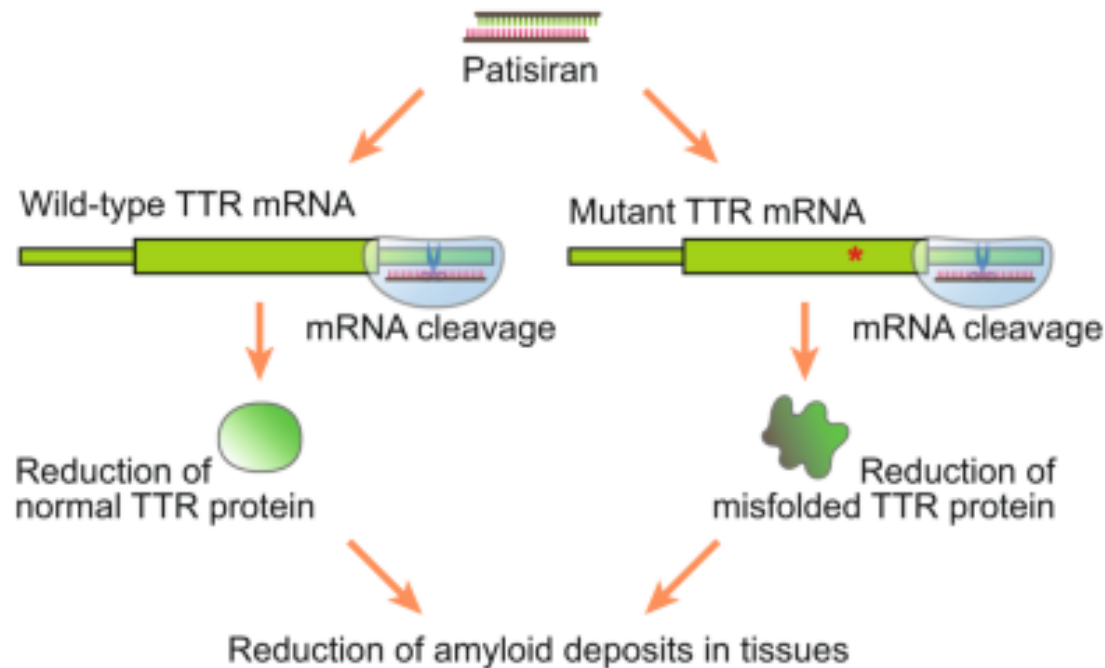
MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN

 **CSIC**
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Fármacos basados en ARNs pequeños de interferencia (siRNAs)

Patisiran (aprobado por la FDA, agosto 2018; Alynlam) es un fármaco de ARN interferente que se usa para tratar la amiloidosis mediada por transtirretina hereditaria (hATTR). El complejo Patisiran/RISC se une al extremo 3'UTR del ARNm de TTR para suprimir su expresión.
(US\$ 400.000 coste promedio por paciente/año)



Young-Kook Kim, PMID: 35440755



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN

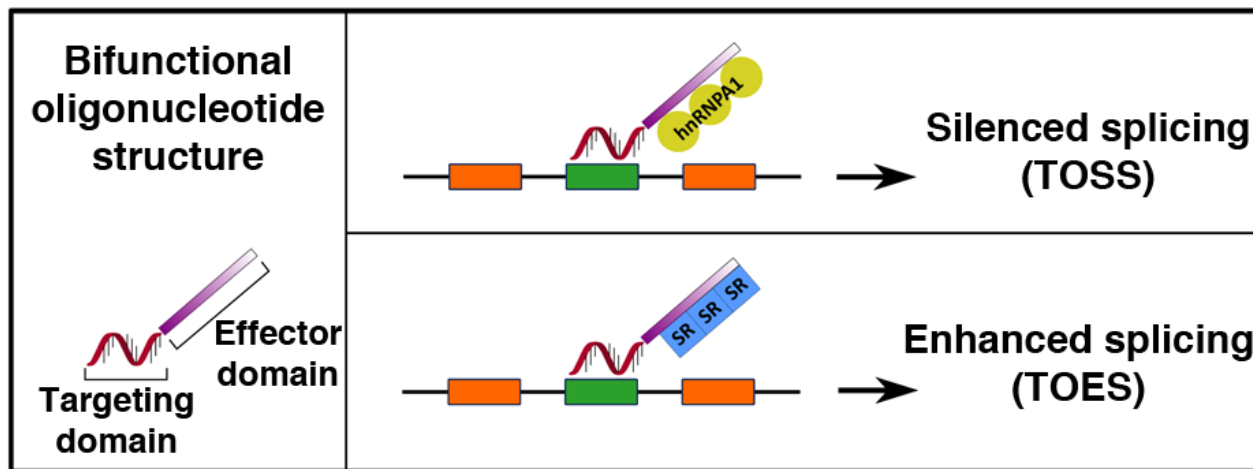
 **CSIC**
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS

II. Oligonucleótidos bifuncionales

Contienen dos partes: (i) una porción antisentido dirigida a una secuencia específica, y (ii) una cola no hibridante o dominio efector que recluta factores de splicing (oligonucleótidos potenciadores del splicing [TOES] u oligonucleótidos silenciadores del splicing [TOSS])

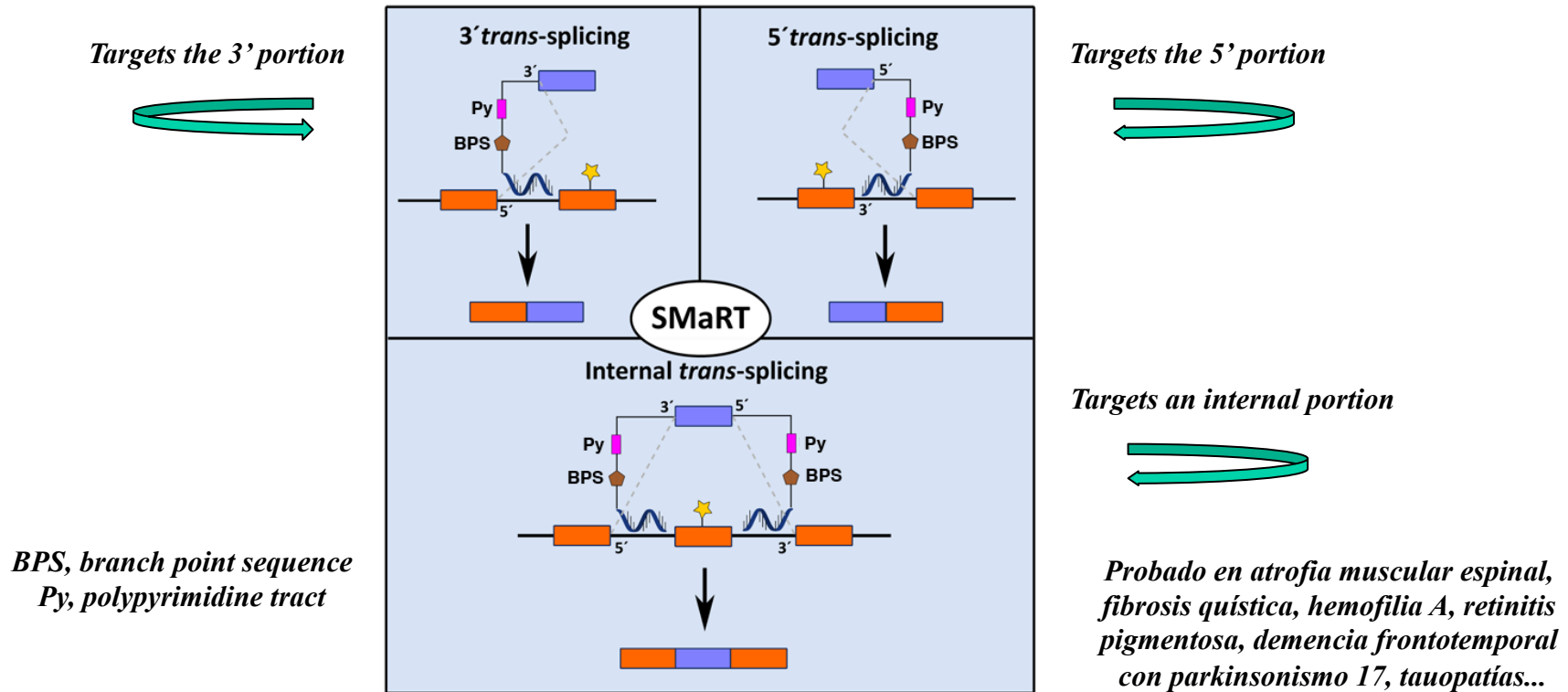


Probados en la atrofia muscular espinal (SMA)

APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS

III. SMaRT (Spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing)

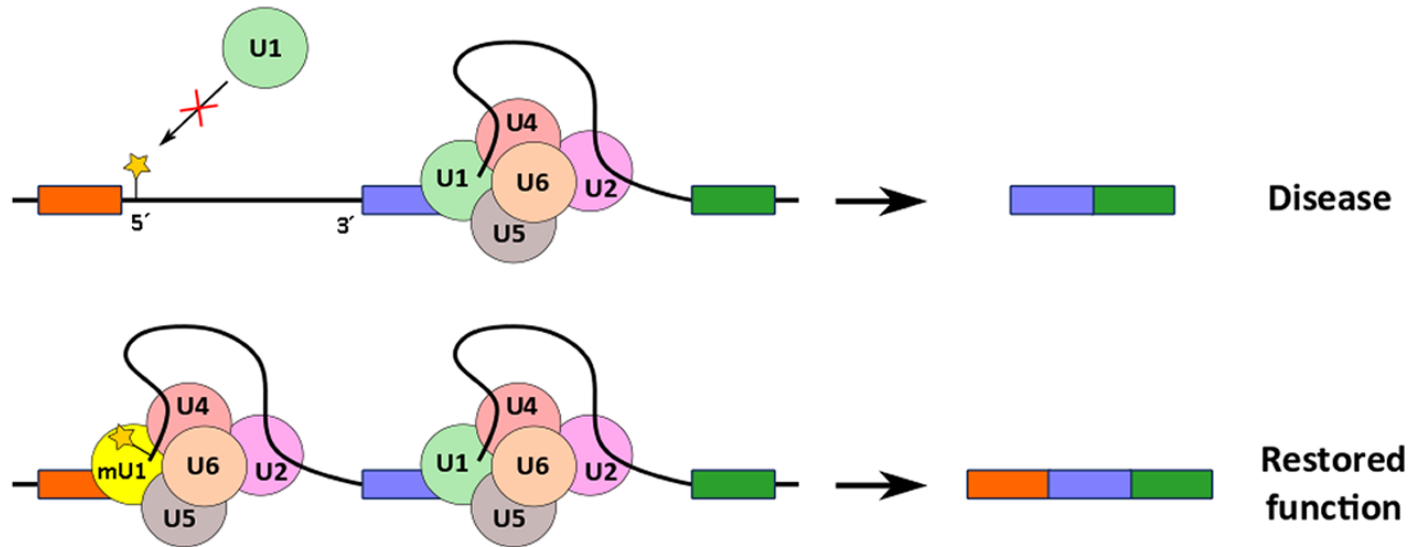
SMaRT es un sistema de reprogramación de genes basado en un proceso de splicing en *trans* que se puede utilizar para aplicaciones terapéuticas. La metodología de splicing en *trans* está diseñada para corregir un ARNm aberrante al reemplazar una secuencia codificante completa.



APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS

IV. snRNAs (small nuclear RNAs) modificados

Los U1 snRNA U1 específicos de exón son snRNA modificados complementarios a regiones intrónicas del sitio de splicing 5' que se pueden usar para eliminar la omisión de algunos exones causada por diferentes mutaciones



★ Mutation in the 5' SS of the intron

● Modified U1snRNA

Probado en atrofia muscular espinal, deficiencia de ATP8B1, síndrome de Sanfilippo tipo C, anemia de Fanconi, talasemia, hemofilia A, tirosinemia hereditaria tipo I...

Lista de fármacos basados en ARN aprobados por la FDA para su uso clínico

Category	Drug	Brand name	Approved year	Target molecule	Treatment result	Target disease
Antisense RNA (single-stranded RNA)						
	Fomivirsen	Vitravene	1998	IE2 mRNA	Binds to IE2 mRNA and blocks its translation	CMV retinitis
	Mipomersen	Kynamro	2013	ApoB mRNA	Binds to ApoB mRNA and induces its degradation by RNase H	Familial hypercholesterolemia
	Nusinersen	Spinraza	2016	SMN2 mRNA	Modulates the alternative splicing of SMN2 mRNA and increases the SMN protein level	Spinal muscular atrophy
	Eteplirsen	Exondys 51	2016	Dystrophin mRNA	Induces the exclusion of exon 51 of dystrophin mRNA during splicing to produce a functional protein	Duchenne muscular dystrophy
	Inotersen	Tegsedi	2018	Transthyretin mRNA	Binds to Transthyretin mRNA and induces its degradation by RNase H	Hereditary transthyretin amyloidosis
	Golodirsen	Vyondys 53	2019	Dystrophin mRNA	Induces the exclusion of exon 53 of dystrophin mRNA during splicing to produce a functional protein	Duchenne muscular dystrophy
Small interfering RNA (double-stranded RNA)						
	Patisiran	Onpattro	2018	Transthyretin mRNA	Suppresses the hepatic production of transthyretin protein through RNA interference	Hereditary transthyretin amyloidosis
	Givosiran	Givlaari	2019	ALAS1 mRNA	Reduces the hepatic production of ALAS1 protein through RNA interference	Acute hepatic porphyria
RNA aptamer						
	Pegaptanib	Macugen	2004	VEGF protein	Binds specifically to the 165 isoform of VEGF and blocks its function	Age-related macular degeneration

Terapias de ARN en ensayos clínicos activos:

ASOs, 16; siRNAs, 8; mRNAs, 203

Información disponible en ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov>), diciembre de 2022

LIBERACIÓN DEL FÁRMACO

La liberación de fármacos basados en ARN sigue siendo uno de los mayores desafíos para este tipo de terapias.

Debido a que el ARN es inestable, requiere vehículos de distribución para evitar la degradación.

La aparición de nuevas terapias basadas en ARN ha provocado una gran investigación en sistemas apropiados para la administración controlada de estos agentes terapéuticos.

Viral methods

Adenovirus/adeno-associated virus (AAV)

Advantage: high transfection efficiency

Disadvantages: high immunogenicity, insertional mutagenesis, viral integration...

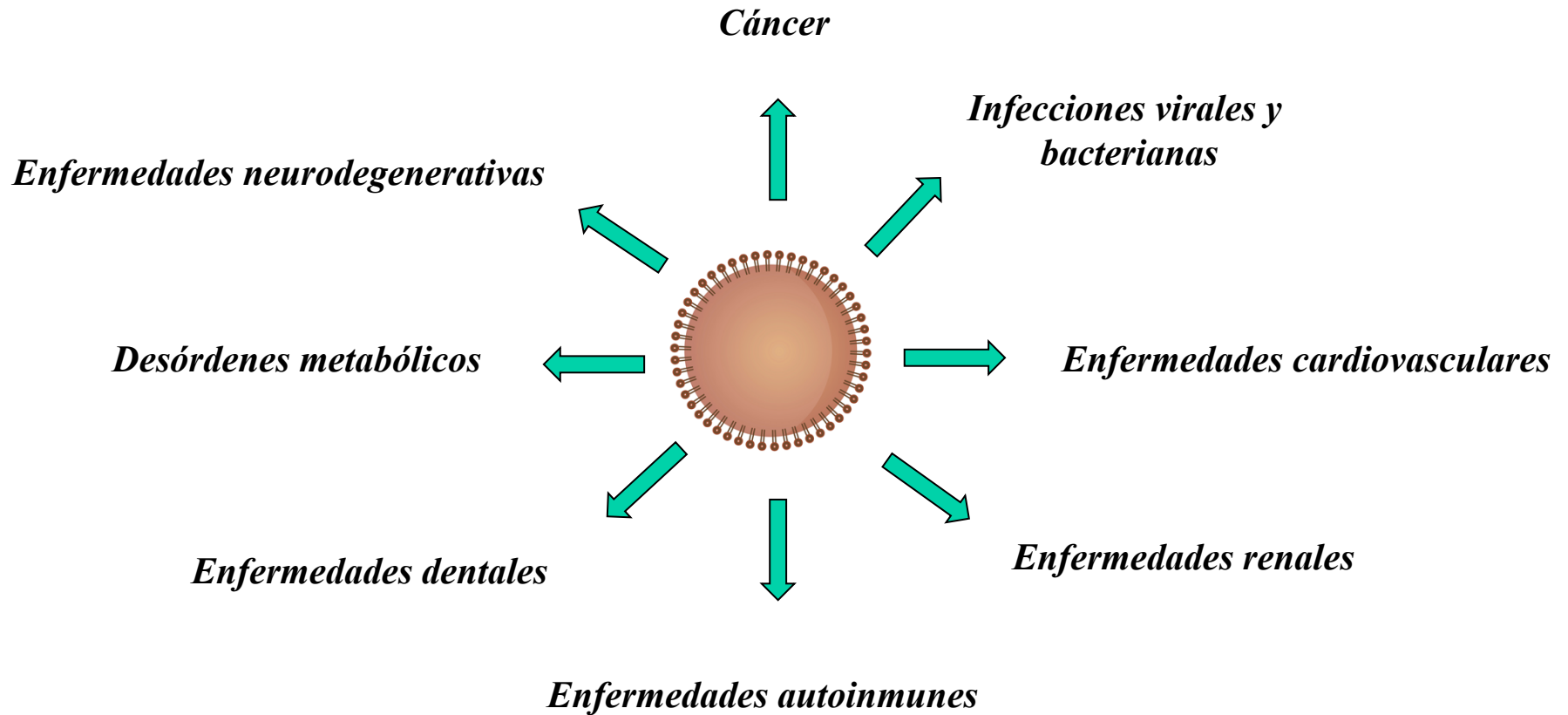
Non-viral methods

Nanoparticle-mediated delivery

Advantages: weak immunogenicity, lack of integration and absence of potential for viral recombination → **improved safety**

Disadvantages: low transfection efficiency

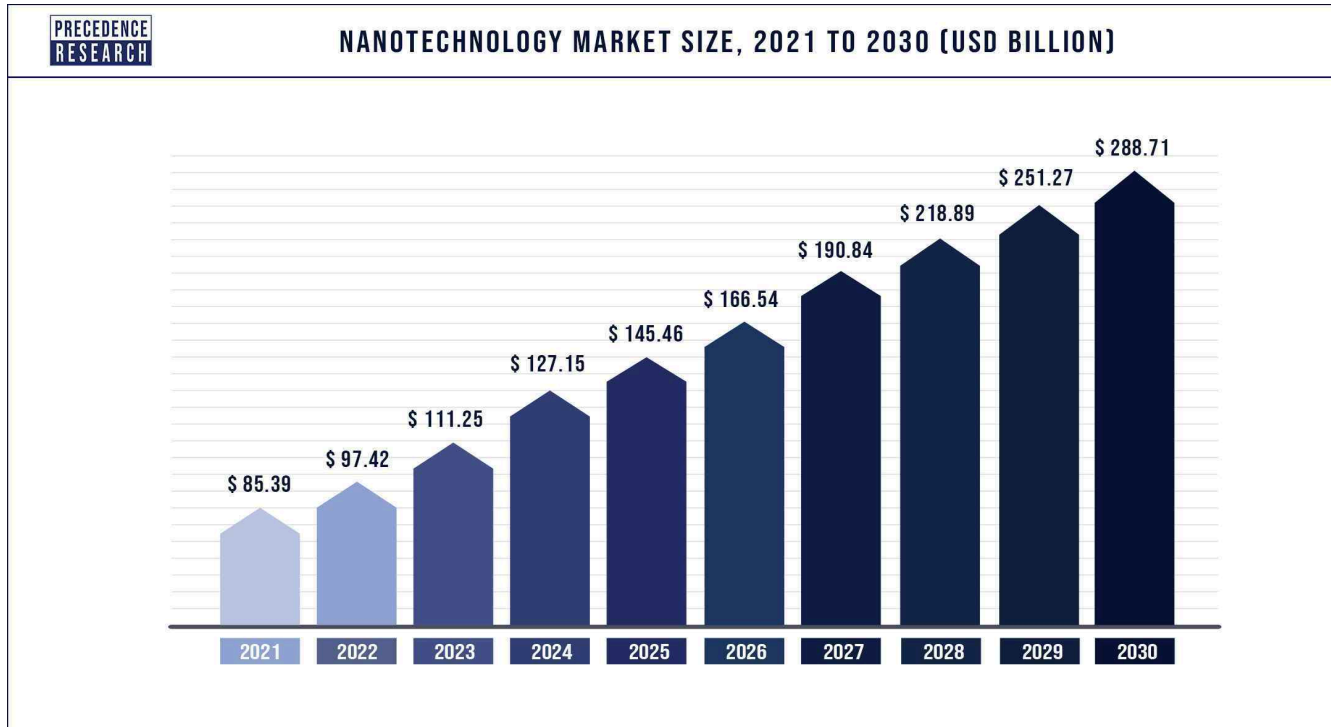
291 ensayos clínicos activos usando nanopartículas
Información disponible en ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov>), diciembre 2022



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



Mercado global de la nanotecnología



[/www.precedenceresearch.com/](http://www.precedenceresearch.com/)



Leading country in
Nanotechnology market

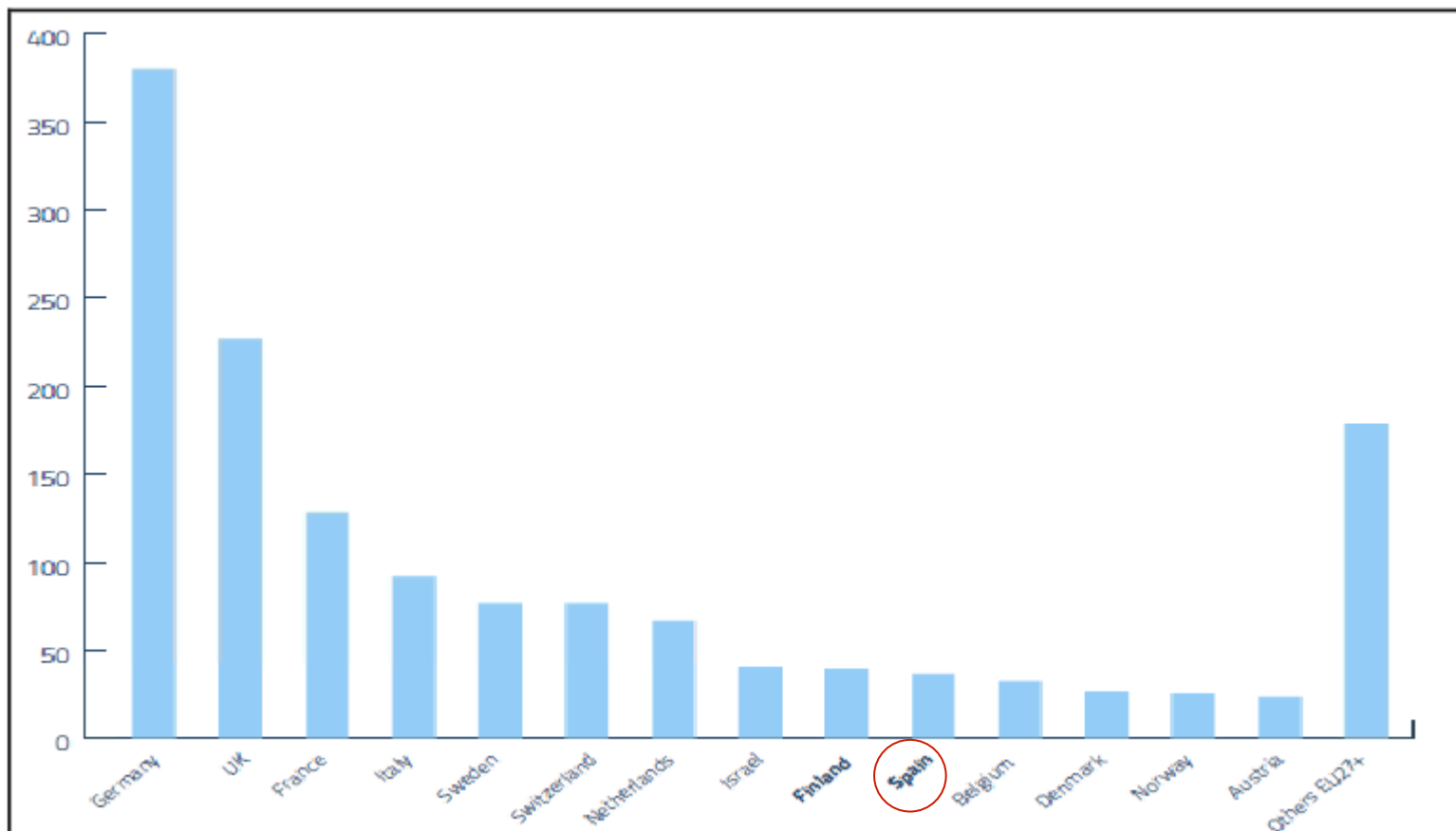


MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



US
1116

Número de empresas de nanotecnología en la industria europea por país



*Horizon 2020: Key Enabling Technologies (KETs), Booster for European Leadership in the Manufacturing Sector.
Report number: IP/A/ITRE/2013-01
Affiliation: Commissioned by: European Parliament, ITRE Committee*



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



Perspectivas futuras de las terapias basadas en el ARN

El desarrollo de varios fármacos basados en el ARN en el tratamiento de diversas enfermedades abre la posibilidad de tratar enfermedades para las cuales no existe o es muy complicado su tratamiento

Además, el rápido desarrollo de eficientes vacunas basadas en el ARN destaca su utilidad en el tratamiento de enfermedades infecciosas

Aunque la administración de fármacos basados en el ARN en las células sigue siendo un gran desafío, los recientes avances en los vehículos de administración de ARN evitan parcialmente este problema

Las terapias basadas en el ARN tienen un gran potencial para convertirse en una herramienta muy valiosa en el futuro de la medicina

