



Facultad de **Medicina**

# **GRADO EN MEDICINA**

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

**Nuevas terapias basadas en oligonucleótidos  
antisentido**

**New therapies based on antisense oligonucleotides**

**Autora: Marta González Manzano**

**Directores:**

**Mónica López Fanarraga  
Andrés Ramos Valle**

**Santander, junio 2024**

## Índice

RESUMEN .....	3
ABSTRACT .....	4
1 INTRODUCCIÓN .....	5
2 LA TERAPIA GÉNICA .....	6
2.1 Definición, objetivos y tipos .....	6
2.2 Tipos de ácidos nucleicos empleados en la terapia génica .....	7
3 LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO COMO AGENTES TERAPÉUTICOS.....	10
3.1 Introducción a las terapias basadas en oligonucleótidos sintéticos y los ASOs.....	10
3.2 Modificaciones químicas para mejorar las propiedades de los oligonucleótidos .....	11
3.3 Barreras biológicas y “delivery” .....	14
3.4 Dianas y mecanismos de acción de los oligonucleótidos terapéuticos.....	16
4 SISTEMAS DE TRANSPORTE DE OLIGONUCLEÓTIDOS TERAPÉUTICOS .....	20
4.1 Vectores como vía de transporte en la terapia génica: vectores virales y no virales .	20
4.2 Sistemas no virales para el transporte de oligonucleótidos .....	22
4.2.1 Los polímeros como vectores no virales.....	22
4.2.2 El transporte de ácidos nucleicos con lípidos .....	24
4.2.3 Sistemas de transporte basados en péptidos .....	26
4.2.4 Aptámeros y anticuerpos como vehículos no virales.....	28
5 EL PAPEL DE LAS NUEVAS TERAPIAS BASADAS EN ASOs EN LAS ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES Y SU APLICACIÓN DE LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE .....	28
5.1 La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) .....	29
5.1.1 Los avances que ha conseguido la terapia génica en el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). .....	31
6 CONCLUSIONES.....	36
7 BIBLIOGRAFÍA .....	37



## RESUMEN

En los últimos años, el desarrollo de la terapia génica y otros campos de la medicina ha dado lugar a la aparición de nuevas terapias prometedoras que tienen como objetivo tratar enfermedades genéticas consideradas con intratables hasta la fecha. Entre estas, se encuentran las nuevas terapias basadas en oligonucleótidos antisentido (ASOs). Los ASOs están constituidos por cadenas cortas de ácidos nucleicos dirigidos de manera específica al ARN mensajero con el objetivo de interferir en la expresión genética del individuo. En su camino, estas partículas deben atravesar distintas barreras biológicas llegando así a su diana de manera eficaz. Para que esto sea posible, se han desarrollado sistemas de transporte eficientes basados en vectores virales y no virales. Además, estos oligonucleótidos pueden ser sometidos a distintas modificaciones químicas con el objetivo de optimizar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, facilitando así su transporte. En el presente trabajo de fin de grado se analizará en profundidad los conceptos relacionados con los oligonucleótidos terapéuticos, las nuevas terapias basadas en éstos y las estrategias para su desarrollo. Finalmente, se analizarán los productos basados en ASOs aprobados hasta la fecha para tratar la Distrofia Muscular de Duchenne, una enfermedad neuromuscular genética grave causada la falta o anomalías en la proteína distrofina.

## ABSTRACT

In recent years, developments in gene therapy and other fields of medicine have led to the emergence of promising new therapies aimed at treating genetic diseases previously considered untreatable. Among these are the new therapies based on antisense oligonucleotides (ASOs). ASOs are made up of short chains of nucleic acids that specifically target messenger RNA with the aim of interfering with the individual's gene expression. On their way, these particles must cross various biological barriers to reach their target effectively. To make this possible, efficient transport systems based on viral and non-viral vectors have been developed. Moreover, these oligonucleotides can be subjected to different chemical modifications in order to optimise their physicochemical and biological properties, thus facilitating their transport. This thesis will analyse in depth the concepts related to therapeutic oligonucleotides, the new therapies based on them and the strategies for their development. Finally, products based on ASOs approved to date to treat Duchenne Muscular Dystrophy, a severe genetic neuromuscular disease caused by a lack of or abnormalities in the dystrophin protein, will be discussed.

# 1 INTRODUCCIÓN

La terapia génica es un campo innovador de la medicina que, mediante la modificación en la expresión de genes, la introducción de material genético o la corrección de genes anómalos en las células de un individuo trata enfermedades genéticas. En los últimos años, la terapia génica ha experimentado grandes avances que han permitido tratar de manera más individual y personalizada enfermedades que hasta el momento solo disponían de tratamiento sintomático. Abordan la enfermedad a nivel genético gracias a la comprensión de los mecanismos que subyacen la enfermedad y al desarrollo de técnicas para transferir el material genético de manera eficiente.

Siguiendo esta estrategia aparecen las terapias basadas en oligonucleótidos antisentido (*antisense-oligonucleotides* o ASOs), centradas en modificar o inhibir la expresión genética a nivel del ARN mensajero. Los ASOs están formados por secuencias cortas de ácidos nucleicos sintéticos, modificados químicamente, dirigidos de manera específica y complementaria al ARNm diana. La acción terapéutica se genera bloqueando la traducción de proteínas específicas, modificando el empalme de ARN (*splicing*) o induciendo la degradación del ARNm. Los oligonucleótidos sintéticos que se emplean están constituidos por pequeñas cadenas de nucleótidos con modificaciones químicas.

Para que estas terapias sean efectivas, es necesario el desarrollo de sistemas de transporte capaces de entregar el material genético de manera segura y eficaz al lugar terapéutico deseado. Los vectores virales son los vehículos más comúnmente usados con la capacidad de infectar y transferir su material genético a la célula. También se utilizan vehículos no virales como lípidos, nanopartículas inorgánicas o polímeros que encapsulan y protegen el material genético, transportándolo a su diana de manera más segura.

Las terapias basadas en ASOs han demostrado gran eficacia frente al cáncer, las enfermedades neuromusculares, neurodegenerativas, hematológicas o inmunológicas. Las enfermedades neuromusculares (ENM) son un grupo amplio de patologías hereditarias, con una base genética compleja, las cuales carecen de terapias efectivas. En los últimos años, las terapias basadas en oligonucleótidos antisentido han demostrado utilidad para tratar ciertas ENM, entre las que se encuentra la Distrofia Muscular de Duchenne. Actualmente, podemos encontrar en el mercado cuatro fármacos aprobados por la FDA basados en ASOs para tratar esta compleja enfermedad: Eteplirsen, Golodirsen, Viltolarsen y Casimersen.

En este trabajo de fin de grado, se desarrollarán aspectos generales de la terapia génica, las nuevas terapias basadas en ASOs, así como de otros tipos de oligonucleótidos terapéuticos. Se revisarán los sistemas de direccionamiento, así como de transporte y las distintas modificaciones químicas que han permitido el desarrollo eficaz de estas terapias. Finalmente, se desarrollará un apartado dedicado a la aplicación de las terapias basadas en ASOs en el tratamiento de la ENM y a los fármacos aprobados por la FDA para tratar la Distrofia Muscular de Duchenne.

**Palabras clave:** terapia génica, vectores virales y no virales, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos sintéticos, enfermedades neuromusculares, Distrofia Muscular de Duchenne.

## 2 LA TERAPIA GÉNICA

### 2.1 Definición, objetivos y tipos

La FDA (*Food and Drug Administration*) define la terapia génica como “una técnica que busca modificar o manipular la expresión de un gen o alterar las propiedades biológicas de células vivas para el uso terapéutico, con el fin de curar o tratar una enfermedad”.

El desarrollo histórico de la terapia génica ha evolucionado a lo largo del tiempo, marcado por hitos significativos que han contribuido al entendimiento y aplicación de esta innovadora rama de la medicina (Figura 1).<sup>1</sup> Frederick Griffith fue un bacteriólogo británico que en 1928 publicó un informe conocido como "Experimento de Griffith", en el cual se describe la transformación de una cepa de *Streptococo Pneumoniae* no virulento en virulento. En este estudio, Griffith mezcló una cepa viva virulenta con una cepa inactiva no virulenta de *Streptococo Pneumoniae* e infectó a un ratón con esta mezcla. Griffith observa como el ratón fallece consecuencia de una neumonía y es capaz de aislar una cepa de *Streptococo Pneumoniae* virulenta de la sangre del ratón.<sup>2</sup> Tatum y Joshua Lederberg describieron en 1947 el mecanismo de transformación para transmitir el material genético. Posteriormente, en 1952 y 1958, Lederberg describió dos mecanismos adicionales de transmisión de material genético en bacterias, la transducción y la conjugación.<sup>3</sup> El biotecnólogo, médico y profesor Szybalski documenta por primera vez evidencias de herencia genética en células eucariotas en 1962. Szybalski demostró que un déficit genético podía repararse transfiriendo DNA no anómalo desde otra fuente externa. Adicionalmente, demostró que este gen transferido podía transmitirse a las células hijas originando un fenotipo similar a la célula progenitora modificada.<sup>4</sup> Años después, en 1968, Rogers y Pfuderer aportan la primera prueba de transferencia de genes mediada por virus. En 1990 se produce el primer intento de terapia génica con ADN recombinante para tratar pacientes con  $\beta$ -talasemia. Ese mismo año, la FDA aprueba el primer ensayo clínico en humanos, llevado a cabo en niños con deficiencia de adenosina desaminasa (SCID-ADA), una enfermedad monogénica que causa una grave inmunodeficiencia. Estos niños fueron tratados con leucocitos extraídos de su sangre y modificados *ex vivo* con el objetivo de expresar con normalidad el gen codificante de la adenosina desaminasa.<sup>5</sup> En el año 2003, China aprueba el primer producto de terapia génica para uso clínico llamado Gendicine, un adenovirus no replicativo empleado en el tratamiento de carcinoma escamoso de cabeza y cuello.<sup>6</sup> Otro evento destacable, se produce en 2012 cuando la EMA (European Medicines Agency) recomienda por primera vez un producto de terapia génica, Glybera, para el tratamiento de la deficiencia de lipoproteína lipasa hereditaria.<sup>7</sup>

En la última década se está trabajando en una nueva generación de tratamientos basados en la edición genómica, un nuevo enfoque que permite la corrección de la secuencia genómica agregando, cortando y reparando ciertas regiones de DNA anómalo. El primer éxito con esta técnica se produce en 2019, permitiendo el desarrollo de tratamientos para la anemia falciforme y betatalasemia a partir de la herramienta de edición genómica CRISPR-Cas.<sup>8,9</sup>

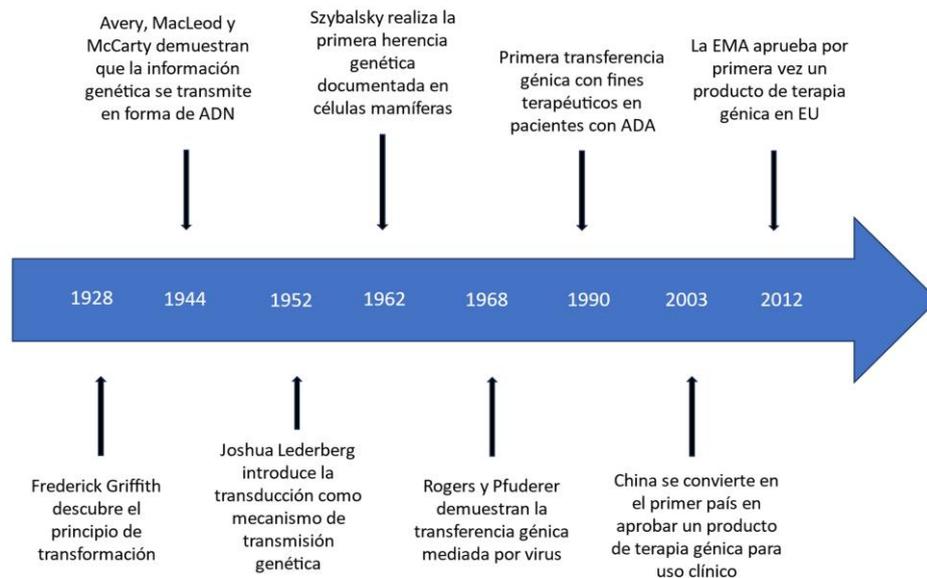


Figura 1. Cronología de algunos hitos importantes de la terapia génica.<sup>2</sup>

En los últimos 10 años, se han realizado más de dos mil ensayos clínicos que han permitido desarrollar tratamientos exitosos frente a una gran variedad de enfermedades con origen genético como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, hematológicas o inmunológicas. Actualmente el cáncer está a la cabeza de las enfermedades tratadas con terapia génica. Los vectores más empleados en estos ensayos son los adenovirus, retrovirus y plásmidos desnudos.<sup>10</sup>

Las dos principales estrategias empleadas en terapia génica son la *downregulation* o inhibición de la expresión de un gen patológico y la *upregulation* que promueve la expresión de un gen reparador. Una tercera estrategia se basa en la introducción de un gen codificante para una proteína exógena terapéutica que genera inmunogenicidad. Esta última alternativa, se utiliza en algunas vacunas, como las vacunas mRNA frente al SARS-CoV-213.<sup>11</sup>

El proceso de desarrollo de una terapia génica consta de una primera parte donde se identifica y estudia el gen responsable de la enfermedad genética junto con las distintas estrategias para tratarlo (*upregulation* o *downregulation*, por ejemplo). En una segunda fase, se diseña el ácido nucleico junto con las modificaciones químicas adaptadas a la vía de administración y a la diana del tratamiento.<sup>11</sup>

## 2.2 Tipos de ácidos nucleicos empleados en la terapia génica

Los cambios que ha experimentado en los últimos años la nanomedicina, junto con los avances de las herramientas de edición, análisis y secuenciación genómica, han permitido el empleo de ácidos nucleicos para desarrollar nuevos tratamientos frente a un amplio rango de enfermedades genéticas. Esto ha supuesto un cambio significativo, ya que con anterioridad sólo se disponía de tratamientos sintomáticos para estas enfermedades. Para que la carga genética llegue a su diana final es necesario desarrollar un sistema de transporte y biodistribución seguro y selectivo debido a la baja estabilidad de los ácidos nucleicos y el riesgo de posibles efectos “*off-target*”. En su camino deben superar diversas barreras

biológicas: las membranas primarias como barreras endoteliales o barrera hematoencefálica y el paso a través de la membrana plasmática y la membrana nuclear. Adicionalmente, estos sistemas de transporte deben proteger a los ácidos nucleicos de su degradación frente a las nucleasas o células del sistema inmune. Por ello, el diseño del vector, la selección adecuada de la vía de administración las propiedades fisicoquímicas de las partículas, así como sus propiedades biológicas son clave: el tamaño del vector, naturaleza, carga y modificaciones químicas.<sup>11</sup>

Los **plásmidos y moléculas de DNA circulares** son largas moléculas de ADN de doble cadena con morfología circular cuya actividad tiene lugar en el núcleo celular. Suelen tener un tamaño de 2 a 10 kilobases (kb). Estas moléculas deben entrar en el núcleo y una vez allí serán transcritas de manera independiente gracias a su capacidad para expresar proteínas y RNA reguladores, dando lugar así a la expresión del transgén que portan para reestablecer una función o desarrollar una respuesta inmune. En suero, su vida media es de sólo 10 -20 minutos, pero algunos preparados pueden permanecer activos dentro de las células durante meses o años en el núcleo de forma episódica. Un sistema eficaz para su administración terapéutica es mediante liposomas o complejos lipídicos, siendo además baratos, sencillos, seguros y rápidos. Los principales riesgos que tienen asociado son la introducción de una mutación por recombinación con DNA celular y la oxidación por radicales libres. De esta manera la adición de EDTA, quelantes de iones, eliminadores radicales libres, la deshidratación o la liofilización pueden ser posibles soluciones.<sup>12</sup>

Los **RNA mensajeros (mRNA) y replicones de RNA** son moléculas de RNA monocatenario largo, de longitud similar a los plásmidos, cuya actividad tiene lugar a nivel del citosol expresando, sin interferir en el genoma, una proteína que reestablece una función o genera una respuesta inmune. El mRNA es monocatenario con una cabeza 5', una cola poli(A) de 3' y un marco de lectura abierto que le permite ser procesado de manera natural por las células eucariotas. Generalmente, los replicones son de mayor tamaño (>10kb) e incluyen una secuencia de genes y una replicasa no estructural que le da la capacidad de autorreplicarse y ampliar la duración de la expresión de la proteína. Su vida media en suero es de apenas unos segundos, pero dentro de la célula pueden sobrevivir durante horas o días. Además, son ácidos nucleicos bastante inestables cuya eficiencia puede verse afectada por estructuras secundarias. Para solucionar esta inestabilidad y su corta vida media son necesarias modificaciones químicas del esqueleto cuyas principales dianas son la cabeza 5', las UTR 3' y 5', la región codificante y la cola de poli(A). Una ventaja que presentan respecto a los anteriores es que no pueden recombinarse con el DNA celular, disminuyéndose así el riesgo de inducir mutaciones. Otra de sus características es que las células inmunitarias tienen una alta sensibilidad para reconocer los antígenos codificados por estos mRNA por lo que su uso en la terapia de enfermedades infecciosas y en el desarrollo de vacunas es prometedor.<sup>13</sup>

Los **reguladores cortos de RNA: "short interfering RNA" (siRNA) y microRNA (miRNA)** se emplean también en terapia génica. Son fragmentos cortos bicatenarios de RNA no codificante de 21-22 bp. De manera global, los microRNA participan en el silenciamiento del RNA y en la regulación postranscripcional de la expresión génica. Los siRNA interfieren en la expresión de un gen mediante su unión con el ARN mensajero complementario, ambos pueden actuar tanto en el núcleo como a nivel del citosol. En el núcleo, el siRNA induce metilaciones en el DNA que tienen como resultado silenciamientos de larga duración mientras que el miRNA induce reorganizaciones en la cromatina. A nivel del citosol se dice

que el siRNA tiene mayor eficacia, este dirige al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) a mRNA específicos para su degradación. El miRNA regula la estabilidad y transcripción del mRNA. Ambas moléculas tienen una vida media de en el suero de minutos, dentro de las células pueden llegar a sobrevivir días. Esta vida media, así como su estabilidad y eficacia pueden aumentarse mediante modificaciones químicas en su composición, como pueden ser las metilaciones, modificación con pirimidinas 2'-F para aumentar la resistencia a las nucleasas, conjugación con nanopartículas o lípidos o la eliminación de secuencias inmunoestimuladoras como las "secuencias U-rich". También se sabe que el empleo de siRNA a dosis altas puede adaptar al sistema inmune innato y la producción de citoquinas.<sup>14</sup>

Las **DNAzimas, RNAzimas y MNAzimas** son ácidos nucleicos cortos, de aproximadamente 50-150 nucleótidos, formados por una única cadena de RNA, DNA o múltiples cadenas (MNAzimas). Presentan estructuras secundarias complicadas y actividad enzimática de tipo nucleasa sitio-específica que actúan tanto a nivel del citosol como del núcleo. Mediante modificaciones químicas y combinaciones *in-vitro*, como la introducción de varios nucleótidos modificados a través de PCR o la escisión del cebador, se han obtenido DNAzimas interesantes con propiedades de unión a metales o actividad independiente de metales para la escisión selectiva de RNA y con otras numerosas aplicaciones bioquímicas.<sup>15</sup>

Los **oligonucleótidos antisentido (ASOs)** son moléculas que están formadas por una secuencia corta (10-30 nucleótidos) monocatenaria de DNA, RNA o análogos que se unen a un mRNA impidiendo que este sea traducido en su proteína correspondiente responsable de la enfermedad. Los ASOs tienen la capacidad de inducir una isoforma específica en el mRNA, formar dúplex DNA-RNA que impiden la traducción y finalmente degradar el mRNA mediante una ribonucleasa H (Figura 2). También pueden bloquear esta traducción del mRNA mediante impedimento estérico. Al igual que los siRNA y miRNA, pueden actuar tanto en el núcleo como en el citosol, siendo más efectivos a nivel nuclear. Su vida media y otras características vienen marcadas por su estructura química, por lo que se han desarrollado una gran variedad de modificaciones químicas que permiten mejorar su estabilidad, eficacia y su capacidad de penetración celular. Algunas de ellas son el cambio del enlazador fosfodiéster (PO) por fosforioato (PS), la protección del grupo 2'-hidroxilo de la ribosa con metilo o metoxietilo o la sustitución directa con flúor (2'-fluoro), la conexión de 2'-O y 4'-C con un puente de metileno, entre otras. Además, ligandos específicos pueden unirse covalentemente a los ASO (también a los siRNA o miRNA, entre otros), para lograr un silenciamiento génico órgano o célula específica.<sup>17</sup>

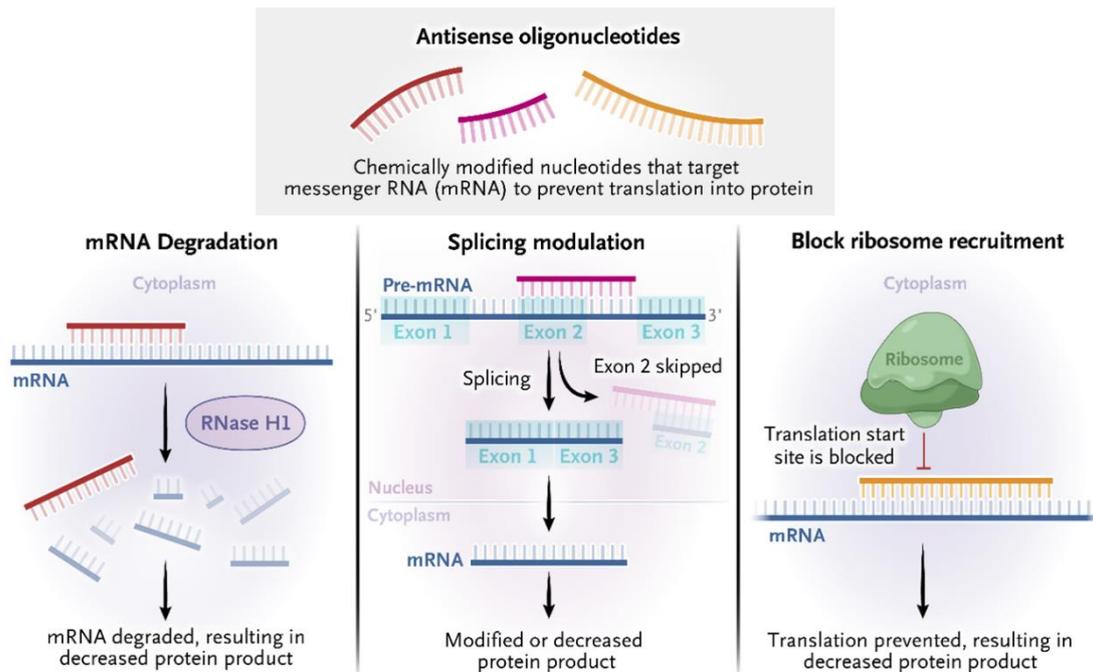


Figura 2. Descripción de las aplicaciones y mecanismos de acción de los oligonucleótidos antisentido (ASOs).<sup>16</sup>

### 3 LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO COMO AGENTES TERAPÉUTICOS

#### 3.1 Introducción a las terapias basadas en oligonucleótidos sintéticos y los ASOs

Las nuevas terapias con oligonucleótidos antisentido (ASOs) conforman uno de los campos pioneros de la biotecnología y medicina actual. Los tratamientos con ASOs están diseñadas para que los oligonucleótidos interactúen de manera específica y complementaria con el ARNm, inhiban su expresión y modulen así la expresión génica. Estas terapias están permitiendo tratar enfermedades de origen genético que hasta el momento eran consideradas inabarcables desde el punto de vista terapéutico.<sup>17</sup> Esta innovadora modalidad terapéutica se engloba dentro de un amplio grupo de terapias cuyo desarrollo ha sido posible gracias a los oligonucleótidos sintéticos (ONs).<sup>18</sup>

Los oligonucleótidos sintéticos son pequeñas cadenas de DNA mono o bicatenarias constituidas con ácidos nucleicos modificados (Figura 3), que abarcan un amplio rango de aplicaciones terapéuticas con distintos mecanismos de acción. La FDA, la EMA (European Medicines Agency) y el Ministerio de Sanidad Japonés han aprobado hasta la fecha 18 fármacos basados en ONs, entre los que se incluyen productos formados a partir de ASOs. El desarrollo de estas terapias se encuentra todavía en las etapas iniciales, siendo la mejora y aparición de nuevas aplicaciones clínicas algunos de los principales retos con los que nos encontramos. La investigación actual de nuevas estrategias como la introducción de modificaciones químicas, la modulación de las propiedades biológicas de las moléculas o un sistema de transporte eficaz permite abordar los objetivos y retos planteados.<sup>19</sup>

## EJEMPLOS DE OLIGONUCLEÓTIDOS

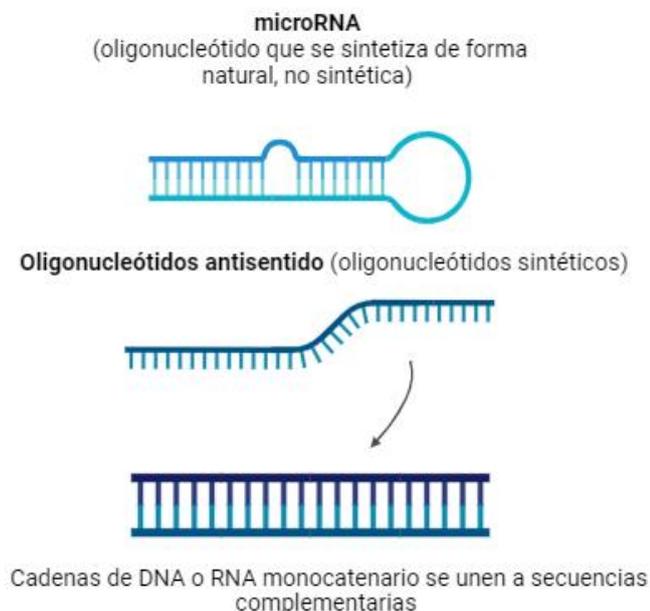


Figura 3. Representación de un oligonucleótido sintético (ONs), pequeñas cadenas de DNA modificadas que abarcan muchos tipos de terapias basadas en ácidos nucleicos, incluyendo el microRNA o los ASOs.<sup>20</sup>

### 3.2 Modificaciones químicas para mejorar las propiedades de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos antisentido se pueden modificar químicamente de distintas maneras (Figura 4). Cada uno de estos cambios confiere a la molécula nuevas propiedades que mejoran su estabilidad, biodisponibilidad y evitan la inmunogenicidad del organismo. Algunas de estas modificaciones son compatibles y se pueden combinar pero, algunas otras no lo son, pudiendo interferir en el mecanismo de acción y provocar pérdidas en la afinidad frente a la diana.

Las modificaciones químicas pueden ser de primera, segunda o tercera generación.<sup>21</sup> Entre las modificaciones químicas de primera generación se encuentran las modificaciones del grupo fosfato en la estructura del oligonucleótido. Dentro de este grupo, destacan los cambios en los enlaces fosfodiéster que dan como resultado los tiofosfatos o fosforotioatos (PS). Los PS se caracterizan por conferir resistencia frente a las endonucleasas y aumentar la afinidad por las proteínas del suero con una unión reversible. De esta manera se disminuye su eliminación renal, su vida media en el plasma y se facilita la distribución en los tejidos. La gran desventaja de esta modificación es la reducción en la afinidad por la diana.<sup>22</sup>

Las modificaciones en la ribosa o sustituciones en la 2'-ribosa forman parte de las químicas de segunda generación. Las conformaciones 2'-O-metil (2'-OMe), 2'-O-metoxi-etil (2'-MOE) y 2'-O-fluoro (2'-F) son los tipos más usados.<sup>23</sup> Estas transformaciones aumentan la capacidad para unirse al RNA diana y mejoran la resistencia a las nucleasas. Además, la

metilación en el grupo 2'-OH ribosa disminuye la respuesta inmune.<sup>24</sup> La segunda molécula, 2'-MOE, al igual que la primera disminuye la inmunogenicidad, mejora la estabilidad y la eficacia. La 2'-F se obtiene mediante la sustitución del hidrogeno en el átomo 2' de carbono por un grupo flúor, mejorando la afinidad y resistencia a la degradación.<sup>25</sup> "Locked nucleic acid (LNA)" y "tricyclo-DNA (tcDNA)" constituyen dos conformaciones de DNA análogo encogido, que modifica la carga y flexibilidad del oligonucleótido aportando incluso mayor afinidad que las anteriores.<sup>26</sup> Todas las modificaciones químicas de primera y segunda generación son compatibles con la síntesis de ácidos nucleicos y pueden combinarse fácilmente.<sup>27</sup>

Las modificaciones químicas de tercera generación incluyen cambios en las bases nitrogenadas. Dos ejemplos dentro de este grupo son los oligonucleótidos de morfolino fosforodiamidato (PMO) y el ácido nucleico peptídico o ácido peptidonucleico (PNA). Se trata de dos moléculas sintéticas sin carga, muy resistentes a las nucleasas y con una afinidad variable frente al RNA diana.<sup>28</sup> Para la síntesis de los PMO, el esqueleto de ácidos nucleicos es sustituido por anillos de morfolino y uniones fosforodiamidato, manteniendo las bases estándar. Los PMOs pueden silenciar de manera efectiva los genes responsables de la enfermedad y modificar el *splicing* o empalme.<sup>29</sup> Los PNA se fabrican mediante síntesis peptídica, a través de la colocación de enlaces amida entre las nucleobases originando una molécula altamente estable en fluidos biológicos y con una gran afinidad frente al DNA y RNA complementarios. Éstas se sintetizan como moléculas antisentido clásicas, siendo los PNA moléculas bloqueadoras de RNA.<sup>30</sup>

Además de las modificaciones anteriores, existen algunas alternativas, como la inducción de cambios en los extremos de los oligonucleótidos antisentido, con el objetivo de que se asemejen al ARN mensajero disminuyendo el riesgo de que sean detectados por parte del sistema inmune. El diseño de oligonucleótidos altamente específicos con una alta especificidad frente al ARN mensajero es otra técnica que mejora la inmunogenicidad.

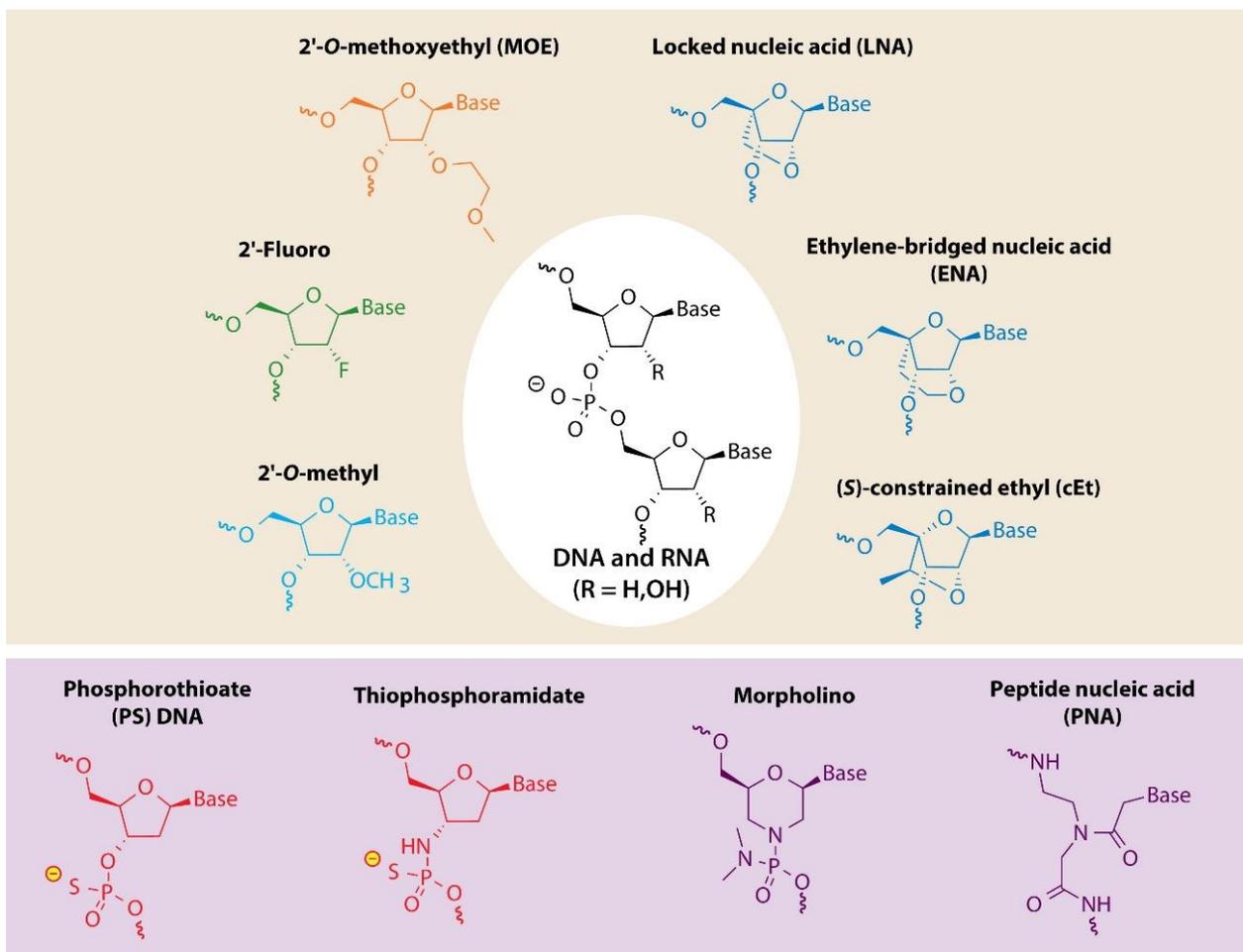


Figura 4. Ejemplo de modificaciones químicas empleadas en los oligonucleótidos antisentido.<sup>31</sup>

La captación celular y tisular es otro factor que puede limitar la administración terapéutica de los ONs. El principal mecanismo que media la captación celular es la endocitosis. Para que ésta tenga lugar es necesario que los ONs evadan la degradación lisosomal y entren en el endosoma. Mediante modificaciones químicas se pueden conseguir partículas con características favorables para evitar que sean degradadas en los endosomas y aumentar la tasa de captación celular. Los oligonucleótidos antisentido PS son un ejemplo de oligonucleótidos sintéticos monocatenarios, relativamente pequeños e hidrofóbicos que pueden entrar en las células de manera eficiente y sin necesidad de un vehículo. La ausencia de carga es otra característica que favorece el proceso de entrada.<sup>32</sup>

Estas modificaciones químicas son procesos complejos que suponen un reto respecto a los costes, seguridad, calidad y control de su desarrollo. Todas ellas tienen como objetivo mejorar las propiedades ADMET (absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad) del oligonucleótido terapéutico.

### 3.3 Barreras biológicas y “delivery”

Las terapias basadas en oligonucleótidos son una estrategia prometedora para el tratamiento de muchas enfermedades consideradas como intratables hasta la fecha. Mientras que los fármacos tradicionales actúan sobre proteínas y otros componentes patológicos a un nivel posterior, estas nuevas terapias ejercen su efecto directamente sobre el DNA o mRNA, previo a su expresión y a la síntesis de proteínas patológicas. Para poder llegar a su lugar de acción y ejercer su efecto, los nuevos fármacos necesitan enfrentarse a una serie de obstáculos y barreras tanto sistémicas como celulares (Figura 5). Por ejemplo, las moléculas de RNA presentan una carga negativa que les impide atravesar la membrana plasmática y las vuelve sensibles a las RNAasas lo que dificulta su llegada a su lugar de acción intracelular. Por ello, se emplean una serie de modificaciones químicas junto con el diseño de sistemas transporte como estrategias para abordar este impedimento.<sup>34</sup>

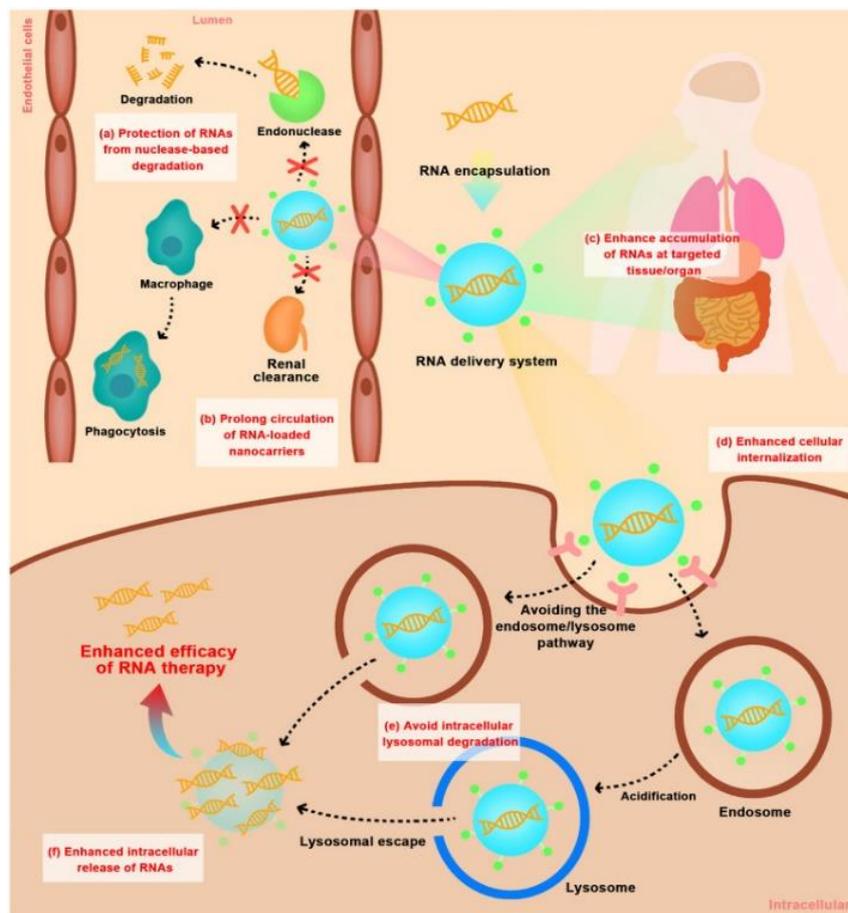


Figura 5. Barreras biológicas intracelulares y extracelulares para el “delivery” in vivo de oligonucleótidos terapéuticos.<sup>34</sup>

Tras la administración sistémica, el primer obstáculo al que se enfrentan los oligonucleótidos es la degradación mediada por nucleasas en el torrente sanguíneo. Las modificaciones químicas del grupo fosfato en el esqueleto, las metilaciones en la 2'-ribose, los *Locked nucleic acid* (LNA) o los ácidos peptidonucleico (PNA) confieren resistencia frente a estas enzimas. La absorción electroestática es otra estrategia comúnmente usada para protegerse de las

nucleasas, consiste en emplear una cápsula de polímeros catiónicos o iones positivos situados alrededor del ácido nucleico protegiéndolos de la degradación.<sup>34</sup>

A nivel sistémico es importante un sistema que prolongue el tiempo en el torrente sanguíneo, prevenga del aclaramiento renal y de la degradación fagocítica a nivel hepático, mediada por opsonización. La alteración de las propiedades fisicoquímicas ayuda a aumentar su vida media en plasma y mejoran su interacción con las proteínas plasmáticas. Es importante que las moléculas no sean lo suficientemente grandes para ser eliminadas por el riñón ni demasiadas pequeñas para ser fagocitadas, de 10 a 200 nm parece ser el tamaño ideal. La carga superficial es otro elemento clave, las moléculas aniónicas, neutras y unidas a nanotransportadores han demostrado tener una eficiente captación celular. La conjugación de los ácidos nucleicos con colesterol o lípidos aumenta la unión a proteínas séricas como la albumina mejorando así la vida media plasmática y aumentando la absorción hepática mediada por los receptores LDL. El PEG o polietilenglicol es un polímero que se puede incorporar a los oligonucleótidos terapéuticos disminuyendo su eliminación por parte del sistema retículoendotelial en un proceso llamado *PEGylation*. El inconveniente del PEG es la disminución de la biodistribución, la captación celular y el escape endosomal. Por ello, se emplean PEG sintéticos como el poliglicerol (PG) asociados a polímeros y lípidos. Mediante este proceso se obtiene una partícula más resistente a la unión de opsoninas, las cuales son reconocidas por los macrófagos llevándose a cabo la fagocitosis. Como resultado se obtiene un aumento en la vida media del oligonucleótido.<sup>35, 36</sup>

La barrera endotelial constituye otro obstáculo importante al que se enfrentan los oligonucleótidos terapéuticos, ya que el paso a través de ella es fundamental para acceder a las células diana. Las células endoteliales rodean la vasculatura, unidas entre sí a través de distintos enlaces y a la matriz celular mediante integrinas. Entre ellas existen poros pequeños y grandes, en función de su peso molecular los oligonucleótidos podrán pasar a través de estos poros por sí solos o mediante nanopartículas. Algunos ácidos nucleicos pueden ver limitado su paso a través de esta barrera, por ello se emplean estrategias como la unión del oligonucleótido a péptidos ligando para poder atravesar esta barrera, llegar a los tejidos y penetrar en la célula.<sup>35</sup>

La carga y tamaño de las moléculas también influye en la internalización celular, de manera que estas características pueden limitar la administración terapéutica y la captación celular y tisular. La endocitosis es el principal mecanismo que media la internalización en la célula. Para que este proceso tenga lugar, es necesario que los oligonucleótidos escapen de los endosomas y eviten así la degradación lisosomal. Sólo una pequeña parte lo consigue y llega al lugar de acción.<sup>36</sup>

La mayoría de los agentes terapéuticos empleados tienen una carga o son demasiado grandes para poder escapar de la degradación lisosomal e internalizarse por sí mismos, razón por la cual necesitarán un sistema de transporte. Dicho transporte puede realizarse de dos formas: por conjugación directa con el vehículo o por incorporación dentro de nanopartículas de transporte. Los objetivos de este sistema de transporte son amplios y buscan proteger a los oligonucleótidos sintéticos de una degradación precoz, aumentar la duración del efecto y la afinidad por la diana de manera activa o pasiva. El proceso pasivo, consiste en aprovechar las características anatómicas de los tejidos. En el proceso activo, se incorporan ligandos específicos dirigidos a la diana en el sistema de transporte.<sup>37</sup>

En el proceso de conjugación no todos los vehículos son compatibles con cualquier oligonucleótido sintético. Por ejemplo, la conjugación con péptidos está limitada a oligonucleótidos sintéticos sin carga como los PMOs mientras que los lípidos generalmente se pueden conjugar con cualquier oligonucleótido sintético. Los agentes más frecuentemente se emplean en el proceso de conjugación son los polímeros, péptidos, lípidos, aptámeros, anticuerpos y receptores de ligando. Las nanopartículas de transporte son compatibles con los oligonucleótidos sintéticos de carga negativa y pueden estar compuestos por un sólo componente o por varios tipos a la vez en sistemas híbridos. Actualmente, los lípidos, polímeros y péptidos son los sistemas de transporte más empleados.<sup>38</sup>

El escape de la degradación endosómico-lisosomal es considerada la principal barrera para la aplicación terapéutica de los oligonucleótidos. En este proceso, los oligonucleótidos se introducen en vesículas de endocitosis las cuales se fusionan para formar el endosoma temprano. Mediante un proceso de maduración, se acumulan enzimas hidrolíticas y se acidifica el interior del endosoma temprano convirtiéndose en endosoma tardío. Este endosoma tardío se fusiona con el lisosoma formándose compartimentos endolisosomales. El bajo pH y las enzimas existentes en los endolisosomas dañan el RNA, degradando los oligonucleótidos e impidiendo su acción terapéutica.

En la actualidad, existen dos estrategias para evitar la degradación endolisosomal. La primera consiste en alterar la internalización de los oligonucleótidos en el endosoma a través de procesos de rotura o fusión de la membrana endosomal, la formación de poros o desestabilización química de la membrana. La segunda aproximación conduce al oligonucleótido a otra vía de tráfico intracelular, que lo dirige específicamente al retículo endoplasmático o aparato de Golgi.<sup>39</sup>

Una vez situados en su lugar de acción los oligonucleótidos son liberados de sus sistemas de transporte. Para que esta liberación se lleve a cabo, son necesarios unos estímulos exógenos o endógenos que rompen los enlaces de unión con el transportador como el pH, acción específica de determinadas enzimas o la generación de radicales libres. Las propias características distintivas de la célula diana componen un entorno fisiológico adecuado, que da como resultado la liberación del oligonucleótido, la interacción con la diana y el efecto terapéutico deseado.<sup>39</sup>

### *3.4 Dianas y mecanismos de acción de los oligonucleótidos terapéuticos*

Los oligonucleótidos terapéuticos han sido diseñados para interferir en la expresión genética, dirigiéndose de forma específica a una diana y actuando mediante distintos mecanismos de acción. (Tabla 1)

Modalidad	Mecanismo	Ejemplo(s)
RNasa H	Escisión de la diana transcrita mediada por la RNasa H	Gapmers
Bloqueo estérico	Interferencia con los elementos de unión post-transcripcional del RNA.	ASOs de 2ª y 3ª generación y antagomirs
Unión a proteínas	Unión estructura-específica a proteínas diana	Aptámeros
Inmunidad innata	Inhibición de la expresión proteica mediante la degradación específica del mRNA	Oligonucleótidos compuestos por CpG no metilado
RNAi	Inhibición de la expresión genética mediante la degradación específica del mRNA	siRNA, microRNA

Tabla 1. Mecanismos de acción más comunes de los oligonucleótidos terapéuticos.<sup>18</sup>

Los oligonucleótidos antisentido (ASOs) poseen un mecanismo de acción muy versátil que les permite modular la expresión genética de diversas maneras: pueden degradar el DNA, bloquear estéricamente y manipular el mRNA de diversos modos. Respecto a su forma de actuar, podremos dividirlos en aquellos con actividad RNasa H dependiente que actúan estimulando la actividad de este enzima, o actividad RNasa H independiente.<sup>40-42</sup> (Figura 6)

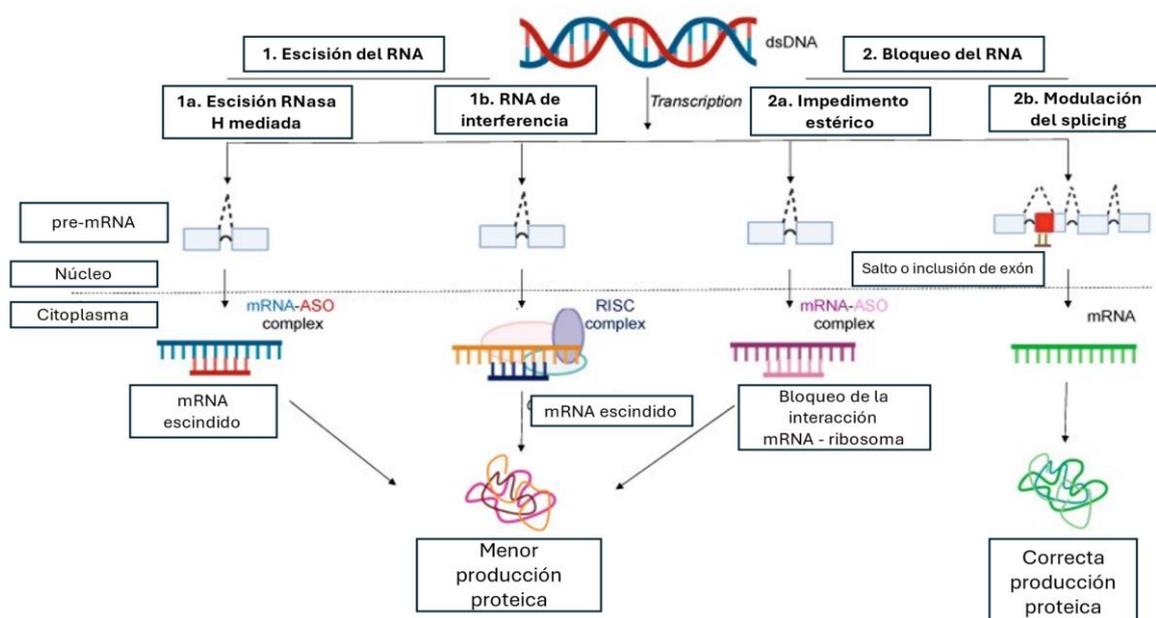


Figura 6. Mecanismo de acción de los oligonucleótidos antisentido (ASOs).<sup>41</sup> Regulan la expresión genética mediante bloqueo o escisión de RNA mediada por diversos mecanismos.

Los ASOs que actúan induciendo la RNasa H han sido diseñados como *gapmers*. Los *gapmers* son oligonucleótidos antisentido quimera formados por un bloque central de nucleótidos responsable de la formación de dúplex DNA y RNA, así como del reconocimiento y escisión de la RNasa H. La RNasa H es una enzima endógena que reconoce y escinde de manera específica dúplex de DNA-RNA. Rodeando este bloque central, encontramos secuencias modificadas que aportan resistencia a la RNasa H y aumentan la afinidad frente a la diana. Entre las secuencias más comunes encontramos LNA y modificaciones 2'-O.<sup>40,41</sup>

Los ASOs de segunda y tercera generación presentan un mecanismo de acción RNasa H independiente. Regulan la expresión genética mediante bloqueo estérico, interfiriendo con elementos de unión al RNA a nivel transcripcional o degradando el RNA mediante el enzima Argonaute 2 (AGO2). De forma similar, pueden unirse a factores pre-mRNA modulando el empalme o "*splicing*", con el objetivo de inducir o suprimir la inclusión de exones. También pueden inhibir o activar la traducción mediante su unión a los marcos de lectura abiertos, entre otros elementos reguladores.<sup>40, 41</sup>

Los aptámeros, son moléculas monocatenarias de DNA o RNA, formadas por 20-100 nucleótidos. Se unen con una alta afinidad a la proteína diana, de manera similar a un anticuerpo, adoptando conformaciones tridimensionales específicas e inhibiéndola. Las dianas de los aptámeros pueden ser diversas y se seleccionan de manera específica mediante un proceso *in vitro* llamado SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*). Este proceso de laboratorio permite seleccionar aptámeros específicos con una alta afinidad para la molécula diana.<sup>42</sup>

Con el objetivo de mejorar las propiedades farmacológicas de los aptámeros, se pueden realizar modificaciones químicas. La sustitución del 2'-hidroxilo en los nucleótidos de purina por residuos O-metilo puede conferir resistencia a la degradación por las nucleasas. También se pueden añadir moléculas portadoras, como el polietilenglicol (PEG), a los aptámeros y aumentar su vida media.<sup>43</sup> Hay que destacar la posibilidad de desarrollar antídotos específicos frente al aptámero. Estos se unen mediante emparejamiento de bases Watson-Crick. De esta manera, el aptámero no puede formar su estructura tridimensional lo que impide la unión a su objetivo. Hasta el momento solo un aptámero ha recibido la aprobación de la FDA para tratar la degeneración macular del ojo, muchos otros se encuentran en fase de ensayo clínico.<sup>43</sup>

Los microRNA (miRNA) y los oligonucleótidos pequeños de interferencia (siRNA) son moléculas de RNA de interferencia (RNAi) que actúan a nivel del citosol inhibiendo la expresión genética mediante la degradación específica del mRNA.<sup>44</sup>

Los siRNA son pequeñas moléculas bicatenarias constituidas por una secuencia de 22 nucleótidos de RNA que se unen al enzima Argonaute 2 (AGO 2), formando el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) donde se produce la degradación y escisión del mRNA y la hebra complementaria, originando un silenciamiento génico. Las modificaciones químicas más comúnmente usadas en el siRNA son las modificaciones 2'-OMe y 2'-F, estas pueden aumentar su resistencia a la degradación por parte de RNasa H sin modificar su afinidad y disminuir su inmunogenicidad.<sup>45</sup> (Figura 7)

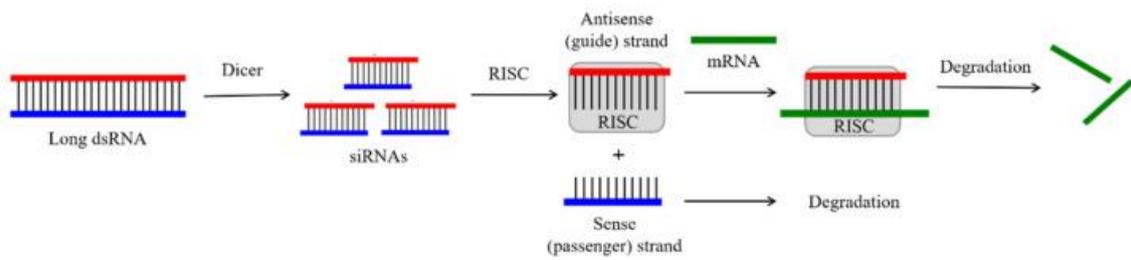


Figura 7. Mecanismo de acción del RNA de interferencia mediado por siRNA. <sup>45</sup>

Los micro RNA (miRNA) regulan la expresión de diversos genes a nivel postranscripcional. Actúan uniéndose en el citosol al extremo 3' del mRNA diana inhibiendo su traducción o marcándolo para su degradación. La función del miRNA puede verse influenciada por dos categorías de oligonucleótidos: inhibidores o antagomir e imitadores o agomir. Un antagomir, es un oligonucleótido sintético complementario al miRNA que tiene como función antagonizar de forma específica al miRNA. Se unen a éste previniendo que interactúe con el mRNA, bloqueando la degradación mediada por el miRNA. El resultado puede ser, tanto un aumento como una disminución de la expresión. A diferencia de los antagomires, los agomires son oligonucleótidos que imitan o amplifican la función de los miRNAs. Presentan una secuencia complementaria al miRNA, que se une de manera específica al mRNA produciendo un bloqueo transcripcional. (Figura 8) <sup>46,47</sup>

La capacidad del siRNA y del miRNA para regular la expresión genética los convierte en opciones terapéuticas potenciales para su aplicación en numerosas enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares o degenerativas. <sup>47</sup>

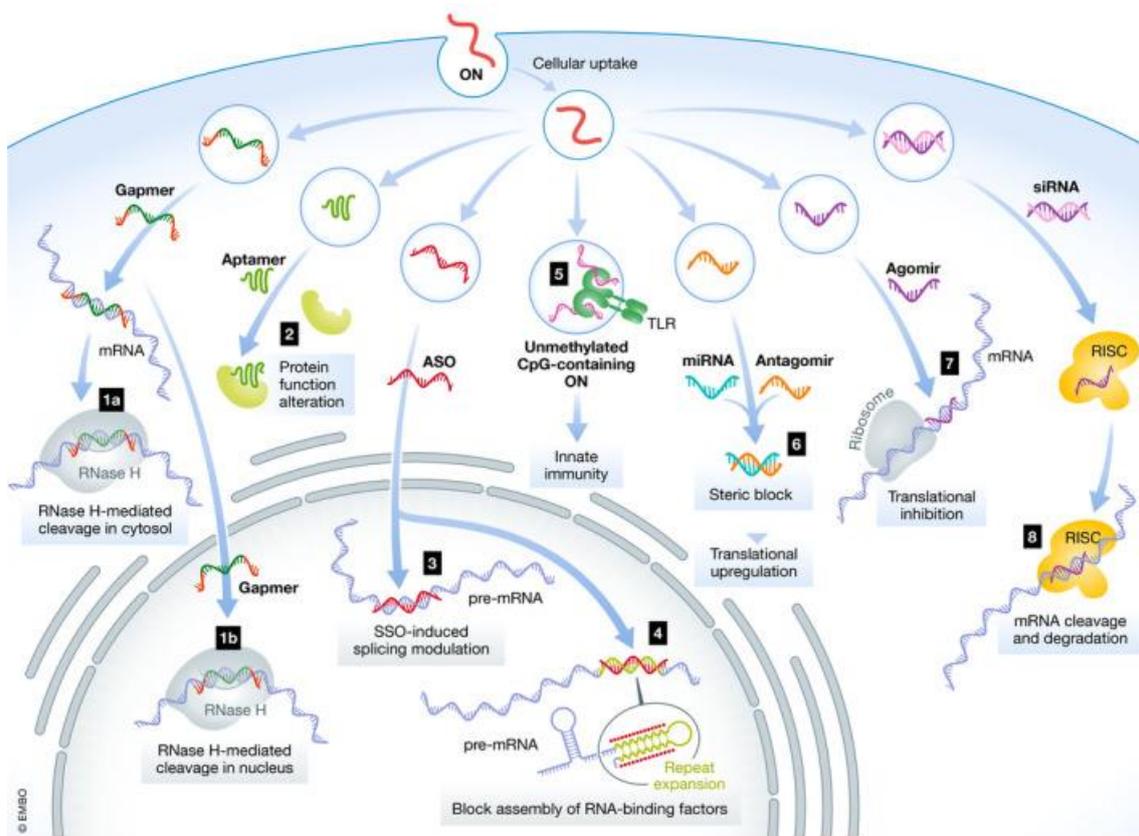


Figura 8. Esquema global del mecanismo de acción y lugar de actuación intracelular de los distintos oligonucleótidos.<sup>18</sup>

## 4 SISTEMAS DE TRANSPORTE DE OLIGONUCLEÓTIDOS TERAPÉUTICOS

### 4.1 Vectores como vía de transporte en la terapia génica: vectores virales y no virales

Un componente clave para que el material genético terapéutico pueda ser introducido en la célula y llegue a su diana es la existencia de un transportador o vector eficaz. El empleo de vectores virales se basa en su capacidad natural de estos para introducir su material genético dentro de la célula. La idea de usar vectores virales con fines terapéuticos fue introducida en 1990 por William French Anderson. Anderson llevó a cabo un ensayo para corregir el déficit de adenosina desaminasa (ADA) empleando un retrovirus como vector viral portador del gen ADA. En la actualidad los vectores virales más empleados se basan en adenovirus (Ads), retrovirus y virus adenoasociados (AAV).<sup>48</sup>

Los virus adenoasociados son parvovirus sin envoltura que presentan la capacidad de introducir su material genético en el núcleo de la célula huésped formando concatémeros, unas estructuras con la capacidad de permanecer latentes durante largos periodos de tiempo sin integrarse en el genoma celular. Presentan una serie de ventajas dentro del campo de la terapia génica: la capacidad para infectar tanto células en división como inactivas, su elevada eficiencia, la capacidad de permanecer un largo periodo de tiempo en células quiescentes, una baja tasa de inserción en el genoma, capacidad inmunogénica relativamente baja y su no patogenicidad.<sup>49</sup>

Por otra parte, los principales inconvenientes de los AAVs son su tamaño y, aunque se caracterizan por ser poco inmunogénicos, presentan cierto riesgo de que se desarrolle una respuesta inmune frente a ellos. Este último obstáculo ha sido afrontado mediante tratamiento inmunosupresor con una respuesta adecuada en algunos pacientes, pero sin respuesta y rechazo en otros. La FDA ha aprobado dos terapias basadas en AAVs, LUXTURNA y ZOLGENSMA. La primera se utiliza para el tratamiento de la distrofia retiniana asociada a la mutación RPE65, mientras que la segunda permite tratar pacientes pediátricos, menores de dos años con atrofia muscular espinal y mutación en el gen de la motoneurona de supervivencia 1.<sup>50</sup>

Otro tipo de vectores frecuentemente utilizados son los adenovirus. Se caracterizan por ser virus icosaédricos, sin envoltura, complejos y formados por una cadena doble de DNA. Al igual que los AAVs, no integran su material genético en el genoma celular, disminuyendo el riesgo de mutagénesis. Son considerados el sistema de transporte viral más eficiente debido a que la mayoría de las células y tejidos humanos expresan receptores frente a los adenovirus, incluyendo las células quiescentes. Además, son capaces de introducir el gen que transportan en tejidos y células de difícil acceso como las neuronas del SNC y SNP. Los principales inconvenientes son una expresión génica más limitada en el tiempo, la limitación de la carga genética a 30kb y el riesgo de una respuesta inmune frente a ellos. El desarrollo de una respuesta inmune deriva en un estado inflamación, toxicidad y pérdida de las células infectadas. Los adenovirus han sido empleados principalmente en el desarrollo de vacunas y terapias frente al cáncer.<sup>51</sup>

Los retrovirus son una familia de virus RNA monocatenarios con envoltura glicoprotéica. En su RNA portan 3 genes codificantes para una serie de proteínas estructurales y de envoltura, además de su transcriptasa inversa e integrasa, lo que les permite replicarse por sí mismos. Los retrovirus se internalizan en la célula huésped mediante la unión de sus glicoproteínas de envoltura con receptores celulares de superficie, introduciendo su núcleo viral dentro del citoplasma celular. En el citoplasma, la transcriptasa inversa convierte el RNA viral en DNA bicatenario que será dirigido al núcleo celular para integrarse en el genoma de la célula diana. Dentro de esta familia se encuentran los lentivirus, un subtipo complejo de retrovirus que se integran en el genoma evitando las regiones reguladoras.<sup>52</sup> El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), felina (VIF) y el virus de la anemia infecciosa equina (VAIE) forman parte de este subgrupo. Los retrovirus y lentivirus fueron muy prometedores en los inicios de la terapia génica, pero la posible activación de oncogenes o la inducción de mutaciones los ha posicionado en un segundo plano. Un pequeño tamaño de 9kb, un amplio tropismo tisular y celular y una capacidad de expresión a largo plazo una vez integrado en el genoma son sus principales ventajas. Se han empleado los retrovirus y lentivirus para la transferencia génica *ex vivo* en ensayos dirigidos al desarrollo de tratamientos para enfermedades metabólicas, hematopoyéticas, del SNC y en terapias con células T modificadas (CAR-T) para tratar leucemias. En el desarrollo de CRISPR-Cas9 como herramienta para la edición genómica se observó una gran capacidad de los lentivirus, superior a los AAVs, para empaquetar y transportar la Cas9 y otros RNA empleados en la edición genómica.<sup>53,54</sup>

A pesar de los éxitos conseguidos por los vectores virales en la terapia génica, estos presentan una serie de obstáculos que han llevado al desarrollo de nuevas estrategias y sistemas de transporte que permiten superar las limitaciones de los vectores virales. Estos nuevos vectores sintéticos suponen la vía alternativa más atractiva para vencer los

inconvenientes de los vectores virales, como la inmunogenicidad o el riesgo de inducción de mutaciones.<sup>55</sup>

## 4.2 Sistemas no virales para el transporte de oligonucleótidos

El uso de vectores no virales o sintéticos para el transporte de ácidos nucleicos ha sido un tema de investigación ampliamente estudiado en los últimos años. Estos presentan una serie de ventajas como la capacidad de producción a gran escala, una baja toxicidad, poca inmunogenicidad, gran seguridad y eficacia. El transporte de oligonucleótidos mediante sistemas no virales se puede realizar de dos formas, mediante conjugación directa con el vehículo o por incorporación a un sistema de transporte basado en nanopartículas.<sup>55</sup>

Los polímeros, péptidos, sistemas de transporte basados en lípidos, los materiales inorgánicos, los anticuerpos y los aptámeros son algunos de los principales componentes empleados como vectores no virales (Figura 10).



Figura 9. Materiales empleados como vectores no virales.<sup>55</sup>

### 4.2.1 Los polímeros como vectores no virales

El transporte de genes basado en polímeros tiene un enorme potencial para la administración de ON terapéuticos que reside en su baja toxicidad, biodegradabilidad, la capacidad de liberación controlada y su baja acumulación en tejidos no diana. En el transporte de ácidos nucleicos, los polímeros catiónicos tienen un protagonismo especial gracias a su capacidad para formar complejos con el material genético cargado negativamente, neutralizándolo y permitiendo que llegue de manera eficiente a la célula diana.<sup>56</sup>

Los polímeros presentan variaciones según su estructura, composición y peso molecular. Generalmente, el peso molecular y la carga marcan la capacidad del vector polimérico para la internalización celular y nuclear, el escape lisosomal y la liberación intracelular del ácido nucleico. En una de las estrategias principales, los polímeros se unen a los ácidos nucleicos mediante uniones electrostáticas, a través de aminas catiónicas situadas en su esqueleto. Esta unión origina unos complejos donde un empaquetado eficiente del DNA es importante para un adecuado transporte, promover la internalización celular y prevenir la degradación enzimática.<sup>57</sup>

En el interior celular, estos complejos deben escapar de la degradación mediada por el endosoma. La carga positiva de los polímeros catiónicos les permite inducir este escape mediante un proceso denominado “esponja de protones” (Figura 11). En este proceso los polímeros tamponan el pH del interior del endosoma, evitando su acidificación e inestabilizando la membrana. Seguidamente se produce una entrada pasiva de iones de cloruro, una entrada de agua secundaria que se acumula en el endosoma y finalmente la ruptura de la membrana.<sup>58</sup>

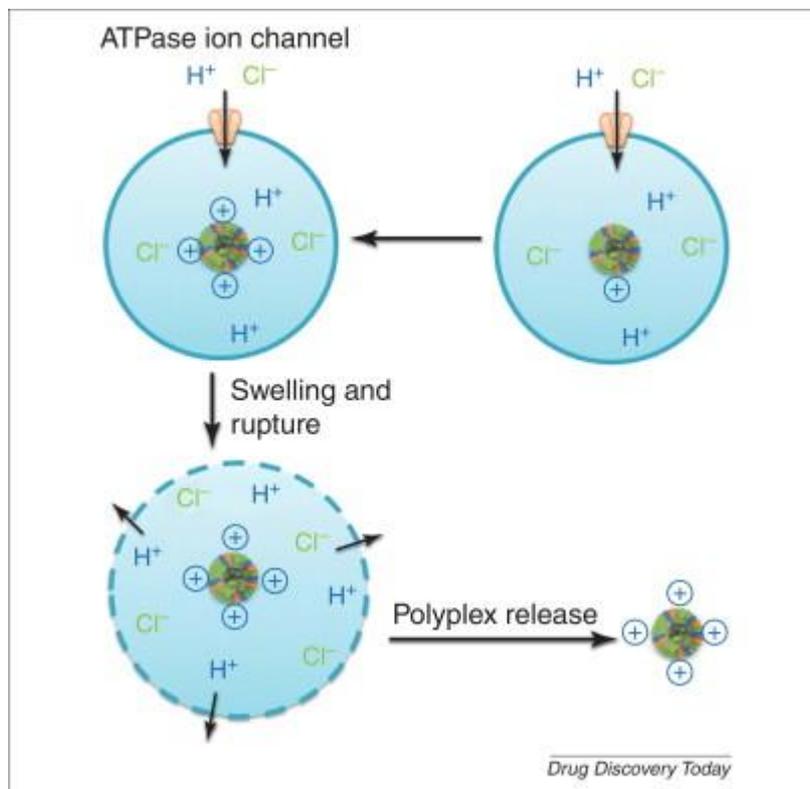


Figura 10. El escape endosomal de los complejos polipéptidos mediado por el efecto “esponja de protones”<sup>57</sup>

La polietilenimina (PEI) se trata del primer polímero catiónico no biodegradable sintetizado por primera vez en 1995 para su uso en la terapia génica. Su eficacia reside en la capacidad de generar estrés osmótico que, como ya hemos indicado, se denomina “efecto esponja de protones”. Los polimetacrilatos y las polimetacrilamidas son dos tipos de polímeros catiónicos no biodegradables que imitan las propiedades del PEI. Han sido modificados en diversas ocasiones con el objetivo de mejorar su eficacia y perfil de toxicidad. El principal

inconveniente con estos polímeros es su citotoxicidad por acúmulo celular al ser no biodegradable.<sup>58</sup>

Los dendrímeros son un tipo de polímeros sintéticos con una estructura ramificada y tridimensional compuesta de un núcleo o parte central de la que salen una serie de prolongaciones y una parte periférica de superficie formada por diversos grupos funcionales. El uso de esta proteína globular para el transporte de ácidos nucleicos está en crecimiento constante. Se unen a los ácidos nucleicos formando una estructura denominada dendriplex. Esta estructura entra en la célula, escapa de la degradación endosomal y en el citoplasma libera el material genético. Posteriormente, el material genético en solitario entra en el núcleo (Figura 12). Sus beneficios radican en una alta biodisponibilidad, una gran capacidad para atravesar barreras incluida la barrera hematoencefálica, una buena relación eficacia-toxicidad, una vida media prolongada y mayor estabilidad, siendo solubles en agua. Entre sus inconvenientes destaca el alto coste de su producción.<sup>59, 60</sup>

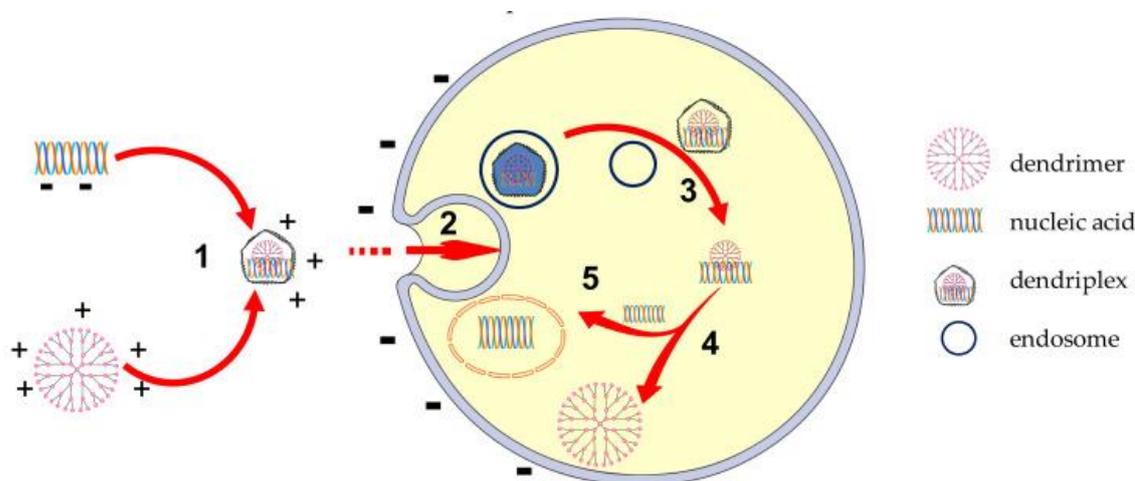


Figura 11. Esquema de transfección de genes mediante dendrímeros.<sup>60</sup>

Entre los dendrímeros más empleados se encuentran los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM). Éstos constituyen el primer grupo de polímeros sintéticos, con una estructura esférica y ramificada, ampliamente usados y estudiados. Entre sus principales aplicaciones médicas se encuentra el empleo en pruebas de imagen como transportadores de medios de contraste y el transporte de distintos fármacos y genes. Además, los dendrímeros PAMAM con grupos OH, COOH y grupos terminales de NH<sub>2</sub> han demostrado propiedades antimicrobianas frente al *E. coli*, dando lugar a una lisis celular. En su estructura encontramos una serie de aminas secundarias y terciarias que les permiten amortiguar de manera eficaz los protones, dándoles una capacidad de transfección de genes óptima. La unión del dendrímero PAMAM a distintas nanopartículas como el ácido borónico o el ácido guanidinobenzoico, formando complejos, es una modificación comúnmente usada que mejora la capacidad de entrega.<sup>61,62</sup>

#### 4.2.2 El transporte de ácidos nucleicos con lípidos

Los vectores no virales basados en lípidos han demostrado gran eficacia en su uso en la terapia génica. Los vectores lipídicos presentan un perfil seguro, con una estructura fácilmente modificable. Estas características permiten una transfección eficiente y una gran

estabilidad de los ácidos nucleicos en su transporte, llegando de manera óptima al interior de la célula.<sup>63</sup>

Los liposomas son sistemas de transporte esféricos, formados por una bicapa lipídica, con la capacidad de encapsular ácidos nucleicos o formar complejos con ellos en su superficie. Esta capa lipídica protege a los ON de la degradación enzimática, endosomal y las condiciones adversas del medio, aumentando su vida media en el torrente sanguíneo. Los lípidos empleados como vectores son los lípidos catiónicos, lípidos neutros y lípidos asociados a otros agentes auxiliares como el polímero PEG (lípidos de fusión).<sup>63</sup>

Los más utilizados son los lípidos catiónicos, cuya estructura consta de una cabeza catiónica, una zona enlace y colas hidrofóbicas. En la transfección de genes, la carga, las propiedades y composición de la cabeza y cola, así como la hidrofobicidad y la forma juegan un papel importante.<sup>63</sup>

Una unión inespecífica a proteínas plasmáticas durante su transporte puede originar toxicidad. Para solventar este problema, se asocian lípidos auxiliares a la superficie del liposoma como el colesterol o PEG reduciendo la carga y proporcionando mayor estabilidad. El 1-(2, 3-dioleoyloxy) propil]-N,N,N-trimetilo-amonio (DOTMA) fue el primer lípido catiónico usado como vector. Los DOTMA se unen a los ácidos nucleicos formando complejos gracias a interacciones electrostáticas entre la cabeza catiónica y el ácido nucleico cargado negativamente.<sup>63</sup>

Las nanopartículas lipídicas (LNP) se forman mediante la fusión de varios componentes lipídicos, mejorando la biodistribución, estabilidad, capacidad de carga y eficiencia.<sup>83</sup> Los lípidos catiónicos, fosfolípidos, lípidos de fusión y colesterol son los componentes principales de las LNPs. Estos lípidos se colocan formando una estructura esférica que encapsula al ácido nucleico en su interior (Figura 13). En las LNPs, el componente principal son los lípidos catiónicos que permiten la encapsulación del DNA o RNA mientras que los otros lípidos auxiliares aportan estabilidad a la nanopartícula. En la superficie de estas nanopartículas también pueden añadirse componentes no lipídicos como polímeros catiónicos, péptidos o fosfato cálcico, dando lugar a nanovehículos "híbridos".<sup>64</sup>

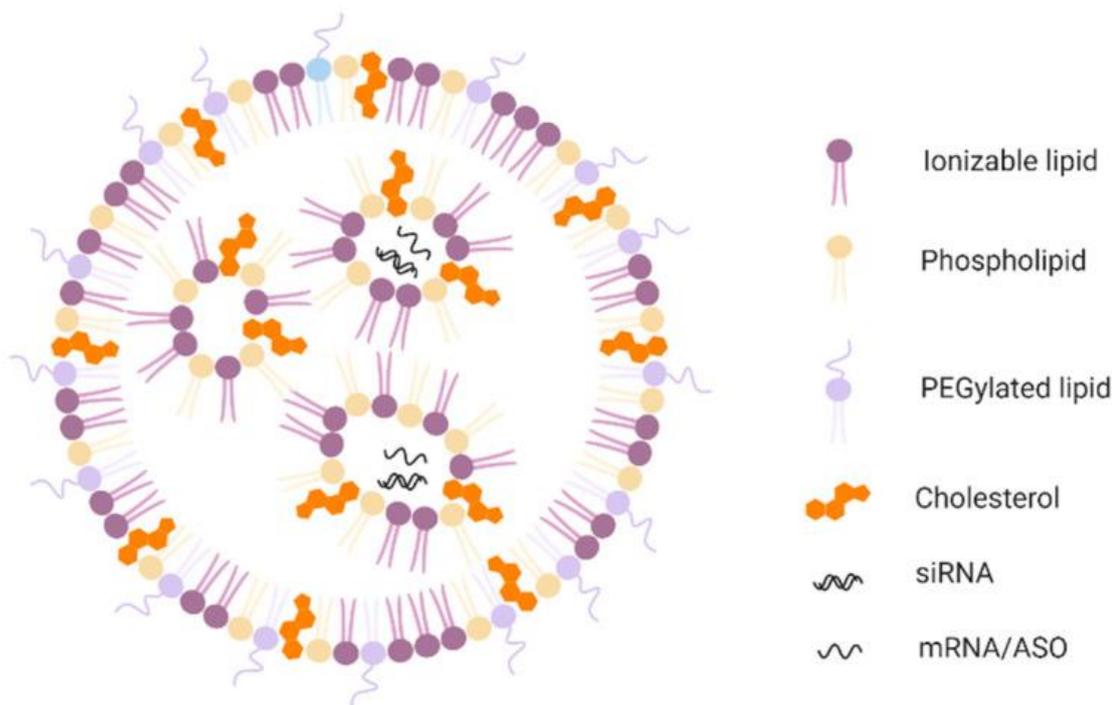


Figura 12. Estructura de las nanopartículas lipídicas (LNPs).<sup>63</sup>

Los lípidos auxiliares tienen un papel fundamental en la administración de los ONs. La elección del lípido auxiliar empleado en la formulación dependerá del fin terapéutico específico de la nanopartícula. El colesterol es un componente empleado frecuentemente como lípido auxiliar. Se coloca en los huecos libres entre fosfolípidos, aumentando la estabilidad y favoreciendo la fusión de la membrana. El colesterol a menudo se emplea conjuntamente con la fosfatidilcolina (PC), un componente natural de las membranas biológicas altamente estable gracias a su alta temperatura de fusión ( $T_m$ ).<sup>63</sup>

Los lípidos de fusión también se emplean como lípidos auxiliares en las formulaciones de LNP. Su incorporación a las nanopartículas lipídicas deriva en un aumento de la estabilidad, mayor resistencia a la opsonización por las proteínas séricas y disminución del aclaramiento. La “PEGilación” presenta inconvenientes como una mayor dificultad en la internalización celular y liberación del ON. El empleo de uniones de anclaje débiles y cortas o de una pegilación reversible mediante enlaces sensibles a las proteasas, son estrategias desarrolladas para afrontar este inconveniente. El N-[(metoxi poli(etilenglicol)2000)carbamoil]-1,2-dimiristiloxipropil-3-amina (PEG-C-DMA), por ejemplo, tiene en su estructura anclajes de carbono cortos de manera que el agente “pegilante” se va perdiendo progresivamente en la circulación. Esta pérdida, disminuye la densidad de PEG aumentando la capacidad de internalización y entrega intracelular.<sup>64</sup>

#### 4.2.3 Sistemas de transporte basados en péptidos

Los péptidos tienen la capacidad de transportar material genético de manera eficiente gracias a un sencillo proceso de producción y diseño, seguridad y gran biocompatibilidad.<sup>66</sup>

Para la formación del complejo péptido-ácido nucleico se pueden emplear tres herramientas. La primera es especialmente adecuada para ácidos nucleicos de carga neutra y consiste en uniones covalentes entre ambos componentes. Esta unión origina un compuesto muy estable y con gran capacidad para atravesar membranas. Una segunda estrategia está basada en enlaces no covalentes entre péptidos cargados positivamente y ácidos nucleicos con carga negativa. Esta herramienta es más sencilla, menos costosa y adecuada para la mayoría de los ácidos nucleicos. La tercera estrategia, más compleja, modifica distintas superficies peptídicas existentes en las nanopartículas creando una plataforma óptima para su acoplamiento con un ácido nucleico.<sup>67</sup>

Los péptidos penetrantes celulares (CPP), son un subgrupo de péptidos compuestos por una secuencia de 10-20 aminoácidos con un gran protagonismo en el transporte de material genético. Tienen la capacidad de atravesar la membrana celular sin destruirla ni alterarla, penetrando en la célula y llegando al citoplasma mediante un mecanismo de traslocación que todavía no se conoce con certeza (Figura 14). Las distintas hipótesis sugieren dos vías principales, mediante traslocación directa por interacciones electrostáticas y a través de macropinocitosis dependiente de energía.<sup>68</sup>

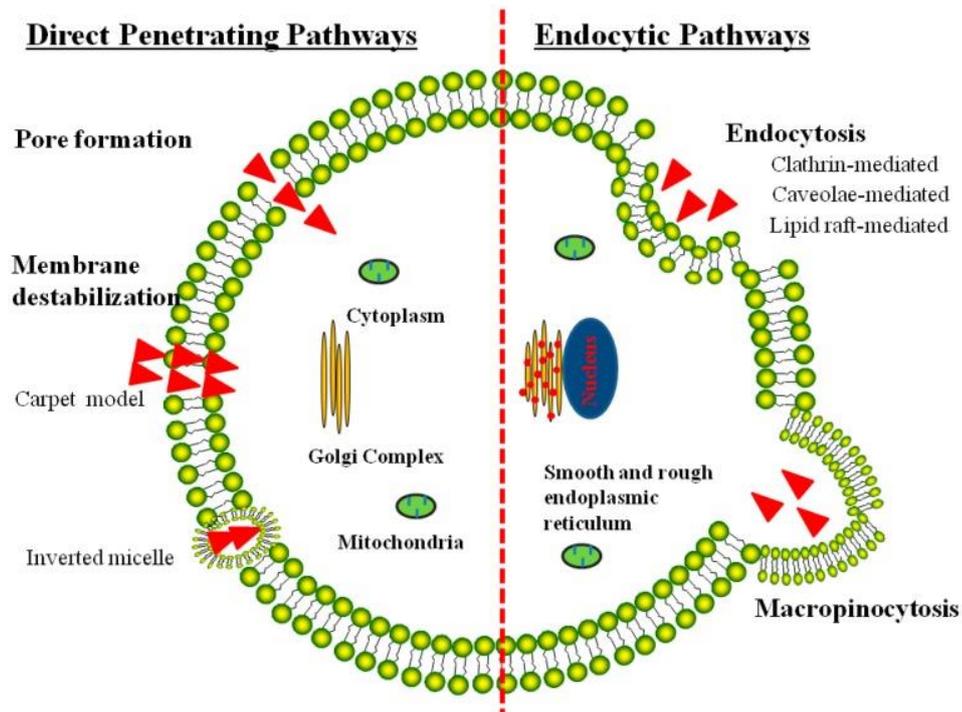


Figura 13. Mecanismos de traslocación citoplasmática mediada por los CPP.<sup>68</sup>

A pesar de que los vectores peptídicos presentan un perfil prometedor, todavía quedan muchos obstáculos que superar. Una solución es la combinación con otros vectores no virales, virales y nanopartículas formando vectores multifuncionales. Las modificaciones con compuestos hidrofóbicos como el colesterol o ácidos grasos permiten aumentar su vida media e inestabilidad en plasma. Adicionalmente, la capacidad de atravesar la membrana de cualquier tipo de célula supone un riesgo ya que puede integrarse en células distintas a la diana. Este último inconveniente puede solventarse mediante la integración de ligandos específicos a la estructura peptídica, permitiendo un transporte dirigido más específico.<sup>67</sup>

#### 4.2.4 Aptámeros y anticuerpos como vehículos no virales

Otras moléculas usadas como *carriers* son los aptámeros y los anticuerpos. Los aptámeros son ácidos nucleicos que pueden ser empleado como vehículos, uniéndose a su diana con una alta afinidad. Además, presentan un bajo perfil tóxico e inmunogénico convirtiéndolo en una alternativa superior a los anticuerpos para aplicaciones tanto diagnósticas como terapéuticas.<sup>69</sup>

Los anticuerpos por su parte son agentes inestables y muy inmunogénicas, pero con una gran afinidad por su diana y resistencia a la degradación por las nucleasas. Las terapias basadas en anticuerpos se emplean con gran frecuencia y en especial para el tratamiento de cáncer, enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias. Las nuevas tecnologías permiten el empleo tanto de anticuerpos humanos como de anticuerpos animales modificados. Sin embargo, presentan un alto coste de producción. En el desarrollo de anticuerpos es importante tener presente el perfil de toxicidad, medido mediante el índice terapéutico (IC), que se define como la relación entre el efecto tóxico y el efecto terapéutico producido a una determinada dosis.<sup>70</sup>

La Tabla 2 compara las características entre los anticuerpos y los aptámeros.

APTÁMERO	ANTICUERPO
VIDA MEDIA LARGA (VARIOS MESES)	Vida media corta (pocos meses)
TAMAÑO PEQUEÑO CON ALTA PENETRACIÓN EN LOS TEJIDOS	Tamaño grande con baja penetración en los tejidos
ALTA ESPECIFICIDAD Y AFINIDAD	Alta especificidad y afinidad
ALTA ESTABILIDAD EN PH Y TEMPERATURA	Baja estabilidad en pH y temperatura
BAJA INMUNOGENICIDAD	Alta inmunogenicidad
FACILIDAD PARA MODIFICAR SUS PROPIEDADES	Difíciles de modificar
BARATOS	Producción costosa
SUSCEPTIBILIDAD A LAS NUCLEASAS (NECESIDAD DE MODIFICACIONES QUÍMICAS PARA RESISTIR A LAS NUCLEASAS)	Ausencia de susceptibilidad a las nucleasas

Tabla 2. Diferencias entre los aptámeros y anticuerpos como vectores no virales.<sup>70</sup>

## 5 EL PAPEL DE LAS NUEVAS TERAPIAS BASADAS EN ASOs EN LAS ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES Y SU APLICACIÓN DE LA Distrofia Muscular de Duchenne

Las enfermedades neuromusculares (ENM) son un grupo heterogéneo de patologías tanto hereditarias como adquiridas, que pueden afectar tanto al sistema nervioso, al músculo o a la unión neuromuscular. El sistema musculoesquelético, el sistema cardiaco, respiratorio y la

nutrición tienen una importancia especial.<sup>71</sup> En consecuencia, para el tratamiento de estas enfermedades es necesario un enfoque multidisciplinar ya que muchos dominios pueden verse afectados.

Las ENM pueden dar lugar a una gran variedad de síntomas, siendo la debilidad muscular el síntoma cardinal. Además, muchas de éstas son enfermedades que aparecen en la población con una baja frecuencia, en general afectan a menos de 1 de cada 2000 personas, clasificándose como enfermedades raras asociadas a una base genética. Algunas de estas ENM raras son: la distrofia muscular de Duchenne (DMD), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la atrofia muscular espinal (AME), la Miastenia Gravis o el Síndrome de Eaton-Lambert.<sup>72</sup>

El origen genético desconocido de muchas de estas enfermedades unido a su baja frecuencia ha impedido el desarrollo de tratamientos eficaces. En los últimos años, los avances que ha experimentado la terapia génica y la aparición de nuevas terapias basadas en oligonucleótidos sintéticos ha permitido el desarrollo de tratamientos con una gran eficacia frente a ciertas ENM. Estas terapias se centran en modular la expresión de los genes responsables de la enfermedad y modificar la síntesis del producto proteico afectado. Actualmente, más de 150 fármacos basados en oligonucleótidos se encuentran en distintas etapas de desarrollo clínico y muchos otros ya han sido aprobados.<sup>72</sup>

La AME es una enfermedad neuromuscular genética infantil causada por una mutación en el SMN1, gen que codifica la motoneurona de supervivencia. Esta mutación da lugar a la pérdida de las motoneuronas de la medula espinal, originando una parálisis progresiva letal. Se trata de una de las principales causas genéticas de mortalidad infantil cuya esperanza de vida ha aumentado notablemente gracias al desarrollo, en 2016, del *Nusinersen* o *Spinraza*. Se trata de un fármaco 2'-MOE aprobado por la FDA que ha demostrado una buena tolerancia y seguridad. Otros fármacos aprobados para el tratamiento de todos los tipos de AME son el *Risdiplam* que aumenta los niveles de la proteína SMN funcional y el *Zolgensma* formado por un adenovirus unido a una copia normal de SMN1. La distrofia muscular de Duchenne (DMD), por ejemplo, es una ENM hereditaria con un protagonismo especial cuenta con cuatro fármacos basados en ASOs aprobados por la FDA para su tratamiento.<sup>72</sup>

### 5.1 La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad neuromuscular hereditaria grave caracterizada por una atrofia muscular progresiva. Afecta aproximadamente a 1 de cada 5000 nacidos vivos de sexo masculino. Las mujeres son las principales portadoras asintomáticas, raramente manifiestan la enfermedad.<sup>73</sup>

La enfermedad es causada por mutaciones en el gen de la distrofina que codifica una proteína estructural denominada distrofina. Esta mutación origina una distrofina anómala o insuficiente que hace al músculo más sensible al daño. Como resultado, se produce una degeneración progresiva de los músculos y fallo funcional de distintos sistemas del organismo.<sup>73</sup>

La distrofina es una de las proteínas más grandes del organismo humano cuya presencia y correcto funcionamiento es fundamental para mantener la integridad de las fibras

musculares. Se encuentra codificada en el gen de la distrofina formado por más de 2.6 millones de pares de bases y 79 exones. El gran tamaño de este gen le hace más propenso a sufrir mutaciones, siendo las deleciones muy frecuentes. Las mutaciones en el gen de la distrofina pueden causar también la distrofia muscular de Becker (DMB), caracterizada por un fenotipo similar, pero con una clínica más leve. Esta proteína, que se encuentra en las membranas de las células musculares, tiene como función mantener la estabilidad de las fibras musculares y actuar como soporte durante la contracción y relajación de los músculos. El mecanismo patogénico principal de la DMD se basa en la presencia de una distrofina disfuncional que hace que las membranas de las células musculares se desestabilicen, se pierdan las fibras musculares, atrofiándose el músculo y viéndose reemplazado por tejido fibroso y graso.

Los síntomas de la DMD aparecen en torno a los 2 o 3 años en forma de debilidad muscular progresiva que comienza en miembros inferiores, en la musculatura proximal, que deriva en problemas para realizar actividades como subir escaleras, levantarse del suelo, caídas frecuentes y alteraciones en la marcha. También es habitual la aparición de una hipertrofia a nivel de las pantorrillas y elevación de la creatinina quinasa plasmática (CPK) o de las transaminasas hepáticas. Muchos de los individuos afectados dependen de una silla de ruedas a los 12 años.<sup>74</sup> En la primera infancia, hasta los 6 años aproximadamente, la afectación del paciente es poco limitante lo que le permite adquirir fuerza y desarrollar habilidades motoras, aunque en menor medida si es comparado con otros individuos de su edad. La esperanza de vida de estos enfermos es de 30 años, falleciendo en la mayoría de los casos por fallo cardíaco o respiratorio.

El deterioro cognitivo junto con otros síntomas del dominio psiquiátrico como alteraciones en la conducta y dificultades en el aprendizaje aparecen con frecuencia entre los pacientes con DMD.<sup>75</sup> Otras complicaciones asociadas a la DMD incluyen la enfermedad pulmonar restrictiva que puede provocar una insuficiencia respiratoria secundaria, arritmias y miocardiopatía dilatada y complicaciones ortopédicas como la escoliosis.

La DMD debe sospecharse en pacientes pediátricos (de 2 a 4 años), varones, en los que se observe una clínica compatible con la enfermedad: debilidad muscular, alteraciones en las habilidades motoras, hipertrofia en las pantorrillas, elevación de la creatinina quinasa plasmática (CK) y enzimas hepáticas (alanina aminotransferasa o AST y aspartato aminotransferasa o ALT). En la exploración física es característico el denominado signo de Gowers en el cual el niño necesita usar sus manos para escalar sobre sus extremidades inferiores y así conseguir ponerse de pie, junto con alteraciones en la marcha (marcha de pato). También es importante prestar atención a la existencia de retrasos en el lenguaje y en el habla.<sup>76</sup>

Frente a la sospecha un posible paciente con DMD lo primero es medir los niveles de CK, en los pacientes con DMD superan entre 10-100 veces los valores normales (Figura 17). Posteriormente debemos estudiar la existencia de mutaciones en el gen DMD para confirmar el diagnóstico y valorar las opciones terapéuticas específicas en el individuo. La amplificación por sonda dependiente de ligadura (MLPA) y la hibridación genómica comparativa de matrices (CGH) son los métodos más empleados para llevar a cabo el estudio genético cuantitativo. El estudio cualitativo se basa en la secuenciación genómica de la región codificante del gen DMD para encontrar pequeñas mutaciones.

Técnicas invasivas como la biopsia muscular se reservan para pacientes con una alta sospecha diagnóstica en los que los estudios genéticos sean negativos y no se objetive mutación. En la biopsia se valoran las características y morfología de la distrofina mediante inmunofluorescencia y Western Blot.<sup>77</sup>

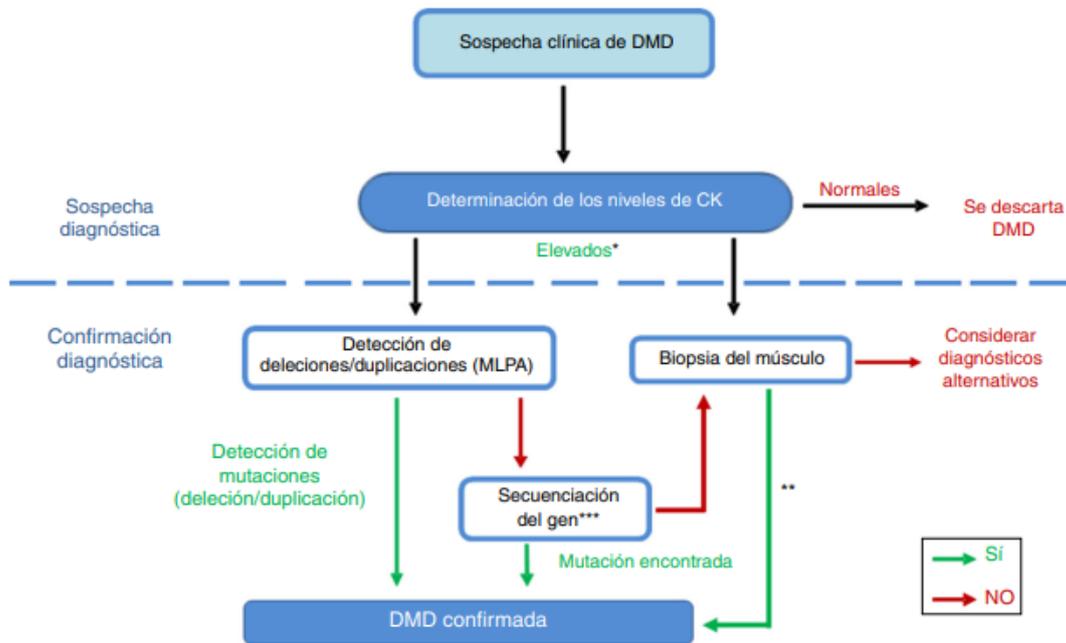


Figura 14. Algoritmo diagnóstico de la DMD.<sup>77</sup>

### 5.1.1 Los avances que ha conseguido la terapia génica en el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).

Las opciones terapéuticas clásicas para afrontar la DMD son limitadas y ninguna curativa. Las investigaciones y avances de los últimos años, junto con la aparición de las nuevas terapias oligonucleótido antisentido, ha revolucionado las expectativas sobre los pacientes afectados por esta enfermedad. Los tratamientos empleados actualmente se centran en cuatro pilares: mantener la fuerza muscular, manejo de complicaciones respiratorias, prevenir y tratar las deformaciones óseas y alteraciones cardíacas asociadas.

El tratamiento sintomático más usado en la distrofia muscular de Duchenne (DMD) son los corticoesteroides en asociación de terapia física. Son capaces de frenar la progresión de la enfermedad, prolongar el tiempo de aparición de complicaciones, la deambulación autónoma y aumentar la fuerza muscular en los individuos afectados por la enfermedad. Dentro de este grupo de fármacos, los más utilizados son la prednisona y el Deflazacort. Es importante tener en cuenta su asociación con una gran cantidad de efectos adversos como la osteoporosis, alteraciones en el sistema nervioso central, diabetes o alteraciones gastrointestinales. Se recomienda emplear un tratamiento precoz, alrededor de los 5 años, en asociación con calcio y vitamina D para prevenir complicaciones óseas.

Una de las primeras estrategias en el desarrollo de nuevos tratamientos es la regulación positiva de la utrofina. Se trata de una proteína con propiedades fisicoquímicas y estructurales similares a la distrofina, ubicada en la unión neuromuscular que es

progresivamente sustituida por la distrofina a medida que el musculo madura. Este enfoque pretende la sustitución progresiva de la distrofina patológica por la utrofina en los músculos de pacientes con DMD.

Otro tratamiento potencial para los pacientes con DMD son las terapias basadas en células madre con gran capacidad para autorrenovarse y diferenciarse. Estas células madre pluripotenciales tienen capacidad de diferenciarse a células musculares sanas que sustituyan a las patológicas.

La terapia génica compone otro pilar importante en el desarrollo de nuevos tratamientos que tiene como objetivo restaurar la expresión de distrofina en el músculo. El principal inconveniente al que se enfrentan estas nuevas terapias es el gran tamaño del gen de la distrofina, demasiado grande para ser transportado por los vectores adenoasociados. Los ensayos clínicos recientes proponen como solución a este problema el empleo de una distrofina modificada, de tamaño reducido, cuyo uso derivaría en un fenotipo más leve.

Encontramos en el mercado un total de cuatro fármacos aprobados por la FDA basados en oligonucleótidos antisentido: Eteplirsén, Golodirsén, Viltolarsén y Casimersén. Para desarrollar este tipo de fármacos es necesario conocer el tipo de mutación que causa la enfermedad y la localización de dicho exón mutado frente al que irán dirigidos. Además, estos fármacos no tienen una finalidad curativa, sino que han demostrado ser eficaces para frenar la progresión de la enfermedad sólo si se emplea en las fases precoces, cuando el musculo todavía no ha sido sustituido por tejido conectivo o fibroso. Por ello se recomienda comenzar la terapia con estos fármacos lo antes posible, generalmente antes de los 7 años.<sup>78</sup>

El Eteplirsén constituye el primero fármaco desarrollado y aprobado por la FDA en el año 2016 para tratar la DMD. Se trata de un oligonucleótido morfolino de fosforodiamidato (PMO) dirigido de manera específica frente al exón 51 del gen DMD (Figura 18). Para ser susceptible a este tratamiento es necesario la presencia de mutaciones en el exón 51, con una prevalencia de aproximadamente el 13-14% en pacientes con DMD. Este fármaco actúa uniéndose al exón 51 mutado, haciendo que sea omitido durante la traducción, restaurando el marco de lectura y la capacidad del gen para producir una distrofina funcionante. Se trata de un agente modificador de la enfermedad, no la cura, pero si se ha demostrado que frena su progresión, originando un fenotipo más leve y aumentando los niveles de distrofina en el musculo de los pacientes con DMD. Se administra vía intravenosa, con una pauta semanal de 30mg/kg. Se elimina vía renal, sin sufrir metabolización hepática, teniendo una vida media baja de 3-4 horas, una pobre distribución y una unión a proteínas plasmáticas baja de entre el 6 y 17%.<sup>79</sup>

A pesar de su aprobación y de que las distintas evaluaciones clínicas y preclínicas han sido favorables, sigue siendo el protagonista de numerosos ensayos clínicos ya que sus interacciones, reacciones adversas y toxicidades, entre otros parámetros, son en parte desconocidos.<sup>80</sup> La atenuación del deterioro pulmonar y la deambulación son los beneficios más destacados que proporciona el Eteplirsén. Por otra parte, los efectos adversos recogidos hasta la fecha son de carácter leve-moderado, destacando los vómitos, diarrea, tos y nasofaringitis. También se han registrado otras reacciones locales de carácter leve asociadas a la administración del fármaco de carácter leve (eccema, inflamación, dolor o dermatitis en el lugar del catéter).<sup>81</sup>

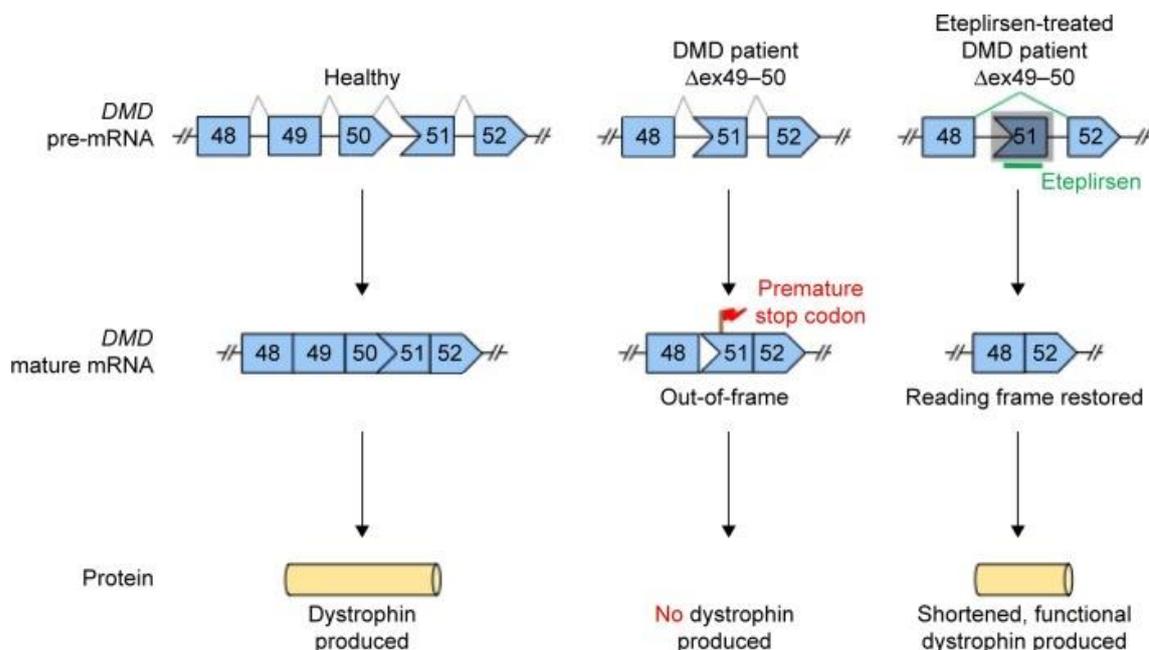


Figura 15. La figura representa el proceso de producción normal de distrofina, el mecanismo patológico de la DMD y el mecanismo de acción del Eteplirsen.<sup>79</sup>

El Golodirsén es aprobado en diciembre del 2019 para el tratamiento de la DMD asociada a mutaciones en el exón 53 del gen de la distrofina. Este oligonucleótido antisentido PMO se une y omite al exón 53 restaurando la producción de distrofina. Se administra vía intravenosa con una dosis de 4-30mg/kg/semana con una unión a proteínas plasmáticas de aproximadamente el 30%. Su vida media es de 3-4h, siendo eliminado vía renal sin metabolización hepática. Los efectos secundarios se observaron en un 20% de los pacientes tratados, siendo la mayoría de carácter leve: cefaleas, pirexia, caídas, dolor abdominal, tos, nasofaringitis, vómitos y náuseas. Se han registrado reacciones de hipersensibilidad en forma de exantemas, dermatitis, prurito y urticaria principalmente en el lugar de administración.<sup>82</sup>

En agosto del 2020, la FDA aprueba un tercer fármaco basado en ASOs para el tratamiento de la DMD denominado Viltolarsén (Figura 19). Se trata de un fármaco desarrollado en Japón dirigido frente al exón 53 del pre-RNA de la proteína Distrofina (gen DMD). Este oligonucleótido morfolino de fosfordiamidato (PMO) se une de manera específica al exón 53, omitiéndose durante el procesamiento del mRNA, restableciéndose el marco de lectura y produciéndose una distrofina funcional. Se administra vía intravenosa, mediante infusión lenta, una vez a la semana y con una dosis de 80mg/kg. Respecto a su farmacocinética y farmacodinámica, se trata de un fármaco con una vida media corta eliminado por vía renal sin ser modificado ni metabolizado. Presenta una biodisponibilidad del 100%, con una unión a proteínas plasmáticas independiente de concentración del 40%. Entre los efectos adversos más comunes encontramos tos, nasofaringitis, náuseas, vómitos e infecciones respiratorias. Es importante tener en cuenta la posibilidad de un efecto nefrotóxico, por lo que hay que controlar la función renal del paciente. Hay que recordar que los pacientes con DMD presentan alteraciones en la creatinina por los que hay que evitar usar este compuesto para medir y controlar la función renal.<sup>83</sup>

El mismo año que se aprueba este fármaco, *Jama Neurology* publica un ensayo clínico aleatorizado en fase 2 que evalúa la seguridad, eficacia y tolerancia del Viltolarsén. Se trata

de un ensayo clínico de 24 semanas en el que participaron 16 niños blancos de entre 4 y 9 años afectados por DMD. Los participantes fueron divididos en dos cohortes de dosis, de 8 pacientes cada una. Una cohorte recibió dosis bajas (40mg/kg) mientras que la otra recibió dosis altas (80mg/kg) vía intravenosa de manera semanal. Durante este periodo de tiempo no se observó ningún efecto adverso, interrupción del fármaco ni fue necesaria reducir la dosis de este. Además, se observó un aumento significativo de los niveles de distrofina en las biopsias de musculo de los participantes en comparación con las biopsias basales. También se observan grandes mejorías en la función muscular de los participantes medidas mediante pruebas cronométricas y evaluación de la fuerza muscular. En conclusión, el Viltolarsen ha demostrado tener una buena eficacia, tolerabilidad y buen perfil de seguridad, con pocos efectos adversos y principalmente de carácter leve siendo una buena opción terapéutica para hacer frente a la Distrofia Muscular de Duchenne.<sup>84</sup>

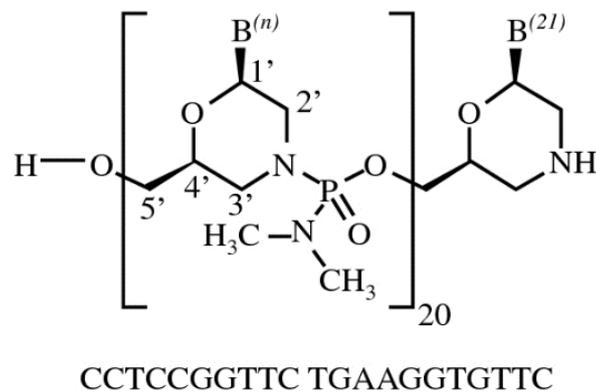


Figura 16. Estructura química del Viltolarsen.<sup>83</sup>

El Casimersen es el último fármaco aprobado hasta la fecha por la FDA para el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne en pacientes con una mutación en el exón 45 del gen DMD. Se trata de un PMO con un mecanismo de acción y características farmacocinéticas y farmacodinámicas similares al Eteplirsen y el Viltolarsen. Respecto al mecanismo de acción, la diferencia reside en el exón sobre que actúa. En este caso, el Casimersen se une al exón 45 a nivel pre-RNA del gen de la distrofina, provocando su omisión durante la síntesis del mRNA y aumentando los niveles de distrofina funcional. Tiene una vida media corta de 3-4h, siendo eliminado vía renal sin metabolización hepática. A nivel plasmático, podemos observar una unión a proteínas baja e independiente de concentración. Se administra vía intravenosa en una infusión de entre 4-30 mg/kg/semana. Los efectos adversos observados también son similares a los fármacos anteriores: infecciones del tracto respiratorio, tos, vómitos, pirexia, nefrotoxicidad además de cefaleas y artralgias. El Casimersen, por tanto, se trata de un fármaco generalmente bien tolerado, seguro y que está demostrando beneficios clínicos en los pacientes.<sup>85</sup>

Además, se está llevando a cabo un ensayo clínico en fase III denominado ESSENCE, doble ciego y controlado con placebo que evalúa la eficacia y seguridad del Casimersen. Los participantes, niños de entre 7 y 13 años, fueron aleatorizados en dos grupos. El primero recibió una dosis de 30mg/kg/día de Casimersen intravenoso y el segundo placebo intravenoso. Ambos grupos fueron observados durante 96 semanas, seguido de un periodo abierto de 48 semanas. Durante el estudio, los pacientes fueron sometidos a biopsias musculares que posteriormente se analizaban mediante Western Blot. Los resultados de la

biopsia en los participantes de la cohorte tratada con Casimersen mostraron un aumento significativo de los niveles de distrofina partir de la semana 48 de tratamiento en comparación con la biopsia basal y la biopsia del grupo de control. Además, la distrofina restaurada se encontraba correctamente localizada en el sarcolema. El Casimersen fue bien tolerado, eficaz y seguro con pocos efectos adversos registrados, todos de carácter leve.<sup>86</sup>

Existen otros fármacos en estudio en fases I y II que están mostrando resultados prometedores. De los candidatos en fase de desarrollo, el ATL1102 es el más avanzado y ha completado con éxito los ensayos en fase IIa. Este candidato a diferencia de los anteriores no tiene como objetivo restaurar la producción de distrofina, sino que trata la inflamación asociada a la enfermedad.<sup>87</sup>

Las terapias antisentido aprobadas por la FDA se encuentran todavía bajo investigación en numerosos ensayos clínicos en fase III longitudinales que evalúan el beneficio a largo plazo. Hasta el momento, la información obtenida nos permite afirmar que se trata de un grupo de fármacos eficaz, seguro y con pocos efectos adversos. La corta vida media y su baja acumulación en el plasma hace que sea poco probable que estos fármacos presenten interacciones con otros fármacos, enzimas y transportadores.

## 6 CONCLUSIONES

1. Los avances que han experimentado la nanomedicina y la secuenciación genómica en los últimos años han permitido el desarrollo de nuevos tratamientos basados en el uso de ácidos nucleicos, como los oligonucleótidos antisentido, frente a distintas enfermedades genéticas.
2. Las nuevas terapias basadas en oligonucleótido antisentido están obteniendo resultados prometedores con un gran potencial para transformar la forma en la que abordamos algunas enfermedades que carecían de tratamiento.
3. En las nuevas terapias basadas en oligonucleótidos sintéticos, las modificaciones químicas en los ácidos nucleicos son esenciales para aumentar la seguridad y eficacia. Aumentan su estabilidad, afinidad frente a la diana y disminuyen la toxicidad y efectos secundarios.
4. Para que el material genético llegue a su diana es necesario un transportador eficaz. Los vectores virales presentan desventajas como el riesgo para introducir mutaciones, una alta inmunogenicidad o una baja capacidad de carga que ha llevado al desarrollo de vectores no virales.
5. El transporte de oligonucleótidos mediante vehículos no virales puede realizarse mediante conjugación directa con el vector o mediante su incorporación a sistemas basados en nanopartículas.
6. Los principales vehículos no virales empleados son los lípidos. Otros vectores en desarrollo son los polímeros, los péptidos, los aptámeros y los anticuerpos.
7. La Distrofia Muscular de Duchenne es una enfermedad neuromuscular hereditaria que presenta en el mercado cuatro fármacos basados en oligonucleótidos antisentido aprobados para su tratamiento: Eteplirsén, Golodirsén, Viltolarsén, Casimersén.
8. Las terapias antisentido aprobadas hasta la fecha están obteniendo resultados óptimos, siendo fármacos seguros y con pocos efectos adversos. Sin embargo, todavía se encuentran bajo investigación con el objetivo de valorar sus beneficios a largo plazo.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Wirth, T.; Parker, N.; Ylä-Herttuala, S. History of Gene Therapy. *Gene* **2013**, *525* (2), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>.
- (2) Dawson, M. H.; Sia, R. H. P. In vitro transformation of pneumococcal types I. a technique for inducing transformation of pneumococcal types in vitro. *journal of experimental medicine* **1931**, *54* (5), 681–699. <https://doi.org/10.1084/jem.54.5.681>.
- (3) Friedmann, T.; Roblin, R. Gene Therapy for Human Genetic Disease? *Science (1979)* **1972**, *175* (4025), 949–955. <https://doi.org/10.1126/science.175.4025.949>.
- (4) Mercola, K. E.; Bar-Eli, M.; Stang, H. D.; Slamon, D. J.; cline, m. j. insertion of new genetic information into bone marrow cells of mice: comparison of two selectable genes. *ann y acad sci* **1982**, *397* (1), 272–280. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1982.tb43434.x>.
- (5) Hacein-Bey-Abina, S.; Hauer, J.; Lim, A.; Picard, C.; Wang, G. P.; Berry, C. C.; Martinache, C.; Rieux-Laucat, F.; Latour, S.; Belohradsky, B. H.; Leiva, L.; Sorensen, R.; Debré, M.; Casanova, J. L.; Blanche, S.; Durandy, A.; Bushman, F. D.; Fischer, A.; Cavazzana-Calvo, M. Efficacy of Gene Therapy for x-linked severe combined immunodeficiency. *new england journal of medicine* **2010**, *363* (4), 355–364. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1000164>.
- (6) Wilson, J. M. Gendicine: The First Commercial Gene Therapy Product; Chinese Translation of Editorial. <https://home.liebertpub.com/hum> **2005**, *16* (9), 1014–1015. <https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.1014>.
- (7) Ylä-Herttuala, S. Endgame: Glybera Finally Recommended for Approval as the First Gene Therapy Drug in the European Union. *Molecular Therapy* **2012**, *20* (10), 1831–1832. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.194>.
- (8) Bulaklak, K.; Gersbach, C. A. The Once and Future Gene Therapy. *Nature Communications* **2020**, *11*:1 **2020**, *11* (1), 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19505-2>.
- (9) Alnasser, S. M. Review on Mechanistic Strategy of Gene Therapy in the Treatment of Disease. *Gene* **2021**, *769*, 145246. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145246>.
- (10) Kumar, S. R.; Markusic, D. M.; Biswas, M.; High, K. A.; Herzog, R. W. Clinical Development of Gene Therapy: Results and Lessons from Recent Successes. *Mol Ther Methods Clin Dev* **2016**, *3*, 16034. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.34>.
- (11) *Overview of gene therapy, gene editing, and gene silencing - UpToDate*. <https://www.uptodate.com/contents/98724#H2437552793>.
- (12) Lostalé-Seijo, I.; Montenegro, J. Synthetic Materials at the Forefront of Gene Delivery. *Nature Reviews Chemistry* **2018**, *2*:10 **2018**, *2* (10), 258–277. <https://doi.org/10.1038/s41570-018-0039-1>.

(13) Sahin, U.; Karikó, K.; Türeci, Ö. mRNA-Based Therapeutics — Developing a New Class of Drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 2014 13:10 **2014**, 13 (10), 759–780. <https://doi.org/10.1038/nrd4278>.

(14) Layzer, J. M.; McCaffrey, A. P.; Tanner, A. K.; Huang, Z.; Kay, M. A.; Sullenger, B. A. In Vivo Activity of nuclease-resistant siRNAs. *rna* **2004**, 10 (5), 766–771. <https://doi.org/10.1261/rna.5239604>.

(15) Huang, P. J. J.; Liu, J. In Vitro Selection of Chemically Modified DNAzymes. *ChemistryOpen* **2020**, 9 (10), 1046–1059. <https://doi.org/10.1002/open.202000134>.

(16) *Antisense oligonucleotide*.

[https://illustratedglossary.nejm.org/term/antisense\\_oligonucleotide](https://illustratedglossary.nejm.org/term/antisense_oligonucleotide).

(17) Egli, M.; Manoharan, M. Chemistry, Structure and Function of Approved Oligonucleotide Therapeutics. *Nucleic Acids Res* **2023**, 51 (6), 2529–2573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad067>.

(18) Crooke, S. T.; Liang, X. H.; Baker, B. F.; Crooke, R. M. Antisense Technology: A Review. *Journal of Biological Chemistry* **2021**, 296, 100416. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100416>.

(19) Hammond, S. M.; Aartsma-Rus, A.; Alves, S.; Borgos, S. E.; Buijsen, R. A. M.; Collin, R. W. J.; Covello, G.; Denti, M. A.; Desviat, L. R.; Echevarría, L.; Foged, C.; Gaina, G.; Garanto, A.; Goyenvalle, A. T.; Guzowska, M.; Holodnuka, I.; Jones, D. R.; Krause, S.; Lehto, T.; Montolio, M.; Van Roon-Mom, W.; Arechavala-Gomez, V. Delivery of Oligonucleotide-based Therapeutics: Challenges and Opportunities. *EMBO Mol Med* **2021**, 13 (4). <https://doi.org/10.15252/emmm.202013243/asset/7a3d81e7-80e4-4cb6-a717-640573e67ae6/assets/graphic/emmm202013243-fig-0005-m.png>.

(20) *Oligonucleotide*. <https://illustrated-glossary.nejm.org/term/oligonucleotide>.

(21) Geary, R. S.; Norris, D.; Yu, R.; Bennett, C. F. Pharmacokinetics, Biodistribution and Cell Uptake of Antisense Oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* **2015**, 87, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.008>.

(22) Eckstein, F. Phosphorothioates, Essential Components of Therapeutic Oligonucleotides. <https://home.liebertpub.com/nat> **2014**, 24 (6), 374–387. <https://doi.org/10.1089/nat.2014.0506>.

(23) Bosgra, S.; Sipkens, J.; De Kimpe, S.; Den Besten, C.; Datson, N.; Van Deutekom, J. The Pharmacokinetics of 2'-O-Methyl Phosphorothioate Antisense Oligonucleotides: Experiences from Developing Exon Skipping Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. <https://home.liebertpub.com/nat> **2019**, 29 (6), 305–322. <https://doi.org/10.1089/NAT.2019.0805>.

(24) Partridge, W.; Xia, S.; Kwok, T. J.; Bhanot, S.; Geary, R. S.; Baker, B. F. Improvements in the Tolerability Profile of 2'-O-Methoxyethyl Chimeric Antisense Oligonucleotides in Parallel

with Advances in Design, Screening, and Other Methods. *Nucleic Acid Ther* **2021**, *31* (6), 417–426. [https://doi.org/10.1089/nat.2020.0917/suppl\\_file/supp\\_tables6.docx](https://doi.org/10.1089/nat.2020.0917/suppl_file/supp_tables6.docx).

(25) Chen, S.; Le, B. T.; Chakravarthy, M.; Kosbar, T. R.; Veedu, R. N. Systematic Evaluation of 2'-Fluoro Modified Chimeric Antisense Oligonucleotide-Mediated Exon Skipping in Vitro. *Scientific Reports* **2019**, *9* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42523-0>.

(26) Burdick, A. D.; Sciabola, S.; Mantena, S. R.; Hollingshead, B. D.; Stanton, R.; Warneke, J. A.; Zeng, M.; Martsen, E.; Medvedev, A.; Makarov, S. S.; Reed, L. A.; Davis, J. W.; Whiteley, L. O. Sequence Motifs Associated with Hepatotoxicity of Locked Nucleic Acid—Modified Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42* (8), 4882–4891. <https://doi.org/10.1093/nar/gku142>.

(27) Relizani, K.; Echevarría, L.; Zarrouki, F.; Gastaldi, C.; Dambrune, C.; Aupy, P.; Haeberli, A.; Komisarski, M.; Tensorer, T.; Larcher, T.; Svinartchouk, F.; Vaillend, C.; Garcia, L.; Goyenvalle, A. Palmitic Acid Conjugation Enhances Potency of Tricyclo-DNA Splice Switching Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **2022**, *50* (1), 17–34. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1199>.

(28) Shadid, M.; Badawi, M.; Abulrob, A. Antisense Oligonucleotides: Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2021**, *17* (11), 1281–1292. <https://doi.org/10.1080/17425255.2021.1992382>.

(29) Kundu, J.; Ghosh, A.; Ghosh, U.; Das, A.; Nagar, D.; Pattanayak, S.; Ghose, A.; Sinha, S. Synthesis of Phosphorodiamidate Morpholino Oligonucleotides Using Trityl and Fmoc Chemistry in an Automated Oligo Synthesizer. *Journal of Organic Chemistry* **2022**, *87* (15), 9466–9478. [https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c00265/suppl\\_file/jo2c00265\\_si\\_001.pdf](https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c00265/suppl_file/jo2c00265_si_001.pdf).

(30) Yavin, E. Peptide Nucleic Acids: Applications in Biomedical Sciences. *Molecules* **2020**, *Vol. 25*, Page 3317 **2020**, *25* (15), 3317. <https://doi.org/10.3390/molecules25153317>.

(31) Bennett, C. F.; Baker, B. F.; Pham, N.; Swayze, E.; Geary, R. S. Pharmacology of Antisense Drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2017**, *57* (Volume 57, 2017), 81–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104846/cite/refworks>.

(32) Cleal, K.; He, L.; Watson, P. D.; Jones, A. T. Endocytosis, Intracellular Traffic and Fate of Cell Penetrating Peptide Based Conjugates and Nanoparticles. *Curr Pharm Des* **2013**, *19* (16), 2878–2894. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990297>.

(33) Yan, Y.; Liu, X. Y.; Lu, A.; Wang, X. Y.; Jiang, L. X.; Wang, J. C. Non-Viral Vectors for RNA Delivery. *Journal of Controlled Release* **2022**, *342*, 241–279. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.008>.

(34) Juliano, R.; Bauman, J.; Kang, H.; Ming, X. Biological Barriers to Therapy with Antisense and siRNA Oligonucleotides. *Mol Pharm* **2009**, *6* (3), 686–695. [https://doi.org/10.1021/mp900093r/asset/images/medium/mp-2009-00093r\\_0005.gif](https://doi.org/10.1021/mp900093r/asset/images/medium/mp-2009-00093r_0005.gif).

- (35) Suk, J. S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L. M. PEGylation as a Strategy for Improving Nanoparticle-Based Drug and Gene Delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, *99*, 28–51. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2015.09.012>.
- (36) Foged, C.; Nielsen, H. M. Cell-Penetrating Peptides for Drug Delivery across Membrane Barriers. *Expert Opin Drug Deliv* **2008**, *5* (1), 105–117. <https://doi.org/10.1517/17425247.5.1.105>.
- (37) Boisguérin, P.; Deshayes, S.; Gait, M. J.; O'Donovan, L.; Godfrey, C.; Betts, C. A.; Wood, M. J. A.; Lebleu, B. Delivery of Therapeutic Oligonucleotides with Cell Penetrating Peptides. *Adv Drug Deliv Rev* **2015**, *87*, 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.008>.
- (38) Finicle, B. T.; Eckenstein, K. H.; Revenko, A. S.; Anderson, B. A.; Wan, W. B.; Mccracken, A. N.; Gil, D.; Fruman, D. A.; Hanessian, S.; Seth, P. P.; Edinger, A. L. Simultaneous Inhibition of Endocytic Recycling and Lysosomal Fusion Sensitizes Cells and Tissues to Oligonucleotide Therapeutics. *Nucleic Acids Res* **2023**, *51* (4), 1583–1599. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad023>.
- (39) Kim, Y. Drug Discovery Perspectives of Antisense Oligonucleotides. *Biomol Ther (Seoul)* **2023**, *31* (3), 241–252. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2023.001>.
- (40) Dhuri, K.; Bechtold, C.; Quijano, E.; Pham, H.; Gupta, A.; Vikram, A.; Bahal, R. Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *Journal of Clinical Medicine* **2020**, *Vol. 9, Page 2004* **2020**, *9* (6), 2004. <https://doi.org/10.3390/jcm9062004>.
- (41) Quemener, A. M.; Centomo, M. L.; Sax, S. L.; Panella, R. Small Drugs, Huge Impact: The Extraordinary Impact of Antisense Oligonucleotides in Research and Drug Development. *Molecules* **2022**, *Vol. 27, Page 536* **2022**, *27* (2), 536. <https://doi.org/10.3390/molecules27020536>.
- (42) Nimjee, S. M.; White, R. R.; Becker, R. C.; Sullenger, B. A. Aptamers as Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2017**, *57* (Volume 57, 2017), 61–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558/cite/refworks>.
- (43) Cao, J.; Zhang, F.; Xiong, W. Discovery of Aptamers and the Acceleration of the Development of Targeting Research in Ophthalmology. *Int J Nanomedicine* **2023**, *18*, 4421–4430. <https://doi.org/10.2147/ijn.s418115>.
- (44) Friedrich, M.; Aigner, A. Therapeutic siRNA: State-of-the-Art and Future Perspectives. *BioDrugs* **2022**, *36* (5), 549–571. <https://doi.org/10.1007/S40259-022-00549-3>.
- (45) Klabenkova, K.; Fokina, A.; Stetsenko, D. Chemistry of Peptide-Oligonucleotide Conjugates: A Review. *Molecules* **2021**, *Vol. 26, Page 5420* **2021**, *26* (17), 5420. <https://doi.org/10.3390/molecules26175420>.
- (46) Greene, M. A.; Worley, G. A.; Udoka, A. N. S.; Powell, R. R.; Bruce, T.; Klotz, J. L.; Bridges, W. C.; Duckett, S. K. Use of AgomiR and AntagomiR Technologies to Alter Satellite Cell Proliferation in Vitro, miRNA Expression, and Muscle Fiber Hypertrophy in Intrauterine

Growth-Restricted Lambs. *Front Mol Biosci* **2023**, *10*, 1286890. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1286890/bibtex>.

(47) Minz, R.; Sharma, P. K.; Negi, A.; Kesari, K. K. MicroRNAs-Based Theranostics against Anesthetic-Induced Neurotoxicity. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (7), 1833. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071833/s1>.

(48) Li, X.; Le, Y.; Zhang, Z.; Nian, X.; Liu, B.; Yang, X. Viral Vector-Based Gene Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24* (9), 7736. <https://doi.org/10.3390/ijms24097736>.

(49) Waehler, R.; Russell, S. J.; Curiel, D. T. Engineering Targeted Viral Vectors for Gene Therapy. *Nature Reviews Genetics* **2007**, *8* (8), 573–587. <https://doi.org/10.1038/nrg2141>.

(50) Ertl, H. C. J. Immunogenicity and Toxicity of AAV Gene Therapy. *Front Immunol* **2022**, *13*, 975803. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.975803/bibtex>.

(51) Wold, W. S. M.; Toth, K. Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. *Curr Gene Ther* **2014**, *13* (6), 421–433. <https://doi.org/10.2174/1566523213666131125095046>.

(52) Chen, Y. H.; Keiser, M. S.; Davidson, B. L. Viral Vectors for Gene Transfer. *Curr Protoc Mouse Biol* **2018**, *8* (4), e58. <https://doi.org/10.1002/cpmo.58>.

(53) Milone, M. C.; O’Doherty, U. Clinical Use of Lentiviral Vectors. *Leukemia* **2018**, *32* (7), 1529–1541. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0106-0>.

(54) Bulcha, J. T.; Wang, Y.; Ma, H.; Tai, P. W. L.; Gao, G. Viral Vector Platforms within the Gene Therapy Landscape. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2021**, *6* (1), 1–24. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>.

(55) Zu, H.; Gao, D. Non-Viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *AAPS Journal* **2021**, *23* (4), 1–12. <https://doi.org/10.1208/S12248-021-00608-7/tables/1>.

(56) Aied, A.; Greiser, U.; Pandit, A.; Wang, W. Polymer Gene Delivery: Overcoming the Obstacles. *Drug Discov Today* **2013**, *18* (21–22), 1090–1098. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.06.014>.

(57) Mastrobattista, E.; Hennink, W. E. Charged for Success. *Nature Materials* **2012**, *11* (1), 10–12. <https://doi.org/10.1038/nmat3209>.

(58) Liu, C.; Xie, Y.; Li, X.; Yao, X.; Wang, X.; Wang, M.; Li, Z.; Cao, F. Folic Acid/Peptides Modified PLGA–PEI–PEG Polymeric Vectors as Efficient Gene Delivery Vehicles: Synthesis, Characterization and Their Biological Performance. *Mol Biotechnol* **2021**, *63* (1), 63–79. <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00285-5/metrics>.

(59) Chis, A. A.; Dobrea, C. M.; Rus, L. L.; Frum, A.; Morgovan, C.; Butuca, A.; Totan, M.; Juncan, A. M.; Gligor, F. G.; Arseniu, A. M. Dendrimers as Non-Viral Vectors in Gene-Directed

Enzyme Prodrug Therapy. *Molecules* **2021**, Vol. 26, Page 5976 **2021**, 26 (19), 5976. <https://doi.org/10.3390/molecules26195976>.

(60) Fox, L. J.; Richardson, R. M.; Briscoe, W. H. PAMAM Dendrimer - Cell Membrane Interactions. *Adv Colloid Interface Sci* **2018**, 257, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.06.005>.

(61) Wang, C.; Pan, C.; Yong, H.; Wang, F.; Bo, T.; Zhao, Y.; Ma, B.; He, W.; Li, M. Emerging Non-Viral Vectors for Gene Delivery. *J Nanobiotechnology* **2023**, 21 (1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S12951-023-02044-5/figures/6>.

(62) Wahane, A.; Waghmode, A.; Kapphahn, A.; Dhuri, K.; Gupta, A.; Bahal, R. Role of Lipid-Based and Polymer-Based Non-Viral Vectors in Nucleic Acid Delivery for Next-Generation Gene Therapy. *Molecules* **2020**, Vol. 25, Page 2866 **2020**, 25 (12), 2866. <https://doi.org/10.3390/molecules25122866>.

(63) Cheng, X.; Lee, R. J. The Role of Helper Lipids in Lipid Nanoparticles (LNPs) Designed for Oligonucleotide Delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, 99, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.022>.

(64) Aoki, Y.; Wood, M. J. A. Emerging Oligonucleotide Therapeutics for Rare Neuromuscular Diseases. *J Neuromuscul Dis* **2021**, 8 (6), 869–884. <https://doi.org/10.3233/JND-200560>.

(65) Tai, W.; Gao, X. Functional Peptides for siRNA Delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2017**, 110–111, 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.08.004>.

(66) Lehto, T.; Ezzat, K.; Wood, M. J. A.; EL Andaloussi, S. Peptides for Nucleic Acid Delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, 106, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.008>.

(67) Yang, Y.; Liu, Z.; Ma, H.; Cao, M. Application of Peptides in Construction of Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Nanomaterials* **2022**, Vol. 12, Page 4076 **2022**, 12 (22), 4076. <https://doi.org/10.3390/nano12224076>.

(68) Ye, J.; Liu, E.; Yu, Z.; Pei, X.; Chen, S.; Zhang, P.; Shin, M. C.; Gong, J.; He, H.; Yang, V. C. CPP-Assisted Intracellular Drug Delivery, What Is Next? *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, Vol. 17, Page 1892 **2016**, 17 (11), 1892. <https://doi.org/10.3390/ijms17111892>.

(69) Ahmadi, S.; Arab, Z.; Safarkhani, M.; Nasser, B.; Rabiee, M.; Tahriri, M.; Webster, T. J.; Tayebi, L.; Rabiee, N. Aptamer Hybrid Nanocomplexes as Targeting Components for Antibiotic/Gene Delivery Systems and Diagnostics: A Review. *Int J Nanomedicine* **2020**, 15, 4237–4256. <https://doi.org/10.2147/ijn.s248736>.

(70) Carter, P. J.; Rajpal, A. Designing Antibodies as Therapeutics. *Cell* **2022**, 185 (15), 2789–2805. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.05.029>.

(71) Mary, P.; Servais, L.; Vialle, R. Neuromuscular Diseases: Diagnosis and Management. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research* **2018**, 104 (1), S89–S95. <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2017.04.019>.

- (72) Elangkovan, N.; Dickson, G. Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis* **2021**, *8* (s2), S303–S316. <https://doi.org/10.3233/jnd-210678>.
- (73) Duan, D.; Goemans, N.; Takeda, S.; Mercuri, E.; Aartsma-Rus, A. Duchenne Muscular Dystrophy. *Nature Reviews Disease Primers* **2021**, *7*:1 **2021**, *7* (1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00248-3>.
- (74) Yiu, E. M.; Kornberg, A. J. Duchenne Muscular Dystrophy. *J Paediatr Child Health* **2015**, *51* (8), 759–764. <https://doi.org/10.1111/jpc.12868>.
- (75) López-Hernández, L. B.; Vázquez-Cárdenas, N. A.; Luna-Padrón, E. Duchenne Muscular Dystrophy: Current Aspects and Perspectives on Treatment. *Rev Neurol* **2009**, *49* (7), 369–375. <https://doi.org/10.33588/rn.4907.2009059>.
- (76) Falzarano, M. S.; Scotton, C.; Passarelli, C.; Ferlini, A. Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Molecules* **2015**, *Vol. 20*, Pages 18168–18184 **2015**, *20* (10), 18168–18184. <https://doi.org/10.3390/molecules201018168>.
- (77) Nascimento Osorio, A.; Medina Cantillo, J.; Camacho Salas, A.; Madruga Garrido, M.; Vilchez Padilla, J. J. Consenso Para El Diagnóstico, Tratamiento y Seguimiento Del Paciente Con Distrofia Muscular de Duchenne. *Neurología* **2019**, *34* (7), 469–481. <https://doi.org/10.1016/J.nrl.2018.01.001>.
- (78) Czifrus, E.; Berlau, D. J. Viltolarsen: A Treatment Option for Duchenne Muscular Dystrophy Patients Who Are Amenable to Exon 53 Skipping Therapy. *Expert Rev Neurother* **2023**, *23* (10), 853–858. <https://doi.org/10.1080/14737175.2023.2246658>.
- (79) Lim, K. R. Q.; Maruyama, R.; Yokota, T. Eteplirsen in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Drug Des Devel Ther* **2017**, *11*, 533–545. <https://doi.org/10.2147/dddt.s97635>.
- (80) Mercuri, E.; Seferian, A. M.; Servais, L.; Deconinck, N.; Stevenson, H.; Ni, X.; Zhang, W.; East, L.; Yonren, S.; Muntoni, F.; Deconinck, N.; Van Coster, R.; Vanlander, A.; Seferian, A.; De Lucia, S.; Gidaro, T.; Brande, L. Vanden; Servais, L.; Kirschner, J.; Borell, S.; Mercuri, E.; Brogna, C.; Pane, M.; Fanelli, L.; Norcia, G.; Muntoni, F.; Brusa, C.; Chesshyre, M.; Maresh, K.; Pitchforth, J.; Schottlaender, L.; Scoto, M.; Silwal, A.; Trucco, F. Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Eteplirsen in Young Boys Aged 6–48 Months with Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 51 Skipping. *Neuromuscular Disorders* **2023**, *33* (6), 476–483. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2023.03.008>.
- (81) Mendell, J. R.; Khan, N.; Sha, N.; Eliopoulos, H.; McDonald, C. M.; Goemans, N.; Mercuri, E.; Lowes, L. P.; Alfano, L. N. Comparison of Long-Term Ambulatory Function in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy Treated with Eteplirsen and Matched Natural History Controls. *J Neuromuscul Dis* **2021**, *8* (4), 469–479. <https://doi.org/10.3233/jnd-200548>.
- (82) Heo, Y. A. Golodirsen: First Approval. *Drugs* **2020**, *80* (3), 329–333. <https://doi.org/10.1007/S40265-020-01267-2/metrics>.
- (83) Dhillon, S. Viltolarsen: First Approval. *Drugs* **2020**, *80* (10), 1027–1031. <https://doi.org/10.1007/S40265-020-01339-3/metrics>.

- (85) Clemens, P. R.; Rao, V. K.; Connolly, A. M.; Harper, A. D.; Mah, J. K.; Smith, E. C.; McDonald, C. M.; Zaidman, C. M.; Morgenroth, L. P.; Osaki, H.; Satou, Y.; Yamashita, T.; Hoffman, E. P. Safety, Tolerability, and Efficacy of Viltolarsen in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 53 Skipping: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol* **2020**, *77* (8), 982–991. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1264>.
- (85) Shirley, M. Casimersen: First Approval. *Drugs* **2021**, *81* (7), 875–879. <https://doi.org/10.1007/S40265-021-01512-2/metrics>.
- (86) Vasterling, M. E.; Maitiski, R. J.; Davis, B. A.; Barnes, J. E.; Kelkar, R. A.; Klapper, R. J.; Patel, H.; Ahmadzadeh, S.; Shekoochi, S.; Kaye, A. D.; Varrassi, G.; Vasterling, M.; Maitiski, R. J.; Davis, B. A.; Barnes, J. E.; Kelkar, R. A.; Klapper, R. J.; Patel, H.; Ahmadzadeh, S.; Shekoochi, S.; Kaye, A. D.; Varrassi, G. AMONDYS 45 (Casimersen), a Novel Antisense Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer: Clinical Considerations for Treatment in Duchenne Muscular Dystrophy. *Cureus* **2023**, *15* (12). <https://doi.org/10.7759/cureus.51237>.
- (87) Grijalvo, S.; Jorge, A. F.; Wilton-Clark, H.; Yokota, T. Recent Trends in Antisense Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *Pharmaceutics* **2023**, *Vol. 15*, Page 778 **2023**, *15* (3), 778. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030778>.