

# APLICACIONES DE LOS VECTORES NO VIRALES EN TERAPIA Y EDICIÓN GÉNICA: RETOS DE LA ACADEMIA Y LA INDUSTRIA

JUAN ANTONIO BUEREN,  
(CIEMAT; IIS Fundación Jiménez Díaz, CIBERER y RICORS/TERAV).

FRANCISCO MARTÍN MOLINA,  
(GENYO. Universidad de Granada. IBS.Granada RICORS/TERAV).

RAMÓN MARTÍNEZ MÁÑEZ,  
(Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico, Universitat Politècnica de València. CIBER-BBN), Instituto de Salud Carlos III).

AGUSTÍN G ZAPATA,  
(Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid. TERAV).

La red TERAV del Instituto de Salud Carlos III celebra todos los años una reunión técnica que revisa temas metodológicos de interés para sus grupos de investigación. En esta ocasión el tema elegido, herramientas no virales para terapia génica trascendía nuestra RETIC y resultaba de interés a CIBERs como el de “Enfermedades Raras” y el de “Bioingeniería, Biomateriales y Biomedicina” y a empresas biotecnológicas.

Consiguientemente, la reunión se articuló en un foro de alto nivel científico con la participación de ASEBIO, TERAV y los CIBERs mencionados. La reunión se organizó en dos sesiones, una dedicada al desarrollo de nuevos sistemas no virales, con especial énfasis en nanopartículas y la otra centrada en aplicaciones concretas de estos desarrollos para terapia génica.

En las últimas décadas, pese al éxito clínico de los vectores virales en la terapia génica, aún continúan existiendo retos que les impiden alcanzar todo su potencial. Estos inconvenientes han llevado a la búsqueda de nuevos sistemas de administración de material genético y de otras biomoléculas entre los que destacan los basados en nanopartículas sintéticas. **Ramón Martínez Máñez** del Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico, (IDM) (Universitat Politècnica de València). Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN),

Instituto de Salud Carlos III) introdujo la situación de estas tecnologías basadas en nanopartículas sintéticas. Estos vectores no virales presentan, en general, una reducida inmunogenicidad en comparación con los vectores virales, además de ser casi siempre más fáciles de producir y escalar. Pueden utilizarse como vectores no virales nanopartículas de diversos tipos que actúan como sistemas de entrega para transportar ácidos nucleicos y distintas biomoléculas idealmente hasta el sitio de acción deseado, protegiéndolos de la degradación y mejorando su estabilidad y biodisponibilidad. Hoy se conocen nanopartículas de innumerables tipos de materiales donde en muchas ocasiones es posible controlar su tamaño y forma, así como la estructura de su superficie y el fármaco/biomolécula con el que se carga. Las nanopartículas pueden además ser funcionalizadas con otras biomoléculas (típicamente anticuerpos, aptámeros o péptidos) para ser dirigidas a células o tejidos determinados, aumentando la selectividad y la



eficacia de la terapia. Aunque aún hay muchos problemas por resolver en función de la aplicación deseada, existen ejemplos de nanopartículas ya utilizadas en clínica incluyendo aquellas para la liberación de material genético tales como las vacunas del SARS-CoV-2 que transportan ARN mensajero de una de las proteínas del coronavirus.

Dentro del apartado de desarrollo de vectores no virales, **Gustavo Puras** (*Universidad del País Vasco. CIBER-BBN*) presentó resultados sobre nanopartículas lipídicas obtenidas por microfluídica, como plataforma para vehicular material genético. Las nanopartículas lipídicas obtenidas por auto ensamblaje de sus componentes en un chip microfluídico son utilizadas desde finales del 2020 por las compañías farmacéuticas Pfizer-BioNTech y Moderna como vectores para administrar las vacunas basadas en ARNm contra la COVID-19. En esta línea se están explorando otras posibles aplicaciones de estos sistemas para vehicular de una manera segura y eficaz, diferentes tipos de material genético, incluidas las herramientas de edición basadas en el sistema CRISPR/CAS9 y sus versiones mejoradas.

Sin embargo, desde un punto de vista tecnológico, sería deseable poder contar con una forma de dosificación sólida y estable de estos vectores no-virales, por ejemplo, en forma de polvo seco, que podría obtenerse ajustando los diferentes parámetros que intervienen en el proceso de liofilización, para mejorar de esta manera su manipulación y conservación.

La **Dra. Nora Ventosa** del grupo Nanomol-Bio (*Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona (ICMAB-CSIC),a (CIBER-BBN)*) presentó su investigación sobre "Nanovesículas estables para el desarrollo de nanofármacos para terapias génicas". El interés de este grupo es el de desarrollar nanovesículas no-liposomales (quatsomas), muy estables en el tiempo para la nanoformulación de biomoléculas terapéuticamente activas. Estas nanovesículas se producen mediante la tecnología DELOS, comercializada por la PyME Nanomol Technologies SL, empresa spin-off del CSIC, y que además se ha escalado e implementado bajo condiciones GMPs en el marco del proyecto Europeo Phoenix OITB, que tiene como objetivo establecer una red de infraestructuras para el desarrollo y la fabricación bajo GMPs de nanofármacos (<https://www.phoenix-oitb.eu/>). Dentro de este ámbito, el grupo Nanomol-Bio junto al Grupo de Trastornos Sanguíneos y Cáncer infantil del Instituto de Investigación VHIR ha desarrollado y patentado nanovesículas tipo quatsoma para el transporte de diferentes tipos de ácidos nucleicos (miARN, siARN, ADN,...). Estas nanovesículas compuestas por sustancias disponibles en grado farmacéutico, tienen propiedades óptimas para encapsular y transportar ácidos nucleicos con un tamaño inferior a 150 nanómetros y son estables en una solución líquida durante más de 6 meses; también tienen una sensibilidad al pH ajustable, lo que significa que diferentes niveles de pH pueden desencadenar diferentes respuestas. Además, son estables a temperatura ambiente, lo que evita problemas

asociados a los requisitos de la cadena del frío, y pueden inyectarse por vía intravenosa. La funcionalidad de estos quatsomas se ha demostrado en la entrega de microARN en un neuroblastoma, protegiéndolo de la degradación y aumentando su presencia en tumores de hígado, pulmón y xenoinjertos de neuroblastoma, entre otros.

Por su parte, el **Dr. Rafael Gómez** del grupo de la *Universidad de Alcalá* y perteneciente al CIBER-BBN describió el desarrollo de una plataforma sintética basada en dendrímeros carbosilano como agentes no virales para el transporte de ácidos nucleicos. Esta tecnología permite condensar el material nucleico en forma de nanoconjugados, protegerlos de la acción de enzimas e internalizarlos eficientemente en el interior de las células. Algunos de estos vectores no virales han mostrado su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica.

**Salvador Borros Gómez**, del *Grupo de Ingeniería de Materiales (GEMAT)*, ha desarrollado un sistema eficaz para recubrir diversos vectores virales con el fin de mejorar su eficacia terapéutica. Su enfoque se fundamenta en el uso de polímeros, específicamente Oligo Modified Poly ( $\beta$ -amino Ester), que pueden interactuar tanto electrostáticamente como covalentemente con la estructura de la cápsida vírica proporcionando una protección contra el reconocimiento por parte del sistema inmune, sin restringir su tropismo natural. Además, el grupo del Dr. Borrós es capaz de añadir a la estructura del polímero moléculas señalizadoras capaces de incrementar la localización de los vectores en las células deseadas cosa que permite disminuir notablemente la dosis a utilizar y, por consiguiente, disminuye los posibles efectos secundarios derivados del efecto "off-target". Esta innovadora solución abre las puertas a solucionar algunos de los mayores obstáculos de este tipo de terapias, como puede ser utilizar vectores virales en pacientes seropositivos, así como la opción de redosificación o la disminución de la dosis efectiva.

La **Dra. Rosario Sánchez Martín** del *Grupo Nano-Chem-Bio-GENYO* de la *Universidad de Granada* ha desarrollado distintas estrategias para llevar a cabo la administración selectiva que permite el transporte preciso y controlado de herramientas de edición génica, garantizando modificaciones específicas y eficientes, al tiempo que se minimizan los efectos no deseados. Concretamente describió una nueva nanoplataforma para la edición génica basada en la integración de ácidos nucleicos peptídicos modificados en nanopartículas multifuncionales como herramienta de liberación selectiva.

Finalmente, la **Dra. María Josefa Alonso Fernández** de *LiberaBio* y la *Universidad de Santiago de Compostela*, pionera en el desarrollo de vectores sintéticos innovadores, de naturaleza polimérica, con capacidad para llevar DNA, mRNA y miRNA a distintos órganos tejidos, describió

la optimización de estos vectores a base de lípidos y polímeros biocompatibles y biodegradables. Este método de preparación es escalable y el producto final puede ser liofilizado. La Dra. Alonso describió el potencial de estos vectores en diversos contextos terapéuticos: cáncer, enfermedades neurológicas, terapias celulares y vacunas.

La segunda parte del Foro se inició con la introducción al tema de los vectores virales por los **Drs Juan Antonio Bueren** (*CIEMAT; IIS Fundación Jiménez Díaz, CIBERER y RICORS/TERAV*) y **Francisco Martín Molina** (*GENYO. Universidad de Granada. IBS.Granada RICORS/TERAV*). Ambos investigadores resaltaron como después de algunos altibajos en la aplicación clínica de la terapia génica, actualmente vivimos una nueva era en la que un número cada vez mayor de terapias génicas *ex vivo* e *in vivo* han alcanzado su madurez, basándose en la mayoría de los casos en vectores virales. La razón del éxito de estos vectores radica en su eficacia, dado que utilizan los mecanismos naturales de los virus para entrar a las células diana y expresar los genes terapéuticos. Además, las últimas versiones de estos vectores, no expresan ningún gen viral y tienen unos niveles de seguridad biológica muy altos. No obstante, la transferencia de estas terapias a la práctica clínica está encontrando importantes restricciones tanto para su uso generalizado como para el desarrollo de las nuevas estrategias basadas en la edición genómica. Dos de las limitaciones más significativas son sin duda su elevado coste y la respuesta inmune que se genera frente a componentes del virus. En virtud de ello, una variedad de aproximaciones de terapia génica que no requieren el uso de dichos vectores se ha puesto ya en marcha. Entre ellos destacan las aproximaciones que utilizan electroporación ó diferente tipo de nanopartículas como medio de entrega de los genes terapéuticos (para terapia génica convencional) o de las moléculas que median los procesos de edición génica (para terapia génica dirigida). De hecho, ya se ha aprobado el primer medicamento basado en edición genómica, Casgevy, que utiliza electroporación del sistema CRISPR/Cas9 en células troncales hematopoyéticas para el tratamiento de la beta-talasemia y la anemia falciforme. A continuación, dentro del Foro se ilustraron algunos ejemplos de los desarrollos que actualmente están en marcha en España.

El **Dr. Álvaro Somoza** del *IMDEA Nanociencia (Madrid)* presentó sus resultados sobre una nanomedicina para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, donde se han combinado distintos ácidos nucleicos. El sistema se ha evaluado en modelos celulares y animales, observándose que es capaz de activar la regeneración de las células musculares sin mostrar una toxicidad significativa.

Por su parte, **Begoña Sot** del *CIEMAT; IIS Fundación Jiménez Díaz, CIBERER, RICORS/TERAV, IMDEA*

*Nanociencia*. describió sus resultados sobre el desarrollo de vehículos basados en nanopartículas (oro, magnéticas, lipídicas y proteicas) para la entrega de ribonucleoproteínas, tanto de Cas9 como de Cas12. Por ejemplo, se han desarrollado nanocomplejos de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro y ribonucleoproteína, aprovechando distintos tipos de interacción. Estos nanocomplejos son internalizados por distintas líneas celulares, incluidas células primarias, donde la RNP es liberada y produce edición génica.

De las mismas Instituciones, la **Dra Begoña Díaz** en colaboración con el CIMA y la Clínica de Navarra, han desarrollado un protocolo el que se usan los transposones de la familia *Sleeping beauty* para llevar a cabo el desarrollo de células CAR-T. La potencia y seguridad del producto han sido ensayados en modelos animales y en líneas celulares de pacientes, observándose que su eficacia y seguridad son equivalentes a los producidos con un vector lentiviral. Gracias a estos resultados, la AEMPS ha aprobado la realización de un ensayo clínico dentro de la Red TERAV para el tratamiento de pacientes con linfoma, que dará comienzo a lo largo del presente año.

Otro investigador del CIEMAT; IIS Fundación Jiménez Díaz, CIBERER y RICORS/TERAV, **Óscar Quintana**, explicó que, en la actualidad, es posible realizar procesos de “knock-in” muy eficaces en progenitores hematopoyéticos gracias a la combinación de la electroporación de las herramientas de edición génica del sistema CRISPR/Cas9, con la transducción de vectores virales para la introducción de la secuencia terapéutica. Sin embargo, esta estrategia de edición génica tiene importantes limitaciones, como son su complejidad, reproducibilidad, elevado coste y su dificultad de escalado. Por lo tanto, es necesario mejorar, sobre todo los mecanismos de entrada de las herramientas de edición génica en las células, donde las distintas plataformas de nanopartículas se presentan como vehículos ideales. Para que las nanopartículas puedan actuar como vehículos de terapia génica eficaces se deben desarrollar sistemas que permitan la entrega de las herramientas de edición génica, así como la secuencia terapéutica, y que una vez dentro de la célula sea transportada al núcleo celular en donde realizarse el proceso de “knock-in”. Para conseguirlo, el grupo del CIEMAT está trabajando en identificar las condiciones más eficientes de transfección de progenitores hematopoyéticos humanos mediante nanopartículas lipídicas, en colaboración con el grupo del Dr Pedraz (Universidad del País Vasco. CIBER-BBN). En la actualidad, se ha conseguido transfectar casi la totalidad de los progenitores hematopoyéticos con ARNm que codifica un gen marcador. Por otro lado, estamos desarrollando sistemas que favorecen la entrada al núcleo celular de secuencias de ADN. Todo ello permitirá el uso de los sistemas de nanopartículas en las estrategias “knock-in” para el tratamiento de enfermedades hematopoyéticas

hereditarias.

Como ejemplo de la relevancia de la colaboración público-privada para los retos planteados en este foro, la **Dra María de la Fuente** de la empresa DIVERSA especializada en el ámbito de la nanomedicina y la tecnología farmacéutica, explicó su tecnología patentada de nanoemulsiones y nanopartículas lipídicas, en el ámbito de la terapia génica. La tecnología DIVERSA es segura, escalable, y ha demostrado eficacia en diferentes indicaciones, a través de colaboraciones específicas con el ámbito público y privado.

El modelo de negocio de DIVERSA se apoya en tres elementos:

1. Ofrecer al personal investigador una manera simple y eficaz de evaluar sus moléculas terapéuticas de interés, mediante la venta de nuestra tecnología en formato de reactivo de laboratorio.
2. Establecer acuerdos de colaboración para diseñar y desarrollar nanomedicamentos adaptados a indicaciones específicas, favoreciendo la colaboración de empresas y grupos de investigación en sus proyectos.
3. Dirigir nuestros propios proyectos de investigación con el objetivo de avanzar en áreas terapéuticas específicas, como oncología y enfermedades raras.

La misión de DIVERSA es facilitar la transición de nuevas moléculas terapéuticas hacia la clínica, y nuestra visión, mejorar la calidad de vida de los pacientes abriendo nuevas oportunidades para el desarrollo de medicamentos innovadores

Los coordinadores de las dos sesiones del Foro Ramón Martínez Mañez, Juan A. Bueren y Francisco Martín Molina resumieron las distintas presentaciones poniendo de relieve la importancia de que expertos en terapia génica y en desarrollo de sistemas de transferencia no virales colaboren estrechamente para avanzar conjuntamente hacia la generación de estrategias de terapia génica más sostenibles y de una mayor aplicabilidad. Se hizo énfasis en la necesidad de aprender de los éxitos y las limitaciones de la terapia génica basada en sistemas virales para avanzar hacia esas estrategias, haciendo hincapié en que esto solo puede lograrse mediante colaboraciones multidisciplinares entre investigadores básicos y clínicos, reguladores y empresas que trabajen de manera conjunta. En la actualidad, España cuenta con un nutrido número de laboratorios que han venido trabajando en diferentes niveles de investigación relacionados con la terapia y edición génica, así como con el desarrollo de diferente tipo de nanopartículas. De igual importancia, la sinergia que puede surgir como consecuencia del trabajo cooperativo de Instituciones públicas y privadas que trabajan en estos dos campos puede suponer un importante liderazgo de nuestro país en la nueva era de la terapia y edición génica basada en su mayor accesibilidad a los sistemas públicos de salud.