



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: SISTEMAS DE LIBERACIÓN EN
TERAPIA GÉNICA DE PATOLOGÍAS
HUÉRFANAS DEL SEGMENTO POSTERIOR
DEL OJO**

Autor: Ignacio Hernández Martín

Tutor: María del Rocío Herrero Vanrell

Convocatoria: Febrero 2017

RESUMEN

Las enfermedades huérfanas del segmento posterior del ojo son patologías de naturaleza genética, de baja prevalencia y que producen ceguera irreversible en la mayoría de los pacientes. Su tratamiento requiere el empleo de material genético como sustancias activas. Al tratarse de patologías localizadas en la retina, el acceso de las mismas empleando las vías de administración convencionales se ve dificultado. Por ello, se hace evidente la necesidad del desarrollo de sistemas de liberación formulados específicamente para lograr alcanzar la diana terapéutica y conseguir que el efecto se mantenga durante un tiempo prolongado. Además, resulta importante la elección de la vía de administración más adecuada para este tipo de sistemas.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 TERAPIA GÉNICA

La terapia génica se define como la transferencia de material genético en las células de un individuo con una finalidad terapéutica. Para llevar a cabo esta transferencia, se puede recurrir a la administración intravenosa o en un órgano determinado de vectores de liberación de genes, dándose así los fenómenos de transferencia de ADN, transferencia de ARN de interferencia (RNAi) o de algún oligonucleótido antisentido con el objeto de inhibir la expresión de un gen, o fenómenos de reparación de un gen defectuoso¹.

Actualmente la terapia génica constituye una alternativa terapéutica de gran valor en el tratamiento de enfermedades oftálmicas con etiologías muy diversas como son las enfermedades huérfanas que afectan al segmento posterior del ojo. Dichas patologías son generalmente genéticas, de baja prevalencia, con un alto nivel de complejidad y generan una elevada incapacidad al paciente. A pesar de su gran utilidad, el obstáculo de la terapia reside en la dificultad de la incorporación del material genético en el interior de la célula. Gracias a los avances científicos desarrollados en este campo, existen líneas de investigación que se dedican al estudio de nuevos sistemas de “liberación” de genes².

¹ Pérez-López J. Terapia génica en el tratamiento de los errores congénitos del metabolismo. Med Clin (Barc). 2013;142(12):549-553.

² Thassu D, Deleers M, Pathak Y. Nanoparticulate drug delivery systems. 1ª Edición. New York: Informa Healthcare; 2007. p. 291.

En general, los sistemas de liberación en terapia génica se clasifican en dos grandes grupos: aquellos basados en vectores virales, y aquellos basados en vectores no virales. La tendencia actual es desarrollar sistemas vectoriales no virales ya que, a pesar de que los vectores virales han demostrado una mayor eficiencia a la hora de transferir los genes empleados como sustancias activas, su uso se ha relacionado con el aumento de respuestas inmunes en el individuo. Por ello, el diseño de vectores no virales mínimamente invasivos y con un amplio margen de seguridad para el paciente constituye un objetivo fundamental a la hora de llevar a cabo el desarrollo galénico de nuevas formas de administración. De hecho, hoy en día, el éxito de la terapia génica se basa tanto en la seguridad del vector de expresión como en la eficiencia de la expresión génica³.

1.2 EL OJO

El ojo o globo ocular es el órgano de la visión. Posee una forma esférica y se encuentra ubicado en el interior de la cavidad orbitaria, rodeado por grasa. El ojo presenta, a su vez, tres capas que lo conforman y las cuales se diferencian unas de otras tanto en su función como en contenido. Estas tres capas son:

- **Túnica externa:** se encuentra localizada en la superficie del ojo. Es la cubierta que protege al ojo y está compuesta casi exclusivamente de tejido conectivo denso, sin vasos, y con abundancia de colágeno. Constituye una capa resistente, formada a su vez por dos segmentos: la córnea y la esclerótica.
- **Túnica media:** formada por el iris, el cuerpo ciliar y el coroides. Forma la zona vascular del ojo con una elevada presencia de vasos sanguíneos y tejido conectivo, fundamentalmente.
- **Túnica interna o retina:** constituye la capa de tejido neural que tapiza el interior del ojo donde se ubican los fotorreceptores⁴. En ella, se desarrolla el proceso de la visión, cuyos estímulos visuales serán transmitidos a través de vías nerviosas al resto del ojo. Debido a su papel principal en el comienzo del proceso de la visión, en la retina se ubican tres componentes celulares distintos: elementos neuronales, elementos gliales y

³ Sai P., Damgé Ch., Rivereau A.S., Hoeltzel A. y Guoin E. Prophylactic oral administration of metabolically active insulin entrapped in isobutylcyanoacrylate nanocapsules reduces the incidence of diabetes in nonobese diabetic mice. J. Autoimmun. 1996;9(6):713-22.

⁴ Maldonado López, M; Pastor Jimeno, J. Guiones de oftalmología. 2ª Edición. Madrid: McGraw-Hill; 2012. p. 4.

células pigmentarias. A su vez, la retina está integrada por dos capas: el epitelio pigmentario y el neuroepitelio.

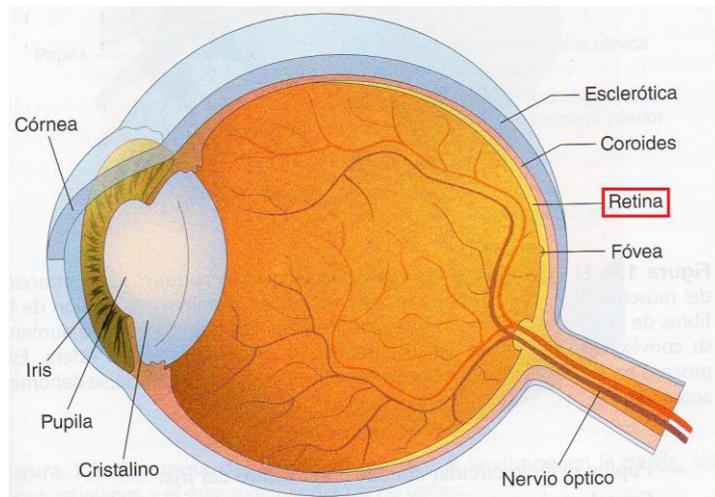


FIGURA 1 - PARTES DEL OJO. Fuente: Maldonado López, M; Pastor Jimeno, J. Guiones de oftalmología. 2ª Edición. Madrid: McGraw-Hill; 2012. p. 3.

El epitelio pigmentario está formado por una única capa de células que conectan directamente con la coroides ubicada en la túnica media. Estas células presentan un elevado contenido en un pigmento llamado melanina, que aporta una de sus principales funciones como es la absorción de radiaciones luminosas. La siguiente capa, el neuroepitelio, está formado a su vez por nueve capas distintas: capa de fotorreceptores, limitante externa, nuclear externa, capa de Henle, nuclear interna, plexiforme interna, capa de células ganglionares, capa de fibras del nervio óptico, y la capa limitante interna.

Los elementos neuronales juegan un papel muy importante a la hora de recoger, elaborar y transmitir a través de vías nerviosas los estímulos sensoriales encargados de la visión. Destacan fundamentalmente los fotorreceptores, encargados de absorber las radiaciones de la luz y transformarlas en impulsos eléctricos. Son de dos tipos: conos, encargados de la visión fotópica y de los colores; y bastones, encargados de la visión escotópica. Otros elementos neuronales que juegan un papel importante son las células bipolares, encargadas del primer paso en la transmisión del impulso eléctrico en la vía óptica; las células ganglionares, que constituyen la segunda neurona en esa vía óptica; y un conjunto de células horizontales y de asociación que conectan de forma aferente y eferente con el resto del entramado nervioso de la visión.

En la retina destacan fundamentalmente dos zonas diferenciadas: la mácula y la papila. Respecto a la primera, es la encargada de la visión fina, con una alta presencia de conos y una sola capa de células ganglionares, y en cuya zona central presenta una zona más oscura y ligeramente deprimida que es la fovea. Por otro lado, la papila (conocida también como “punto ciego”) carece de elementos neuronales ya que sirve como zona de salida de los axones de las células ganglionares que realizan sus sinapsis en el nervio óptico.

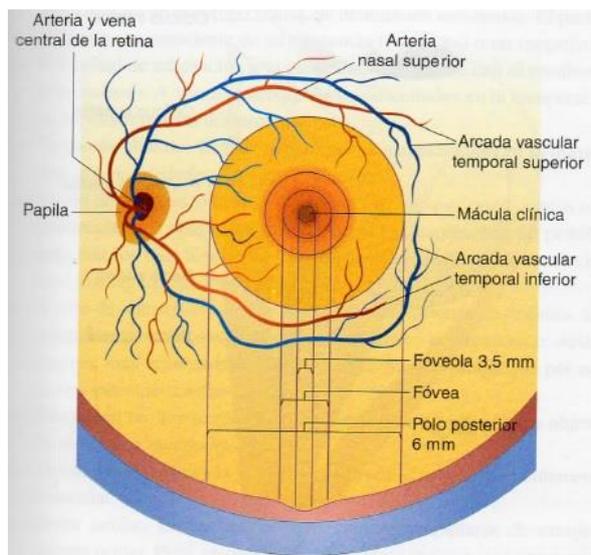


FIGURA 2 – ESQUEMA DEL FONDO DE OJO. Fuente: Maldonado López, M; Pastor Jimeno, J. Guiones de oftalmología. 2ª Edición. Madrid: McGraw-Hill; 2012. p. 5.

Otra división interesante desde el punto de vista anatómico consiste en dividir al globo ocular en dos segmentos. Así, el segmento anterior, bañado por el humor acuoso, se localiza entre la córnea y el cristalino, y cumple la función principal de enfocar los rayos de luz sobre la retina. Por otro lado, el segmento posterior del ojo, bañado por el humor vítreo, se localiza entre el cristalino y la esclerótica, y en ella se encuentran estructuras como la retina o el coroides que van a resultar afectadas por las distintas enfermedades que se describen a continuación.

1.3 TERAPIA GÉNICA Y PATOLOGÍAS OFTÁLMICAS DEL SEGMENTO POSTERIOR

Como ya se señaló anteriormente existen patologías oculares huérfanas que se beneficiarían de la utilización de la terapia génica. Dentro de ellas se encuentran las siguientes:

- a. Retinitis/retinosis pigmentaria:** constituye la variante más común dentro de las patologías relacionadas con la degeneración de la retina, siendo la responsable de la pérdida de visión en una de cada 4000 personas a nivel mundial. Esta patología puede estar causada por defectos en algunos de los más de 60 genes autosómicos dominantes, autosómicos recesivos, o ligados al cromosoma X⁵. Al comienzo de la enfermedad, el primer síntoma que a menudo percibe el paciente es la ceguera nocturna, la cual va acompañada a su vez por pérdida de la visión. Dicha pérdida comienza en la zona periférica media y va extendiéndose poco a poco hacia la zona central, ocasionando la llamada visión de túnel.⁶

A nivel celular, estos fenotipos están correlacionados con una afección principal del sistema de células fotorreceptoras. Los fotorreceptores afectados entran en apoptosis, lo cual conduce a una reducción del espesor de la capa nuclear externa de la retina, y a la formación de lesiones y/o depósitos de pigmentos retinianos en el fondo⁷. En primer lugar, se afectan los bastones, mientras que en una fase avanzada de la enfermedad el otro tipo de células fotorreceptoras, los conos, podrían verse también afectadas, ocasionando una ceguera completa.

- b. Coroideremia:** distrofia coriorretiniana asociada al cromosoma X, caracterizada por una atrofia progresiva de la coroides, el epitelio pigmentario de la retina, y los fotorreceptores. Afecta en un mayor porcentaje a los hombres, con una prevalencia estimada de 1 por cada 50.000 individuos⁸. Esta patología se produce por la mutación en el gen CHM, el cual codifica para una proteína de expresión ubicua conocida como REP-1, la cual lleva a cabo la unión a las proteínas tipo Rab. Estas últimas son una familia de GTPasas encargadas fundamentalmente del transporte vesicular en el interior celular; en concreto, esta proteína REP-1 realiza una modificación postraduccional isoprenílica de las proteínas Rab para que así estas, en última

⁵ Petrs-Silva H., Linden R. Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa. Clin. Ophthalmol. 2014;8:127-136.

⁶ Hamel C. Retinitis Pigmentosa. Orphanet. J. Rare Dis. 2006;1:40.

⁷ Berger W., Kloeckener-Gruissem B., Neidhardt J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. Prog. Retin. Eye Res. 2010;29(5):335-75.

⁸ Kalatzis V., Hamel C.P., MacDonald I.M. Choroideremia: towards a therapy. Am. J. Ophthalmol. 2013;156(3):433-7.

instancia, lleven a cabo el control de la formación de vesículas, su movimiento, acoplamiento y fusión. La mutación en este gen causa defectos en la membrana intracelular en las diferentes vías de señalización⁹, pues se da lugar a una proteína errónea o ausencia de la misma que ocasiona finalmente muerte celular por apoptosis.

Los pacientes afectados por esta patología conservan una agudeza visual generalmente buena hasta que se produce la afectación de la fovea. Estudios previos llevados a cabo en humanos indican que, en un estadio más avanzado de la enfermedad, la pérdida de agudeza visual puede estar relacionada con un componente reversible¹⁰.

c. Degeneración macular asociada a la edad (DMAE): constituye la primera causa para el desarrollo de ceguera irreversible en personas mayores de 50 años en el mundo desarrollado¹¹. Es una enfermedad sobre la cual los conocimientos relacionados con el estudio de su contribución genética son todavía insuficientes. Sin embargo, actualmente existen consorcios como The AMD Gene Consortium que apuestan firmemente por esta contribución genética como uno de los factores más importantes a la hora de establecerse esta patología. Dicha afirmación se basa en la identificación de determinados genes que podrían estar involucrados con el riesgo a desarrollar la DMAE. La DMAE afecta a la visión central del paciente y a su agudeza visual tanto a larga como a corta distancia, además de afectar a la discriminación de colores, a la sensibilidad en el contraste...

d. Enfermedad de Stargardt: es la forma más frecuente de degeneración macular heredada juvenil. De hecho, las cifras de edad a las que normalmente se establece el diagnóstico de esta patología suelen darse en torno a los 20 años de edad. Se caracteriza, a nivel clínico, por una pérdida de la visión central, progresiva e

⁹ Gordiyenko N.V., Fariss R.N., Zhi C., MacDonald I.M. Silencing of the CHM gene alters phagocytic and secretory pathways in the retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol.* 2010;51(2):1143-1150.

¹⁰ Sieving P.A., Caruso R.C., Tao W., Coleman H.R., Thompson D.J., Fullmer K.R., Bush R.A. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006;103(10):3896-901.

¹¹ Solinís M.A., del Pozo-Rodríguez A., Apaolaza P.S., Rodríguez-Gascón A. Treatment of ocular disorders by gene therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015; 95:331-342.

irreversible; y por la aparición de problemas de adaptación del ojo a la oscuridad. A nivel genético, la enfermedad tiene un patrón de herencia autosómico recesivo¹². El gen involucrado en el desarrollo de la enfermedad es el gen ABCA4. Las múltiples mutaciones en este gen pueden causar esa pérdida de visión central característica de esta enfermedad, ya que este gen codifica para una proteína de la familia de los transportadores ABC¹³, concretamente la proteína ABCA4, la cual se expresa de manera selectiva en los conos de la retina. Esta proteína es la encargada de transportar sustancias tóxicas al exterior, de forma que no entren en contacto con los conos. Las mutaciones que se producen en este gen dan lugar a proteínas erróneas que son incapaces de transportar esas sustancias tóxicas, produciéndose un acumulo de estas en la retina (especialmente de lipofucsina) que conduce finalmente a muerte celular.

- e. **Síndrome de Usher:** es una enfermedad autosómica recesiva debida a alteraciones en 10 genes, las cuales conllevan al desarrollo de la enfermedad que se caracteriza principalmente por la aparición de sordera congénita asociada y desarrollo progresivo de retinosis pigmentaria. Dentro de esta enfermedad existen varios subtipos, siendo el 1 (y en concreto el 1B) el más interesante desde el punto de vista de la terapia génica. En este caso, la mutación se produce en el gen MYO7A, el cual codifica para una proteína miosina no convencional con acción motora llamada miosina VIIa, localizada en el epitelio pigmentario de la retina y/o en los fotorreceptores¹⁴. La pérdida de la funcionalidad de esta proteína por mutaciones en el gen conlleva a que el paciente desarrolle de manera progresiva ceguera.

- f. **Amaurosis congénita de Leber (LCA):** es una enfermedad autosómica recesiva debida a la mutación en, al menos, 15 genes¹⁵. Los pacientes que padecen esta enfermedad sufren de una marcada discapacidad de la agudeza visual al nacimiento, o

¹² Binley K., Widdowson P., Loader J., Kelleher M., Iqbal S., Ferrige G. et al. Transduction of photoreceptors with equine infectious anemia virus lentiviral vectors: safety and biodistribution of StarGen for Stargardt disease, Invest. Ophthalmol. 2013;54(6):4061-4071.

¹³ Allikmets R., Singh N., Sun H., Shroyer N.F., Hutchinson A., Chidambaram A. et al. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. Nat. Genet. 1997;15(3):236-46.

¹⁴ Zallocchi M., Binley K., Lad Y., Ellis S., Widdowson P., Iqbal S. et al. EIAV-based retinal gene therapy in the shaker1 mouse model for usher syndrome type 1B: development of UshStat. PLoS ONE. 2014;9(4):e94272.

¹⁵ Al-Saikhan F.I. The gene therapy revolution in ophthalmology. Saudi J. Ophthalmol. 2013;27(2):107-11.

durante los seis primeros meses de vida, con pupilas que reaccionan pobremente a los estímulos externos y con una actividad en el electroretinograma disminuida o no detectable.

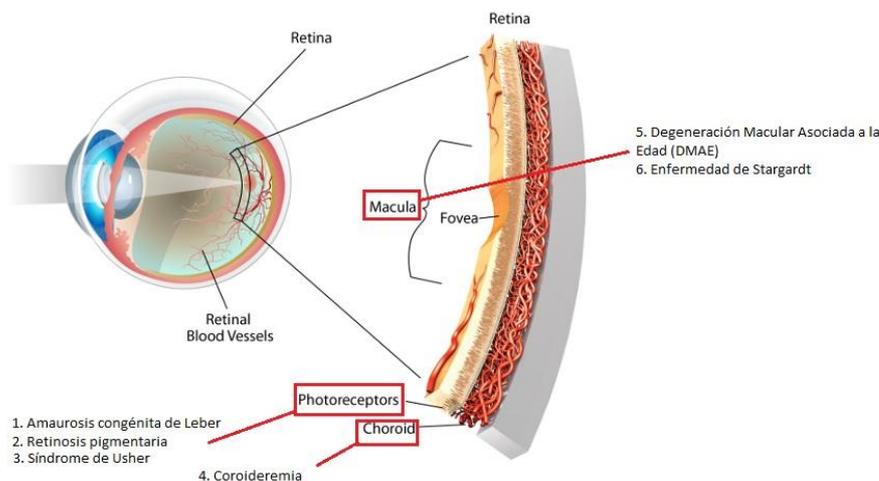


FIGURA 3 – ENFERMEDADES HUÉRFANAS DEL SEGMENTO POSTERIOR DEL OJO. Fuente: The Angiogenesis Foundation. [Internet]. 2013 [citado el 25 de enero de 2017]. Disponible en: <http://www.scienceofme.org/wp-content/uploads/2013/07/retina-macula.png>

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo ha sido la búsqueda de distintos sistemas de terapia génica viral y no viral para el tratamiento de patologías huérfanas que afectan al segmento posterior del ojo, así como las posibles vías de administración. Para ello, se ha llevado a cabo la descripción de cada sistema y de las distintas vías de administración. Finalmente, se han seleccionado los sistemas y las vías de administración más idóneas para este tipo de tratamiento.

3. METODOLOGÍA

Se ha realizado una revisión bibliográfica de los distintos sistemas de liberación (virales y no virales) empleados en el tratamiento de algunas enfermedades huérfanas del segmento posterior del ojo. Se hace especial hincapié en los sistemas que se emplean en la terapéutica actual y/o que son objeto de estudios científicos recientes. Se describen también las vías de administración que podrían emplearse para este tipo de terapia. La información se ha recogido a partir de la búsqueda y revisión de artículos en diversas bases de datos como Pubmed y de manuales de Tecnología Farmacéutica, Oftalmología y Farmacología Ocular.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 TIPOS DE TERAPIA GÉNICA EMPLEADOS EN OFTALMOLOGÍA PARA EL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS DEL SEGMENTO POSTERIOR.

4.1.1-VECTORES VIRALES.

En la actualidad y tal como se ha mencionado al comienzo del texto, la administración intravenosa o local de vectores que contengan el gen de interés para su posterior liberación, representa la primera opción para el tratamiento de las patologías oftálmicas con un componente genético. Sin embargo, la liberación del material genético en el lugar específico constituye la barrera más importante en este tipo de terapia, pues el acceso al interior del ojo está dificultado por la propia anatomía del mismo. En general, hay tres criterios básicos para el desarrollo adecuado de un vector de liberación: en primer lugar, debe ser capaz de contener el material genético en su interior, y en segundo lugar proceder a su liberación de manera eficiente en las células una vez administrado. Como se ha señalado anteriormente, dentro de estos vectores se distinguen fundamentalmente dos tipos que se clasifican atendiendo al nombre de virales y no virales. A continuación, se describen los vectores de tipo viral.

A día de hoy, los vectores virales continúan siendo el sistema de liberación de genes de elección para el tratamiento de patologías oculares¹⁶. Estos vectores están basados en la sustitución del material genético del virus por un ácido nucleico terapéutico, el cual posteriormente será liberado en la célula diana. Según sus constituyentes, los vectores virales se clasifican en vectores adenovirales, vectores virales adenoasociados, vectores lentivirales y vectores retrovirales. A continuación, se desarrolla cada uno de ellos:

- A. Vectores adenovirales:** los adenovirus son vectores formados por ADN de cadena doble, muy estables, capaces de transfectar con la misma eficacia tanto a células quiescentes como a células en división. Aparte de ello, no integran su ácido nucleico en el genoma del huésped, lo que ayuda a evitar el riesgo de mutagénesis. Además, son fáciles de amplificar y purificar, y pueden incorporar genes de elevado tamaño. Dentro de este grupo de vectores virales, los adenovirus recombinantes (rAds) son los más indicados en patologías relacionadas con la retina, pues han demostrado eficacia

¹⁶ Liu M.M., Tuo J., Chan C.C. Gene therapy for ocular diseases. Br. J. Ophthalmol. 2011;95(5):604-612.

ex vivo en modelos animales de retinitis pigmentosa¹⁷ o de degeneración macular asociada a la edad mediante administración intravítrea^{18,19}. Sin embargo, los adenovirus de forma general presentan inconvenientes como son una corta duración de la expresión del gen²⁰, y la posible inducción de una respuesta inmune en el paciente²¹.

B. Vectores virales adenoasociados: en este caso, son vectores formados por ADN de cadena simple que, al infectar la célula objetivo, pasan a ADN de cadena doble. Se integran en el genoma del huésped, normalmente en el cromosoma 19, e infectan eficientemente tanto células en división como células que no se dividen. Sin embargo, son virus con una capacidad limitada (solo pueden transportar hasta 4 kb de material genético) y que, para replicarse dentro de la célula, necesitan la coinfección de otro virus.

A pesar de estos inconvenientes, estos vectores están siendo muy estudiados y resultan muy novedosos debido principalmente a la escasa inmunogenicidad que presentan, ya que no se asocian a ninguna enfermedad humana y por tanto sus posibles reacciones adversas se ven reducidas. Además, proporcionan una expresión transgénica a largo plazo, la cual puede perdurar hasta incluso los 6 años después de la administración de una sola dosis²². Ello hace que, por ejemplo, estén siendo usados en ensayos sobre modelos animales de ratón para tratar la retinitis pigmentosa mediante administración por inyecciones intravítreas y subretinianas.

¹⁷ Chen Y., Moiseyev G., Takahashi Y., Ma J.X. RPE65 gene delivery restores isomerohydrolase activity and prevents early cone loss in Rpe65^{-/-} mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006;47(3):1177-84.

¹⁸ Campochario P.A., Nguyen Q.D., Shah S.M., Klein M.L., Holz E., Frank R.N. et al. Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum. Gene Ther.* 2006;17(2):167-76.

¹⁹ Cashman M.S., Ramo K., Kumar-Singh R. A non membrane-targeted human soluble CD59 attenuates choroidal neovascularization in a model of age related macular degeneration. *PLoS One.* 2011;6(4):e19078.

²⁰ Jager L., Ehrhardt A. Emerging adenoviral vectors for stable correction of genetic disorders. *Curr Gene Ther.* 2007;7(4):272-83.

²¹ Mohan R.R., Sharma A., Netto M.V., Sinha S., Wilson S.E. Gene therapy in the cornea. *Prog. Retin. Eye Res.* 2005;24(5):537-559.

²² Rivera V.M., Gao G.P., Grant R.L., Schnell M.A., Zoltick P.W., Rozamus L.W. et al. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood.* 2005;105(4):1424-30.

C. Vectores lentivirales: los lentivirus son retrovirus de cadena simple de RNA. Al igual que los anteriores, se integran en el genoma del huésped prolongando la duración de la expresión (que, además, es muy estable), e infectan de manera eficiente células quiescentes y en división. Además, los lentivirus constituyen una alternativa terapéutica segura, ya que no se ha demostrado hasta la fecha ninguna reacción clínica adversa grave con su empleo²³. Su principal inconveniente es su procedencia del virus del VIH, ya que podrían producir infecciones por recombinación en el paciente. A pesar de ello, son vectores muy seguros y con aplicación clínica en enfermedades oftálmicas como la degeneración macular asociada a la edad húmeda. Bajo el nombre comercial RetinoStat®, la compañía Oxford BioMedica ha desarrollado un biofármaco para inyección subretiniana basado en vectores lentivirales. Dichos sistemas son los encargados de liberar dos genes que codifican para la síntesis de las proteínas endostatina y angiostatina, ambas antiangiogénicas, las cuales previenen el daño en la vascularización de la retina. Recientemente, se ha finalizado la fase I de ensayos clínicos.

D. Vectores retrovirales: son retrovirus RNA con capacidad para transportar hasta 8 kb. Sin embargo, debido a su capacidad oncogénica, el uso de estos vectores ha sido drásticamente reducido debido a efectos secundarios relacionados con su administración. Un ejemplo es el desarrollo de leucemia de células T en 4 pacientes sometidos a un ensayo clínico para el tratamiento de la inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X²⁴.

4.1.2-VECTORES NO VIRALES (NANOSISTEMAS)

De forma general, un vector no-viral suele ser de tamaño nanométrico y está formado por sistemas lipídicos o poliméricos que se unen al fragmento de material genético de interés. Esta unión, la cual forma el vector no-viral, proporciona por un lado protección al material genético hasta llegar a su lugar de acción; y por otro facilita la endocitosis por la célula diana al unirse a la superficie de esta con gran facilidad. Como se ha comentado anteriormente, la

²³ Williams K.A., Coster D.J. Gene therapy for diseases of the cornea - a review. Clin. Exp. Ophthalmol. 2010;38(2):93-103.

²⁴ Hacein-Bey-Abina S., Garrigue A., Wang G.P., Soulier J., Lim A., Morillon E. et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. J. Clin. Invest. 2008;118(9):3132-3142.

principal ventaja que presentan estos sistemas frente a los vectores virales es su escasa inmunogenicidad. Sin embargo, su principal limitación es la baja eficiencia de la expresión del gen que portan en comparación con los sistemas virales. Dicho obstáculo cada vez es menos frecuente gracias a los nuevos sistemas de liberación que se han ido investigando.

Dentro de los sistemas no virales se encuentran, entre otros, las nanopartículas poliméricas, las nanopartículas de albúmina, los liposomas, los dendrímeros y las nanopartículas de quitosano. A continuación, se detalla cada tipo:

A. Nanopartículas poliméricas: las más empleadas son las nanopartículas fabricadas con un copolímero de ácido láctico y glicólico (PLGA). Presentan una ventaja muy interesante respecto al resto de sistemas de liberación, ya que se puede conseguir un aumento de la expresión del gen que portan en su interior. Para ello, se modifica la relación de láctico/glicólico y el peso molecular del polímero. Otro aspecto importante a la hora de trabajar con estas nanopartículas es la posibilidad de modificar sus características de superficie para lograr una mayor unión específica a la célula diana. Con este fin, se suele recurrir con frecuencia a la variación de la carga superficial de la partícula para dirigirla a distintos orgánulos celulares (citoplasma, liposoma...). Esto último también puede llevarse a cabo funcionalizando las nanopartículas con anticuerpos u otros tipos de ligandos que faciliten su internalización en la célula diana y ayuden a dirigirla frente a orgánulos específicos.

B. Nanopartículas de albúmina: la albúmina es una proteína localizada principalmente en el plasma sanguíneo. Es obtenida a partir de fuentes como suero humano o suero bovino, y presenta la ventaja fundamental de presentar una elevada biocompatibilidad, sin reaccionar con el huésped. Además, debido a los múltiples lugares de unión que presenta en su estructura, la albúmina puede alojar en su interior grandes cantidades de sustancia activa²⁵. Todo ello se suma al aumento de la solubilidad y de la vida media del material génico que incorporan, y a una disminución de la oxidación del mismo²⁶.

²⁵ Patil G.V. Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. Drug Dev. Res. 2003;58(3):219-247.

²⁶ Kragh-Hansen U., Chuang V.T., Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. Biol. Pharm. Bull. 2002;25(6):695-704.

A pesar de que, actualmente, no se ha descrito su uso como sistema de liberación en alguna de las patologías comentadas anteriormente, su empleo está comenzado a ser investigado en estudios de expresión génica con estas nanopartículas. Así, se han llevado a cabo investigaciones donde se han incorporado plásmidos que incorporan genes de interés terapéutico (como el de la superóxido dismutasa SOD) a las mismas para su inyección vía intravítrea con una eficiencia de transfección elevada²⁷. Ello se debe a que el mecanismo de captación a nivel celular mediado por la glicoproteína 60 permite la endocitosis de estas nanopartículas al interior celular de manera satisfactoria, lo cual plantea su futuro uso en estas enfermedades del segmento posterior.

C. Liposomas: son un tipo de vectores basados en lípidos. En ellos, se produce un control de la liberación, gracias a la composición en lípidos y tamaño de partícula. Además, presentan una baja toxicidad e inmunogenicidad, y protegen al gen de la degradación enzimática y del aclaramiento renal. Los liposomas, formados en su conjunto por una bicapa fosfolipídica con un núcleo en su interior donde albergan el material genético, son vectores muy empleados. Su amplia utilización se basa en su elevada eficacia de encapsulación para moléculas (hidrofílicas, lipofílicas, anfifílicas...). Al igual que otros nanosistemas se puede modificar la superficie y/o funcionalidad del liposoma. Sin embargo, la mayoría de los liposomas se degradan con relativa facilidad en el citoplasma y no logran llegar al núcleo celular, lo cual supone un problema grave respecto a la eficiencia de la expresión génica.

D. Dendrímeros: se trata de polímeros, con una estructura dendrítica, y generalmente solubles en agua. Permiten alojar en su red dendrítica sustancias activas por interacciones a través de enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones iónicas, o pueden también ser conjugadas a través de enlaces covalentes²⁸. Son sistemas de liberación muy empleados en terapia génica. En este sentido, el empleo de dendrímeros de tipo PAMAM (poliamidas) ha sido investigado

²⁷ Mo Y., Barnett M.E., Takemoto D., Davidson H., Kompella U.B. Human serum albumin nanoparticles for efficient delivery of Cu, Zn superoxide dismutase gene. *Mol. Vis.* 2007;13:746-57.

²⁸ Kompella U., Amrite A., Pacha Ravi R. y Durazo, S. Nanomedicines for back of the eye drug delivery, gene delivery, and imaging. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2013;36:172-198.

por diversos autores. Estudios en este campo han demostrado que el empleo de dendrímeros degradados parcialmente frente a aquellos intactos mejora el proceso de transfección celular, ya que poseen una estructura flexible con menos puentes amida que permite al ADN acomodarse mejor y formar un único sistema compacto²⁹.

E. Nanopartículas de quitosano: estos sistemas de liberación se encuentran formados en su totalidad por quitosano, el cual es un componente natural del exoesqueleto de crustáceos. Se han empleado para el tratamiento de patologías del segmento anterior, gracias a sus propiedades mucoadhesivas como consecuencia de las cargas positivas que presenta en su superficie. De esta forma, es capaz de permanecer en la superficie del ojo durante tiempos prolongados tras la administración tópica.

Hasta el momento, la administración de estas nanopartículas ha quedado restringido a la superficie ocular gracias a su capacidad de bioadhesión sobre las mucosas. Sin embargo, recientemente se han realizado estudios con el plásmido que contiene el gen que codifica para la glicoproteína plasminógeno con nanopartículas de quitosano-PLGA para administración por inyección intravítrea, y se ha comprobado que estas son capaces de liberar el plásmido de manera eficiente en la retina y asegurar su mantenimiento en ella hasta 72h después de la administración³⁰. Ello hace pensar que estos sistemas pueden constituir otra alternativa más en el futuro para la liberación de genes en el segmento posterior del ojo.

4.3 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN EN TERAPIA GÉNICA OCULAR

Al igual que disponemos de un amplio arsenal de sistemas farmacéuticos para lograr la liberación del fármaco en la célula diana responsable de la patología ocular, a día de hoy las rutas de administración de estos medicamentos son múltiples. Las sustancias activas empleadas en terapia génica son generalmente polinucleótidos, de un elevado peso molecular y con carga negativa, los cuales deben acceder a compartimentos intracelulares (o

²⁹ Karlowsky J.A. y Zhanel G.G. Concepts on the use of liposomal anti-microbial agents: applications for aminoglycosides. Clin. Infect. Dis. 1992;15(4):654-667.

³⁰ Jin J., Zhou K.K., Park K., Hu Y., Xu X., Zheng Z. et al. Anti-inflammatory and antiangiogenic effects of nanoparticle-mediated delivery of a natural angiogenic inhibitor. Invest. Ophthalmol. 2011;52(9):6230-6237.

intranucleares en algunos casos concretos)³¹. El ojo, por su naturaleza intrínseca, va a disponer de distintas barreras y mecanismos de defensa que impiden el acceso de sustancias extrañas a su interior; bien a nivel superficial como la secreción lacrimal, o bien a nivel celular como sucede con los transportadores de reflujo de iones donde destaca principalmente la glicoproteína-P.

La vía de administración más sencilla es la **vía tópica**, pues se trata de un tipo de administración no invasivo. Se trata de una ruta de acceso limitada para aquellos fármacos que acceden hasta el segmento anterior del ojo, ya que la biodisponibilidad de las sustancias activas administradas por esta vía es muy baja. moléculas de ácido nucleico, las cuales no logran atravesar de manera eficiente la córnea y la conjuntiva.

Las vías de administración que implican el acceso de la sustancia activa a **circulación sistémica** podría constituir otra alternativa, aunque de nuevo presenta una notoria limitación clínica debido a que se requieren dosis muy elevadas para alcanzar niveles terapéuticos en el lugar de acción, lo cual podría conllevar la aparición de efectos secundarios no deseados. Además, dado que la terapia génica es local, este tipo de administración no sería muy recomendable. Por otro lado, la **vía intravítrea** se realiza mediante inyección intraocular pudiendo administrar de forma local las dosis apropiadas. Sin embargo, la inyección intravítrea es invasiva y se ha descrito que puede producir complicaciones como desprendimiento de retina o endoftalmitis³² tras la administración de inyecciones repetidas.

La siguiente ruta de interés en la administración de estas sustancias es la **vía periocular**. Se lleva a cabo también mediante inyecciones, y el fármaco se deposita sobre la esclera, donde por un proceso de difusión puede acceder al interior del ojo. Es una ruta que ha cobrado importancia en el campo de la investigación actual, ya que es menos invasiva que la administración intravítrea. Sin embargo, la biodisponibilidad por esta vía sigue siendo baja ya que puede haber pérdida de la sustancia activa al llegar a la coroides.

Así, a día de hoy está cobrando importancia la vía de administración **subretiniana**. La principal ventaja que presenta respecto a las demás es la alta efectividad que ha demostrado para tratar afecciones oculares génicas que afectan a los fotorreceptores de la retina o al

³¹ de la Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, Sanchez A, Seijo B, Alonso M. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62(1):100-117.

³² Ladas I.D., Karagiannis D.A., Rouvas A.A., Kotsolis A.I., Liotsou A., Vergados I. Safety of repeat intravitreal injections of bevacizumab versus ranibizumab: our experience after 2,000 injections. *Retina*. 2009;29(3):313-8.

propio epitelio pigmentario de la retina. Ello es debido a que, tras la inyección, la sustancia activa queda alojada en el espacio subretiniano, el cual permite fácilmente el contacto con los fotorreceptores o el epitelio, permitiendo así alcanzar una elevada selectividad en el lugar de acción. Este hecho cobra gran interés, y de hecho la administración subretiniana está siendo usada en ensayos clínicos para tratar la Amaurosis Congénita de Leber tipo 2 (LCA2) con resultados muy prometedores³³. Sin embargo, al igual que ocurría con las inyecciones intravítreas, pueden existir efectos secundarios como consecuencia de la inyección ocular repetida tales como hemorragias, desprendimientos de retina, cataratas, etc., aunque en este caso en particular presentan una baja incidencia de los mismos.

5. CONCLUSIONES

Los nanosistemas de administración intraocular en terapia génica no viral resultan de gran interés en el tratamiento de patologías huérfanas del segmento posterior. La vía de administración subretiniana destaca como la más favorable para la llegada del sistema a la célula diana.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Allikmets R., Singh N., Sun H., Shroyer N.F., Hutchinson A., Chidambaram A. et al. A photoreceptor cellspecific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* 1997;15(3):236-46.
- Al-Saikhani F.I. The gene therapy revolution in ophthalmology. *Saudi J. Ophthalmol.* 2013;27(2):107-11.
- Berger W., Kloeckener-Gruissem B., Neidhardt J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* 2010;29(5):335-75.
- Binley K., Widdowson P., Loader J., Kelleher M., Iqbal S., Ferrige G. et al. Transduction of photoreceptors with equine infectious anemia virus lentiviral vectors: safety and biodistribution of StarGen for Stargardt disease, *Invest. Ophthalmol.* 2013;54(6)4061-4071.

³³ Testa F., Maguire A.M., Rossi S., Pierce E.A., Melillo P., Marshall K. et al. Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber congenital Amaurosis type 2. *Ophthalmology.* 2013;120(6):1283- 1291.

- Campochiaro P.A., Nguyen Q.D., Shah S.M., Klein M.L., Holz E., Frank R.N. et al. Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum. Gene Ther.* 2006;17(2):167-76.
- Cashman M.S., Ramo K., Kumar-Singh R. A non membrane-targeted human soluble CD59 attenuates choroidal neovascularization in a model of age related macular degeneration. *PLoS One.* 2011;6(4):e19078.
- Chen Y., Moiseyev G., Takahashi Y., Ma J.X. RPE65 gene delivery restores isomerohydrolase activity and prevents early cone loss in Rpe65^{-/-} mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006;47(3):1177-84.
- de la Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, Sanchez A, Seijo B, Alonso M. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2010;62(1):100-117.
- Gordiyenko N.V., Fariss R.N., Zhi C., MacDonald I.M. Silencing of the CHM gene alters phagocytic and secretory pathways in the retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol.* 2010;51(2):1143-1150.
- Hacein-Bey-Abina S., Garrigue A., Wang G.P., Soulier J., Lim A., Morillon E. et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* 2008;118(9):3132-3142.
- Hamel C. Retinitis Pigmentosa. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2006;1:40.
- Jager L., Ehrhardt A. Emerging adenoviral vectors for stable correction of genetic disorders. *Curr Gene Ther.* 2007;7(4):272-83.
- Jin J., Zhou K.K., Park K., Hu Y., Xu X., Zheng Z. et al. Anti-inflammatory and antiangiogenic effects of nanoparticle-mediated delivery of a natural angiogenic inhibitor. *Invest. Ophthalmol.* 2011;52(9):6230-6237.
- Kalatzis V., Hamel C.P., MacDonald I.M. Choroideremia: towards a therapy. *Am. J. Ophthalmol.* 2013;156(3):433-7.
- Karlowsky J.A. y Zhanel G.G. Concepts on the use of liposomal anti-microbial agents: applications for aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis.* 1992;15(4):654-667.
- Kompella U., Amrite A., Pacha Ravi R. y Durazo, S. Nanomedicines for back of the eye drug delivery, gene delivery, and imaging. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2013;36:172-198.
- Kragh-Hansen U., Chuang V.T., Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.* 2002;25(6):695-704.

- Ladas I.D., Karagiannis D.A., Rouvas A.A., Kotsolis A.I., Liotsou A., Vergados I. Safety of repeat intravitreal injections of bevacizumab versus ranibizumab: our experience after 2,000 injections. *Retina*. 2009;29(3):313-8.
- Liu M.M., Tuo J., Chan C.C. Gene therapy for ocular diseases. *Br. J. Ophthalmol*. 2011;95(5):604-612.
- Maldonado López, M; Pastor Jimeno, J. *Guiones de oftalmología*. 2ª Edición. Madrid: McGraw-Hill; 2012. p. 4.
- Mo Y., Barnett M.E., Takemoto D., Davidson H., Kompella U.B. Human serum albumin nanoparticles for efficient delivery of Cu, Zn superoxide dismutase gene. *Mol. Vis*. 2007;13:746-57.
- Mohan R.R., Sharma A., Netto M.V., Sinha S., Wilson S.E. Gene therapy in the cornea. *Prog. Retin. Eye Res*. 2005;24(5):537-559.
- Patil G.V. Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. *Drug Dev. Res*. 2003;58(3):219-247.
- Pérez-López J. Terapia génica en el tratamiento de los errores congénitos del metabolismo. *Med Clin (Barc)*. 2013;142(12):549-553.
- Petrs-Silva H., Linden R. Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa. *Clin. Ophthalmol*. 2014;8:127-136.
- Rivera V.M., Gao G.P., Grant R.L., Schnell M.A., Zoltick P.W., Rozamus L.W. et al. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood*. 2005;105(4):1424-30.
- Sai P., Damgé Ch., Rivereau A.S., Hoeltzel A. y Gouin E. Prophylactic oral administration of metabolically active insulin entrapped in isobutylcyanoacrylate nanocapsules reduces the incidence of diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Autoimmun*. 1996;9(6):713-22.
- Sieving P.A., Caruso R.C., Tao W., Coleman H.R., Thompson D.J., Fullmer K.R., Bush R.A. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006;103(10):3896-901.
- Solinís M.A., del Pozo-Rodríguez A., Apaolaza P.S., Rodríguez-Gascón A. Treatment of ocular disorders by gene therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2015; 95:331-342.
- Testa F., Maguire A.M., Rossi S., Pierce E.A., Melillo P., Marshall K. et al. Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber congenital Amaurosis type 2. *Ophthalmology*. 2013;120(6):1283- 1291.

- Thassu D, Deleers M, Pathak Y. Nanoparticulate drug delivery systems. 1ª Edición. New York: Informa Healthcare; 2007. p. 291.
- Williams K.A., Coster D.J. Gene therapy for diseases of the cornea - a review. Clin. Exp. Ophthalmol. 2010;38(2):93-103.
- Zallocchi M., Binley K., Lad Y., Ellis S., Widdowson P., Iqbal S. et al. EIAV-based retinal gene therapy in the shaker1 mouse model for usher syndrome type 1B: development of UshStat. PLoS ONE. 2014;9(4):e94272.