

**PINCES DE POLIPURINA: UN NOU TIPUS
D'OLIGONUCLEÒTIDS PER TERÀPIA GÈNICA**

DISCURS

llegit a l'acte d'ingrés de l'Acadèmic Corresponent

Il·lustre Sr. Dr. Carlos J. Ciudad

Celebrat el dia 28 d'octubre de 2019

PRESENTACIÓ

a càrrec de l'Acadèmic Numerari

Excel·lentíssim Sr. Dr. Jaume Piulats

Barcelona
2019

*L'Acadèmia no es fa solidària de
les opinions que s'exposen en les publicacions,
de les quals és responsable l'autor.*

PRESENTACIÓ

a càrrec de l'Acadèmic Numerari
Excel·lentíssim Sr. Dr. Jaume Piulats

**Excel·lentíssim Senyor President,
Excel·lentíssims i Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,
Distingides autoritats acadèmiques i professionals,
Estimats familiars, amics i companys,
Senyores i Senyors,**

Voldria en primer lloc agrair a la Junta Directiva de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya el haver-me designat per fer la presentació del Discurs d'Ingrés, com Acadèmic Corresponent de la nostra institució, del Dr. Carlos J. Ciudad. Sincerament, es un plaer poder fer aquesta presentació perquè, en l'àmbit personal, l'etapa en què vam col·laborar científicament va ser una etapa plena d'il·lusions, amb un nivell científic extraordinari i envoltats per joves científics, que ens esperonaven per impulsar una de les àrees de més interès de la biotecnologia farmacèutica.

Per situar-nos històricament podríem resumir que a l'inici de la dècada dels 70s, de l'anterior segle, es van produir tres avenços fonamentals que van definir el desenvolupament de la biotecnologia, em refereixo a:

- Descobriment i caracterització de les citocines com a mitjancers dels mecanismes del sistema immune.
- Descobriment dels enzims de restricció, que van permetre definir l'anomenada tecnologia del DNA-recombinant, que ens va oferir la possibilitat d'obtenir proteïnes.
- La publicació, el 1975, de la tècnica per obtenir anticossos monoclonals.

El meu grup de recerca es va interessar, principalment, per l'obtenció d'anticossos monoclonals enfront de proteïnes responsables del pro-

cés angiogènec tumoral. Però, paral·lelament, ja s'estava treballant, en diversos laboratoris, la tecnologia dels oligonucleòtids antisentit (ASO). Una tecnologia de gran potencial terapèutic, que podríem resumir com la capacitat d'inhibir específicament la síntesi d'una proteïna en bloquejar el seu RNAm amb una seqüència d'oligonucleòtids complementaris. Aquesta via de recerca va tenir un impuls en el període 1967-1977. El primer esment, el 1967, al concepte d'intervenció mitjançant àcids nucleics va ser el suggeriment que els oligonucleòtids portant grups alquilants podien modificar la selectivitat de la complementarietat per l'ARN, més tard, el 1977, es va descriure que la traducció, en sistemes lliures de cèl·lules, podia ser inhibida per la unió d'ADN complementari i l'ARNm en un procés anomenat bloqueig de la traducció per hibridació (HART: Hybrid-arrested translation). Conseqüència d'aquests treballs, el 1978, Zamecnik i Stephenson, van fer servir oligonucleòtids complementaris a l'ARN del virus del Sarcoma de Rous per inhibir la replicació del virus, i es va proposar el potencial ús quimioterapèutic de la tècnica.

Quant a la indústria farmacèutica, els laboratoris Hybridon van ser dels primers a mostrar interès per les possibilitats terapèutiques dels oligos anti-sentit i a la dècada dels 80 es va produir un progrés molt significatiu, en aquest camp, amb la síntesi química dels oligonucleòtids i el desenvolupament de sintetitzadors automàtics. Amb aquesta base científica la indústria es va interessar en la utilització dels oligonucleòtids com antivirals, especialment enfront de patògens humans com el VIH, VSH 1 i 2, VPH i influença. Tot això es desenvolupava a inicis de la dècada dels 90. Els primers productes que van arribar a la fase de recerca clínica van ser d'ús oftalmològic. Malauradament, en els assaigs clínics inicials, van aparèixer efectes secundaris greus, que van representar un fre al seu desenvolupament. Malgrat tot, la recerca va continuar, així en el nostre Laboratori de Bioinvestigació de Merck vam tenir interès a estudiar la distribució i l'efecte biològic dels oligonucleòtids antisentit en els limfòcits B humans. A l'iniciar aquest projecte vaig tenir el plaer de conèixer un magnífic científic i millor persona, el Dr. Ramon Eritja, un gran especialista en la síntesi d'oligonucleòtids. A partir d'aquell moment vam co-dirigir el projecte que es va materialitzar amb la tesi doctoral de la Dra. Gemma Tarrasón, qui va publicar la seva tesi l'any 1996.

Aquests antecedents experimentals, de finals del segle XX, ens serveixen per recordar aquelles persones, que van obrir un camí, que molt probablement tindrà un paper significatiu en teràpia humana.

Va ser en aquesta fase quan vaig conèixer la recerca del Dr. Carlos J. Ciudad, a la Facultat de Farmàcia, de la Universitat de Barcelona. La col·laboració del meu grup amb el Dr. Carlos J. Ciudad es va iniciar cap al 1999 amb estudis orientats a la modulació de la resistència al tractament quimioteràpic mitjançant la re-instauració de l'apoptosi i en el disseny d'oligonucleòtids contra el RNAm de la dihidrofolat reductasa (DHFR), intentant dirigir-los específicament contra cèl·lules de càncer de mama que sobreexpressessin HER2 a la seva membrana. Amb l'inici del segle XXI, en el període 2000-2005, la nostra col·laboració científica es va incrementar amb treballs on vam estudiar els inhibidors de CDK, el paper de la survivina, l'efecte antiangiogènec de la proteïna p16, o la caracterització de la proteïna S100A4 com potencial diana antiangiogènica.

Aquesta col·laboració mantinguda en el temps va permetre el desenvolupament de diverses tesis doctorals i publicacions, amb el treball de col·laboradors del meu grup, així com amb alumnes del Màster que aleshores impartíem a la Universitat Pompeu Fabra i constitueix un exemple de l'àmplia experiència del Dr. Carlos J. Ciudad en el terreny dels oligonucleòtids antisentit.

Posteriorment, el grup de recerca del Dr. Carlos J. Ciudad es va orientar cap al seu projecte actual dirigit a l'estudi de les pinces de polipurina, que avui serà el tema central del seu discurs d'ingrés.

El Dr. Carlos J. Ciudad va néixer a Madrid l'any 1952 i actualment és catedràtic en el Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Es va doctorar l'any 1982 amb una tesi dirigida pel Dr. Joan Guinovart, acadèmic d'aquesta institució, sobre el mecanisme d'activació de la glucogen sintetasa per sucres. El seu treball a la UB es va iniciar el 1989 i prèviament ja havia desenvolupat etapes de recerca i docència a centres com la Universitat de Columbia i Universitat d'Indiana als Estats Units i també a la Universitat Autònoma de Barcelona. En aquestes estades va estudiar la caracterització del promotor del gen dihidrofolat reductasa

(DHFR). El currículum del Dr. Carlos J. Ciudad recull un total de 122 articles publicats a revistes nacionals i internacionals i unes 242 comunicacions a congressos. Del seu treball científic voldria destacar una primera etapa caracteritzada pels estudis en col·laboració amb els Drs. Joan Guinovart i Joan Massagué a finals dels 70 i inicis dels 80. Posteriorment va crear la seva línia pròpia de recerca en el terreny dels oligonucleòtids antisentit.

Creiem que l'experiència científica del Dr. Carlos J. Ciudad aporta uns coneixements fonamentals, en un camp com la teràpia antisentit, que probablement, en un breu futur, pot representar un progrés important per la teràpia. Per tot això estic segur que la presència del Dr. Carlos J. Ciudad a l'Acadèmia serà molt enriquidora des del punt de vista científic, i és per això que, una vegada hagi llegit el preceptiu discurs d'ingrés reglamentari, proposo a l'Excel·lentíssim Sr. President, tingueu a bé entregar-li el títol acreditatiu, i imposar-li l'estola i la medalla que l'acreditaran com Acadèmic Corresponent d'aquesta Reial Corporació.

Moltes Gracies.

**PINCES DE POLIPURINA: UN NOU TIPUS
D'OLIGONUCLEÒTIDS PER TERÀPIA GÈNICA**

DISCURS

a càrrec de l'Acadèmic Corresponent
II·lustre Sr. Dr. Carlos J. Ciudad

**Excel·lentíssim Senyor President,
Excel·lentíssims i Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,
Distingides autoritats acadèmiques i professionals,
Estimats familiars, amics i companys,
Senyores i Senyors,**

Agraïments

Tots som fruit d'una combinació única d'experiències, esdeveniments i d'interaccions amb persones que defineixen el que som i fem al llarg de tota la vida.

Es per això que vull esmentar, en primer lloc, aquelles persones que directa o indirectament han contribuït a que avui estigui aquí exposant el tema específic sobre oligonucleòtids terapèutics que els llegiré a continuació.

El Dr. Joan Guinovart, de la Universitat de Barcelona, el meu Director de Tesi Doctoral, que em va donar la formació investigadora predoctoral sobre metabolisme glucídic.

El Dr Peter Roach, a la Indiana University, amb qui vaig fer estudis sobre regulació per fosforilació, el Dr. Angel Pellicer, a la New York University, i el Dr. Larry Chasin de la Columbia University, que em van formar en Biologia Molecular. Aquests 3 professors van contribuir a la meua formació postdoctoral als EEUU per un període total de 5 anys, a Indianapolis i a Nova York, la Gran Poma que aglutina totes les cultures.

El Dr. Fausto G. Hegardt que em va facilitar el retorn a la Universitat de Barcelona i amb qui vaig aprendre molts aspectes del metabolisme lipídic.

El Dr. Jaume Piulats, Director del laboratori de Bioinvestigació de Merck a Barcelona amb qui vam realitzar experiments d'oligonucleòtids antisentit, i RNAs d'interferència.

Les Doctores Marta Nicolas i Alicia Tapias, UB, per la utilització d'oligonucleòtids en la regulació dels factors de transcripció Sp1 i Sp3, respectivament.

Les Doctores Silvia Peñuelas i Elisabet Selga, pels estudis de Genòmica Funcional realitzats amb microarrays d'oligonucleòtids.

El Dr. Ramon Eritja, CSIC, per converses i col.laboracions fructíferes sobre les pinces de polipurines (PPRHs).

Les Doctores Sílvia Coma i Cristina de Almagro, pioneres de la unió dels PPRHs al DNA de doble cadena i la seva aplicació com a agent silenciador gènic.

Les Doctores Núria Mencia i Carlota Oleaga, UB, per la utilització d'antimirs i PPRHs en l'estudi de microRNAs diferencialment expressats en la resistència al Metotrexat, i en gens sobreexpressats per Sp1, respectivament.

Les Doctores Laura Rodríguez i Xenia Villalobos per l'estudi detallat *in vitro* i *in vivo* de l'efecte de PPRHs sobre diferents dianes relacionades amb càncer i l'optimització d'aquestes molècules.

La Dra. Anna Solé, UB, per la utilització de PPRHs-reparadors per la correcció de mutacions puntuals en el gen endogen de la dihidrofolat reductasa de cèl.lules de mamífer.

Finalment, vull agrair amb el meu reconeixement més profund la col.laboració permanent al llarg de 25 anys amb la Dra. Veronica Noé amb qui hem desenvolupat totes aquestes investigacions en relació amb oligonucleòtids i PPRHs, i que a més es la mare de la nostre estimada filla Allegra June.

Gràcies a tots/es.

Antecedents històrics

La complementarietat de les bases del DNA, en què una adenina s'hibrida amb una timina, i una guanina s'hibrida amb una citosina, definida en les observacions inicials de Watson i Crick, pel que fa a l'estructura del DNA i el mecanisme de la seva replicació (1,2), va obrir una porta immensa a les possibilitats d'utilització dels oligonucleòtids, com a eina de Biologia Molecular i com a agents terapèutics.

Els oligonucleòtids antisentit (ASO) són molècules de DNA curtes, estables, i de fàcil síntesi amb una seqüència que és complementària i antiparal·lela, és a dir en orientació inversa, a la de l'RNA que es vol inhibir, i a la qual s'uneix per enllaços de Watson i Crick (W:C).

Els primers oligonucleòtids antisentit que es varen dissenyar i utilitzar van tenir una orientació per afeccions oftalmològiques, com va ser fomiversen pel tractament de la retinitis por citomegalovirus en pacients amb SIDA. Fomiversen s'administrava localment per injecció intravitreal però obria la porta a que els ASOs s'administrassin per via sistèmica pel tractament de malalties en humans. La diana de fomiversen era l'mRNA que codificava per la proteïna IE-2 del CMV, necessària per la replicació viral. Novartis va produir fomiversen fins el 2002 a Europa i 2006 a EEUU.

Aquestes molècules antisentit es poden modificar químicament per fer-les més resistents a les nucleases i permetre un temps d'acció més perllongat. La modificació més freqüent és la fosfotioat (PS), però també són freqüents les següents: LNAs (locked nucleic acid), metil citidina, morfolinos i PNAs (peptide nucleic acid) que confereixen major estabilitat. Qualsevol modificació, però, pot representar un decrement o "penalty" en l'afinitat en la hibridació de l'oligonucleòtid a la seva diana.

Utilització actual dels oligonucleòtids

Oligonucleòtids com a reactius

- a) Com a reactiu de Biologia Molecular, els oligonucleòtids de DNA en forma de doble cadena s'utilitzen com a sondes moleculars per

investigar zones d'unió del DNA a proteïnes que regulen l'expressió gènica, com ara els factors de transcripció, que s'uneixen als promotors dels gens cel·lulars (3). En aquest mateix sentit s'utilitzen com a “decoys” o competidors de zones d'unió de factors reguladors de transcripció o de factors de empalmament de l'RNA.

- b) En forma de cadena simple, els oligonucleòtids s'utilitzen com a encebadors en la reacció en cadena de la polimerasa (o P.C.R.), en una gran varietat de tècniques biotecnològiques incloent la determinació quantitativa d'mRNA per RT-qPCR (reacció de transcripció inversa seguida de PCR quantitatiu).
- c) En la generació de microarrays pels estudis de Genòmica Funcional i de Genotipat, els oligonucleòtids, de diferent llargada, constitueixen la base per a la hibridació amb DNAs i RNAs complementaris (cDNAs i cRNAs) i per determinar tant els nivells d'expressió d'RNA com la seva seqüència (4,5)

Oligonucleòtids com a agents terapèutics inhibidors de l'expressió gènica

Els oligonucleòtids antisentit es poden utilitzar com silenciadors gènics o inhibidors de l'expressió gènica tot inhibint la traducció de l'RNA a proteïna i estimulant l'activitat de la RNAsa H que degrada a l'RNA. En el nostre laboratori hem desenvolupat oligonucleòtids antisentit contra la DHFR, diana de l'atac amb Metotrexat (6) que posteriorment es van vehiculitzar mitjançant immunoliposomes a cèl·lules de càncer de mama que sobre-expressen la proteïna HER2 (7). Exemples d'oligonucleòtids antisentits aprovats per la FDA són Fomivirsen (8, 9) contra la retinitis induïda per citomegalovirus, ara retirat del mercat, i Mipomersen (també anomenat Kynamro) dirigit contra la apolipoproteïna B per reduir els nivells alts de colesterol (10).

Quan els oligonucleòtids estan dirigits contra els micro-RNAs, una classe de RNAs de petit tamany, reben el nom d'Antagomirs. Aquests són utilitzats per neutralitzar l'acció dels miRNAs que constitueixen uns reguladors secundaris de l'expressió gènica, ja que modulen la traducció dels mRNAs generalment per unió a la zona 3'-UTR (regió 3' no traduïda). D'aquesta manera, un antagomir podria activar l'ex-

pressió d'un gen per alliberament de la repressió que pugui exercir un miRNA sobre la traducció d'un determinat mRNA (11). Fins l'actualitat, només hi ha un compost, SPC3649 de Santaris Pharma, també anomenat Miravirsen, un inhibidor del micro-RNA miR-122, que ha entrat en assajos clínics contra el virus de l'hepatitis-C.

Els oligonucleòtids també poden bloquejar de manera estèrica l'emalment de l'RNA (splicing) i provocar salts d'exons. D'aquesta manera, per exemple, s'ha pogut restaurar la funcionalitat perduda per mutacions al gen de la distrofina tot provocant salts d'exons que restableixen el marc de lectura del gen i dona lloc a proteïnes més petites però funcionals. Aquest és el cas dels oligonucleòtids Eteplirsen i Drisapersen (de 30 nt) dissenyats per produir un salt de l'exó 51.

Recentment, al desembre del 2016, la FDA va aprovar Spinraza (també anomenat Nusinersen) un oligonucleòtid antisentit de 18 nt pel tractament de SMA (Atrofia Muscular Espinal) per inclusió de l'exó 7 del gen SMN1.

Així mateix els oligonucleòtids d'RNA formen part de les molècules silenciadores que constitueixen els siRNAs o RNAs d'interferència que també degraden l'RNA diana i inhibeixen l'expressió gènica. En l'actualitat hi ha a prop de vint assajos clínics valorant la possible utilització d'RNAs d'interferència contra diferents dianes com ara VEGF, VEGFR1, HIF-1, p53, RRM2 i BCL-2 entre altres. En aquest punt vull fer esment de l'estudi comparatiu que vam realitzar amb el grup del Dr. Piulats sobre la capacitat silenciadora d'oligonucleòtids antisentit i siRNAs dirigits contra la diana antiapoptòtica survivina. Aquests tractaments provocaven un increment en l'apoptosi, o mort cel·lular programada, com a aproximació antitumoral on les molècules d'RNA d'interferència eren les més efectives (12).

Oligonucleòtids com a anticossos

D'altra banda, els oligonucleòtids, degut a la seva conformació dependent de la seva seqüència, poden unir-se a pràcticament qualsevol lligand i en aquest cas se'ls anomena aptàmers i funcionen com si fossin d'anticossos però formats per polímers d'àcids nucleics en comptes d'aminoàcids.

Macugen, també anomenat Pegaptanib és un aptàmer desenvolupat contra VEGF mitjançant l'estratègia de SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) inventada per Larry Gold (13).

Enllaços de Hoogsteen

Tots els anteriors oligonucleòtids s'uneixen a les seves dianes mitjançant els clàssics enllaços de Watson:Crick. Tanmateix, existeixen altres enllaços per ponts d'hidrogen que uneixen bases del DNA d'una manera no convencional, per exemple en el cas de purines- una A es pot unir amb altre A i una G amb una altre G, i que són anomenats enllaços d'Hoogsteen. Van ser descoberts per Karst Hoogsteen, un bioquímic nascut a Groningen el 1923 i emigrat als EEUU, que va col.laborar amb Linus Pauling a Caltech on va demostrar l'existència d'aquests enllaços alternatius el 1959 (14), i després va treballar a Merck. Karst Hoogsteen ens va deixar molt recentment el 2015. Les característiques d'aquest tipus d'enllaç Hoogsteen fa que les cadenes d'àcids nucleics es puguin lligar a dúplexs per formar tríplexs com els que formen els TFOs (Triplex forming oligonucleotides) i fins i tot quadrúplexs (G-quadrúplexes).

Aportació Personal: Pines de Polipurina

Descobrimet dels efectes de les pines de polipurina

Els TFOs estan constituïts per una cadena senzilla de DNA que es lliga per Hoogsteen a dues cadenes que estan formant un dúplex mitjançant W:C i s'han emprat per inhibir la unió de factors de transcripció.

Tanmateix, també existeix la possibilitat qu'un dúplex o forquilla intramolecular de polinucleòtids format per enllaços Hoogsteen pugui lligar-se a cadenes simples o dobles de DNA. Aquest últim cas va constituir el nostre descobrimet, tot utilitzant dues cadenes de polipurines amb seqüència especular, unides intramolecularment per enllaços d'Hoogsteen, vam observar que aquestes es podien lligar a un dúplex de DNA genòmic per formar un tríplex i desplaçar la quarta cadena del DNA (15), de manera que s'obre el DNA genòmic i s'inhibeix la transcripció i l'expressió gènica.

Un avantatge de les cadenes de polipurines és que es poden lligar entre si de manera antiparal·lela i aquesta unió és independent del pH, mentre que les cadenes de polipirimidines per fer tríplexs es lliguen de manera paral·lela on les citosines han d'estar o bé metilades, o protonades a un pH àcid incompatible amb la vida, i per tant no es podrien utilitzar com a eines terapèutiques. En aquest sentit vam demostrar que les pinces de polipurines unides per enllaços Hoogsteen o PPRHs (de PolyPurine Reverse Hoogsteen), es podien lligar a cadenes de polipirimidines a pH fisiològic.

A continuació vam procedir a dissenyar pinces de polipurina contra un gen model, el que codifica per la dihidrofolat reductasa (DHFR) diana d'atac quimioterapèutic i les vam assajar en cèl·lules de mamífer seguint la filosofia com si es tractés d'una teràpia antisentit clàssica dirigida contra l'mRNA. L'experiment va funcionar però aviat ens vam adonar que el gen dhfr té una orientació inversa en el cromosoma i per tant el disseny que havíem realitzat estava al revés i quedava dirigit contra la cadena motllo del DNA i no contra la de l'mRNA. D'aquesta manera vam descobrir per "serendipity" que les pinces de polipurina es lligaven a una de les cadenes del DNA i devien estar interferint amb el procés d'expressió.

Posteriorment, vam ampliar el disseny de PPRHs contra aquest gen model en diferents zones i cadenes, tant motllo com codificant, i vam comprovar que es podia alterar la transcripció o l'empalmament de l'RNA (16–18).

A partir d'aquest moment sabíem que teníem a les nostres mans una nova eina terapèutica per silenciar gens i vam voler aplicar-la a una sèrie de gens representatius de dianes anticanceroses. En aquesta categoria vam assajar PPRHs contra gens de proliferació i càncer com ara telomerasa, topoisomerasa, mdm2, myc, mTOR, incloent gens antiapoptòtics com Bcl-2 i survivina (19,20) i gens involucrats en immunoteràpia com SIRP-alfa i CD47 (21) i PD1 i PDL-1 (22,23).

En tots els casos, els PPRHs han demostrat una gran eficiència tant in vitro com in vivo, tal com es va determinar en un model de xenograft de cèl·lules de càncer de pròstata i que va constituir la prova de principi d'aquestes molècules que havíem dissenyat en el nostre labora-

tori. Aquesta nova eina, els PPRHs, tenen una eficiència 10 vegades superior a la dels oligonucleòtids antisentit i funcionen en un rang de concentracions similar a la dels siRNAs, o RNA d'interferència.

Avantatges dels PPRHs:

Estabilitat i Economia

Una propietat important dels PPRHs és la seva estabilitat. Donada la seva estructura de pinça i que estan formats a base de deoxinucleòtids en comptes de ribonucleòtids, vam determinar la seva estabilitat en diferents tipus de sèrum davant el seu competidor més potent, els siRNAs. El resultat va ser que els PPRHs tenien una vida mitja de al voltant de deu vegades superior comparada amb la de l'RNA d'interferència i per tant eren molt més estables (24). Es de mencionar que aquesta estabilitat es produïda en absència de modificacions en la molècula del PPRH, cosa que els fa de síntesi més econòmica, 10 vegades menys que les molècules de siRNA, i sense disminució en la seva capacitat d'unió a la seqüència complementaria de la seva diana.

Falta d'Immunogenicitat

Altre punt crucial en els tractaments de teràpia gènica és evitar la immunogenicitat, com és el cas dels siRNAs que activen la resposta immune innata a través de la via de TLR (Toll-like receptors) i que incrementen els nivells de interleukina-6 (IL-6), tumor necrosis factor alfa (TNF-alfa) i interferó beta (IFN β). Tanmateix, els PPRHs no tenen un efecte immunoestimuladori probablement perquè són molècules construïdes a base de DNA i de mida inferior a 100 nucleòtids (usualment al voltant de 50 nt) (24)

Especificitat

Els PPRHs són específics d'acció, que els hi ve conferida per l'especificitat de seqüència. Tot i que pugui semblar estrany es troben seqüències diana de polipirimidines a tots els gens i de vegades amb una llargada de 50 nucleòtids. Hem assajat diferents longituds i al voltant de 25-30 nt s'aconsegueixen efectes molt positius amb una

altíssima especificitat, comprovada de manera computacional amb anàlisis de tipus BLAST i experimentalment. Aquestes seqüències de polipirimidines es troben majoritàriament en zones reguladores com ara les regions promotores i intròniques dels gens i en menor grau en exons. Per arribar a identificar 1 PPRH com a agent silenciador gènic, normalment realitzem un escrutini inicial amb tres PPRHs dissenyats contra el gen diana, i es selecciona el que funcioni de manera més òptima.

S'ha de mencionar que no és absolutament necessària la presència de una cadena de poli-pirimidines pura, i es pot permetre l'existència de fins a tres interrupcions de purines a la seqüència diana. D'aquesta manera s'obren encara més les possibilitats de poder dissenyar PPRHs contra el DNA de qualsevol gen del genoma. En cas de trobar interrupcions de purines a la diana, el millor disseny és aquell que incorpora la pirimidina complementaria a la purina en la síntesi del PPRH (25).

Afinitat

Si comparem els PPRHs amb els TFOs, que són els altres oligonucleòtids que es lliguen al DNA genòmic per enllaços de Hoogsteen, s'observa que el PPRH es lliga al DNA diana a concentracions més baixes que els TFOs, el que indica una major afinitat (25). A més, en termes de viabilitat cel·lular els PPRHs exerceixen un efecte més potent en cèl·lules PC3 de càncer de pròstata i SKBR3 de càncer de mama que els corresponents TFOs.

Reparació Gènica

Els PPRHs són molt versàtils en les seves funcions i a part de la seva aplicació com a molècules silenciadores gèniques, hem demostrat que també es poden utilitzar per reparacions gèniques a nivell de correcció de mutacions puntuals. Aquests tipus de mutacions són les responsables de moltes malalties com ara la Fibrosi quística, Anèmia de Fanconi, hemocromatosi, hemofília, fenilcetonúria, anèmia falciforme, Crohn o Tay-Sachs.

Com a model hem utilitzat una col·lecció de mutacions sense sentit del

gen dhfr que tenen mutat un nucleòtid i com a resultat apareix un codó prematur d'aturada (TAA, TAG, TGA) o “stop” de la traducció. Així la proteïna resultant queda truncada amb pèrdua de la seva activitat.

L'estructura dels PPRHs reparadors consisteix en una pinça de poli-purines, tal com s'ha mencionat pels PPRHs silenciadors, però que porten en el seu extrem 5' una extensió homòloga a la seqüència que es vol reparar i que inclou el nucleòtid corregit.

La porció del cor de la pinça de polipurina s'uneix al DNA, provoca una apertura del mateix per desplaçament de la quarta cadena i forma un llaç-D (D-loop) que estimula la recombinació homòloga. Com a resultat final la cua o extensió amb la mutació reparada del PPRH-reparador s'intercanvia amb la seqüència endògena i repara la mutació a la cèl.lula (26).

La mutació no necessàriament s'ha de trobar a prop de la zona d'unió del cap o cor del PPRH. Tot acoblant un connector de 5 timidines es poden construir PPRHs-reparadors que acaben corregint mutacions puntuals a 600 nucleòtids de distància del lloc d'unió del PPRH. Es destaca que aquest tipus de metodologia reparadora no té lloc amb un tall a la doble cadena del DNA genòmic que es vol reparar i per tant no produeix efectes de deleció o inserció, comuns en l'aproximació actual de CRISPR.

Conclusió

En resum, els PPRHs constitueixen una nova tecnologia Biotecnològica amb aplicacions Biomèdiques. Una gran aplicació és la de silenciament gènic.

Es pot aplicar a pràcticament qualsevol gen sempre que es trobin en la seva seqüència cadenes de polipirimidines.

Respecte als oligonucleòtids antisentit, els PPRHs funcionen a concentracions molt més baixes en el rang nanomolar, unes deu vegades menys.

Respecte als siRNAs, les dues molècules treballen en el mateix rang de concentració però els PPRHs no són immunogènics a diferència de l'RNA d'interferència, i són molt més estables (10 vegades més). Així mateix els PPRHs tenen més afinitat per la seva diana que els corresponents TFOs.

L'altre gran aplicació dels PPRHs és la de reparació gènica i en aquest sentit els PPRHs-reparadors poden corregir mutacions puntuals d'1 o dos nucleòtids que es trobin a prop o mitjana distància del lloc d'unió del cap dels PPRHs. Un punt molt important és que la reparació es realitza al locus endogen del gen sense produir insercions ni delecions i en absència de talls en el DNA genòmic.

1) Futur dels Oligonucleòtids

Futur optimista degut al desenvolupament al llarg dels últims 30 anys de diferents tipus de molècules amb capacitat silenciadora de l'expressió gènica: Antisentits, siRNAs, aptàmers, TFOs, PPRHs, on s'ha avançat en la especificitat, estabilitat, i disminució de la immunogenicitat.

El repte està en una vehiculització òptima d'aquests tipus de molècules, tant per l'entrada a les cèl·lules, la direccionalització específic-tissular, com per la alliberació dels oligonucleòtids a nivell intracel·lular de manera que puguin exercir la seva acció sobre la diana terapèutica seleccionada.

Les possibilitats de creixement en l'àrea biomèdica de la biotecnologia són enormes com ara és el cas de la immunoteràpia del càncer, el desenvolupament en la utilització dels oligonucleòtids terapèutics, que s'ha vist incrementat amb la aprovació recent del primer siRNA-Patisiran per us humà, concretament pel tractament de la amiloïdosis transtiretina hereditària (27), i el desenvolupament de les nanotecnologies.

Referencics

1. Watson JD, Crick FHC. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*. 1953;
2. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of Nucleic acids: A structure for Deoxyribose Nucleic acid (Reprinted from *Nature*, April 25, 1953). *Nature*. 1969;
3. Ciudad CJ, Urlaub G, Chasin LA. Deletion analysis of the Chinese hamster dihydrofolate reductase gene promoter. *J Biol Chem*. 1988;
4. Peñuelas S, Noé V, Ciudad CJ. Modulation of IMPDH2, survivin, topoisomerase I and vimentin increases sensitivity to methotrexate in HT29 human colon cancer cells. *FEBS J*. 2005;
5. Selga E, Noé V, Ciudad CJ. Transcriptional regulation of aldo-keto reductase 1C1 in HT29 human colon cancer cells resistant to methotrexate: Role in the cell cycle and apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 2008;
6. Rodríguez M, Noé V, Alemany C, Miralles A, Bemí V, Caragol I, et al. Effects of anti-sense oligonucleotides directed toward dihydrofolate reductase RNA in mammalian cultured cells. *Int J Cancer*. 1999;
7. Rodríguez M, Coma S, Noé V, Ciudad CJ. Development and Effects of Immunoliposomes Carrying an Antisense Oligonucleotide Against DHFR RNA and Directed Toward Human Breast Cancer Cells Overexpressing HER2. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 2003;
8. de Smet MD, Meenken C, van den Horn GJ. Fomivirsen – a phosphorothioate oligonucleotide for the treatment of CMV retinitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2003;
9. Roehr B. Fomivirsen approved for CMV retinitis. *J Int Assoc Physicians AIDS Care*. 1998;4(10):14–6.

10. Furtado JD, Wedel MK, Sacks FM. Antisense inhibition of apoB synthesis with mipomersen reduces plasma apoC-III and apoC-III-containing lipoproteins. *J Lipid Res.* 2012;
11. Mencia N, Selga E, Noé V, Ciudad CJ. Underexpression of miR-224 in methotrexate resistant human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2011;
12. Coma S, Noe V, Lavarino C, Adan J, Rivas M, Lopez-Matas M, et al. Use of siRNAs and antisense oligonucleotides against survivin RNA to inhibit steps leading to tumor angiogenesis. *Oligonucleotides.* 2004;
13. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (80-).* 1990;
14. Hoogsteen K. The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallogr.* 2002;
15. Coma S, Noé V, Eritja R, Ciudad CJ. Strand Displacement of Double-Stranded DNA by Triplex-Forming Antiparallel Purine-Hairpins. *Oligonucleotides.* 2006;
16. de Almagro MC, Coma S, Noé V, Ciudad CJ. Polypurine hairpins directed against the template strand of DNA knock down the expression of mammalian genes. *J Biol Chem.* 2009;
17. de Almagro MC, Mencia N, Noé V, Ciudad CJ. Coding Polypurine Hairpins Cause Target-Induced Cell Death in Breast Cancer Cells. *Hum Gene Ther.* 2010;
18. Wikipedia. Polypurine_reverse-Hoogsteen_hairpin. The Free Encyclopedia. 2006.
19. Rodríguez L, Villalobos X, Dakhel S, Padilla L, Hervas R, Hernández JL, et al. Polypurine reverse Hoogsteen hairpins as a gene therapy tool against survivin in human prostate cancer PC3

cells in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol.* 2013;

20. Villalobos X, Rodríguez L, Solé A, Lliberós C, Mencia N, Ciudad CJ, et al. Effect of Polypurine Reverse Hoogsteen Hairpins on Relevant Cancer Target Genes in Different Human Cell Lines. *Nucleic Acid Ther.* 2015;
21. Bener G, Félix AJ, Sánchez de Diego C, Pascual Fabregat I, Ciudad CJ, Noé V. Silencing of CD47 and SIRP α by Polypurine reverse Hoogsteen hairpins to promote MCF-7 breast cancer cells death by PMA-differentiated THP-1 cells. *BMC Immunol.* 2016;
22. Enríquez MMM, Félix AJ, Ciudad CJ, Noé V. Cancer immunotherapy using PolyPurine Reverse Hoogsteen hairpins targeting the PD-1/PD-L1 pathway in human tumor cells. *PLoS One.* 2018;
23. Ciudad CJ, Medina Enriquez MM, Félix AJ, Bener G N V. Silencing PD-1 and PD-L1: the potential of PolyPurine Reverse Hoogsteen hairpins for the elimination of tumor cells. *Immunotherapy.* 2019;
24. Villalobos X, Rodríguez L, Prévot J, Oleaga C, Ciudad CJ, Noé V. Stability and immunogenicity properties of the gene-silencing polypurine reverse hoogsteen hairpins. *Mol Pharm.* 2014;
25. Rodríguez L, Villalobos X, Solé A, Lliberós C, Ciudad CJ, Noé V. Improved design of PPRHs for gene silencing. *Mol Pharm.* 2015;
26. Solé A, Ciudad CJ, Chasin LA, Noé V. Correction of point mutations at the endogenous locus of the dihydrofolate reductase gene using repair-PolyPurine Reverse Hoogsteen hairpins in mammalian cells. *Biochem Pharmacol.* 2016;
27. Tournev I, Ueda M, Buades J, O'Riordan WD, Parman Y, Campistol JM, et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med.* 2018;

Mecanisme d'acció PPRHs silenciadors

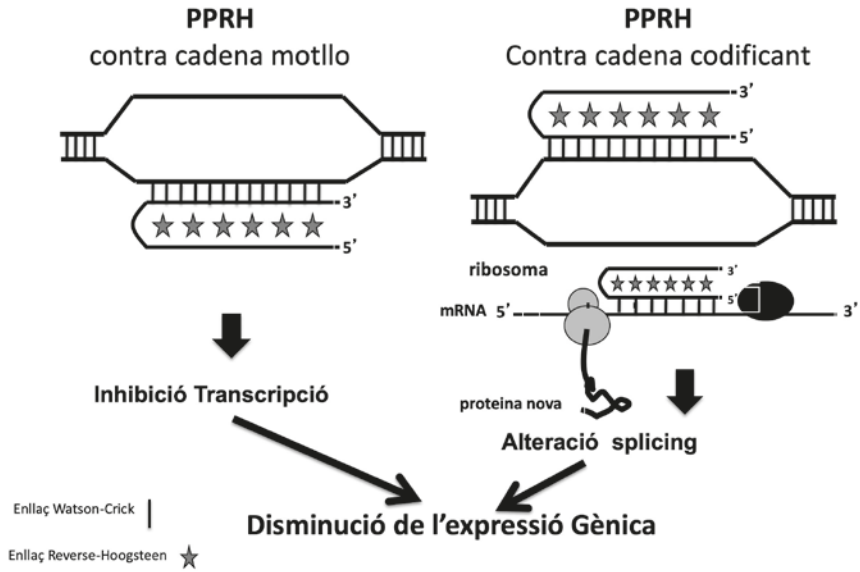


Figura 1.- Mecanisme d'acció dels PPRHs silenciadors gènics.

Les pines de polipurines s'uneixen intramolecularment per enllaços d'Hoogsteen. Les pines poden estar dirigides contra la cadena motllo o codificant del DNA, depenent d'on es trobi la regió de polipirimidines. Les pines es lliguen a aquestes zones de polipirimidines per enllaços de Watson:Crick tot formant un tríplex i la quarta cadena és desplaçada. Com a conseqüència es produeix bé una inhibició de la transcripció o de l'empalmament o splicing de l'RNA, el que provoca la disminució de l'expressió gènica i el silenciament d'un gen determinat de manera específica.

Reparació de diferents mutacions puntuals en el *locus* endògen del gen *dhfr*

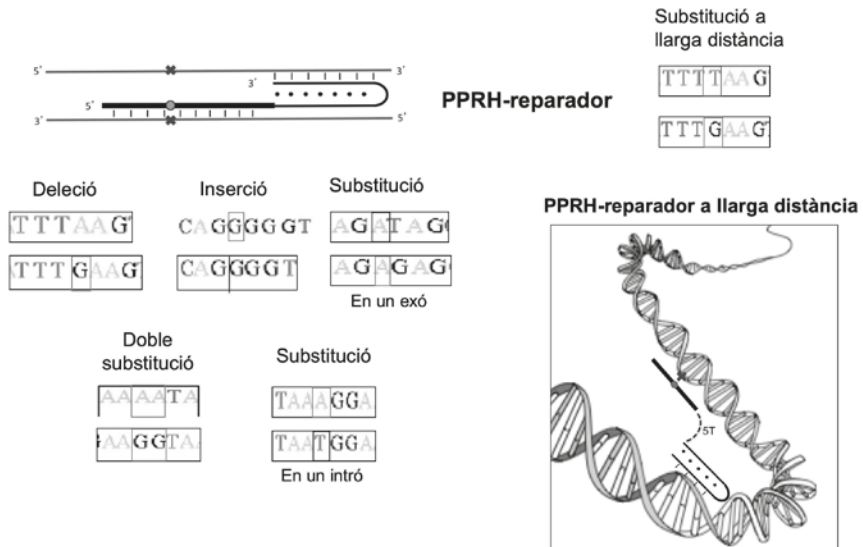


Figura 2. Reparació Gènica mitjançant PPRHs.

Els PPRHs reparadors estan formats per un cap de polipurines amb una extensió en l'extrem 5' que porta una seqüència homòloga a la de la mutació però amb el nucleòtid corregit. La unió de la pinça al DNA provoca un desplaçament de la quarta cadena o D-loop que estimula la recombinació homòloga. La cadena reparadora del PPRH reparador es recombina amb la seqüència del gen endogen al seu locus natural i desencadena la reparació gènica. Les reparacions es poden produir a curta i llarga distància del lloc d'unió del cap del PPRH.

