



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**NANOPARTÍCULAS PARA TERAPIA
GÉNICA**

Autor: Raquel Pita Compostizo

Tutor: Miguel Manzano García

Fecha: Febrero 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
2.1. APLICACIÓN CLÍNICA DE LA TERAPIA GÉNICA.....	1
2.1.1. Terapia génica <i>ex vivo</i>	2
2.1.2. Terapia génica <i>in vivo</i>	2
3. OBJETIVOS	2
4. METODOLOGÍA	3
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	3
5.1. ESTRATEGIAS MOLECULARES EN TERAPIA GÉNICA	3
5.1.1. CRISPR/Cas	3
5.1.2. Silenciamiento génico	4
5.2. TRANSFECCIÓN GÉNICA Y VECTORIZACIÓN	5
5.2.1. Vectorización viral	6
5.2.2. Vectorización no viral	6
5.3. NANOPARTÍCULAS PARA TERAPIA GÉNICA	7
5.3.1. Desarrollo de nanopartículas para terapia génica.....	8
5.3.2. Nanopartículas orgánicas	9
5.3.3. Nanopartículas inorgánicas	11
5.3.4. Comparativa de las nanopartículas para terapia génica	13
5.3.5. Investigación y Mercado	13
6. CONCLUSIONES	15
7. BIBLIOGRAFÍA	17

1. RESUMEN

En este trabajo de fin de grado (TFG) se describen las principales nanopartículas desarrolladas hasta el momento en terapia génica. Para su aplicación en esta terapia, las nanopartículas son diseñadas específicamente para poder transportar los distintos agentes terapéuticos, que actúan de acuerdo a una determinada estrategia molecular. Por ello, se ha realizado una breve revisión de las principales estrategias relacionándolas con su aplicación *in vivo*, en la que las nanopartículas juegan un papel indispensable. Para entender esta adaptación de las nanopartículas a su correspondiente agente terapéutico, se han discutido las principales modificaciones que las diferencian de las nanopartículas utilizadas para el transporte de fármacos, valorando su estudio preclínico y clínico. A causa de la importancia de las nanopartículas para el desarrollo de nuevos tratamientos con terapia génica y la innovación que suponen como sistema de vectorización de ácidos nucleicos, se ha analizado su impacto en el mercado en su papel como futuros vectores con nuevas características que ofrecen un amplio abanico de posibilidades para la vectorización de la terapia génica.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Desde las primeras hipótesis en las que se planteaba la terapia génica como una promesa para el tratamiento de enfermedades hereditarias, el término ha sufrido una constante evolución. En la actualidad, la terapia génica se define como la modificación de la dotación genética de la célula para modular la expresión de genes cuya alteración supone el desarrollo de una determinada patología.[1] Su capacidad para regular la expresión génica permite el tratamiento de enfermedades según su etiología molecular obteniendo resultados prolongados en el tiempo, lo que podría suponer la curación de enfermedades hereditarias crónicas cuyo tratamiento actual sólo resuelve temporalmente la sintomatología de la enfermedad. Ejemplo de ello es la hemofilia B, enfermedad hereditaria que cursa con continuos sangrados a causa de una alteración en la cascada de coagulación. La alteración se produce por un defecto en el gen que codifica para el factor IX, produciéndose un déficit en la síntesis de esta proteína necesaria para la coagulación.[2] El tratamiento actual se basa en el aporte externo del factor IX humano o recombinante al menos 2 veces por semana durante toda su vida. La innovación terapéutica con terapia génica fue probada en el estudio realizado por Nathwani *et al.*[2], en el que muestra la eficacia del tratamiento para la hemofilia B mediante el aporte del gen codificante para el factor IX en 10 pacientes con hemofilia B severa (actividad nula de factor IX). Los pacientes presentaron una actividad de factor IX del 1 al 6% en función de la dosis administrada a los 4 meses de tratamiento, manteniéndose estable hasta 3.2 años después mejorando en gran medida la calidad de vida de los pacientes. La terapia génica presenta una gran complejidad con respecto a los tratamientos convencionales. A pesar de ello, el rápido desarrollo de las técnicas moleculares y nanomedicina están contribuyendo a su paso de promesa a realidad, como se va a ver a lo largo de este TFG.

2.1. APLICACIÓN CLÍNICA DE LA TERAPIA GÉNICA

La traslación clínica de la terapia génica requiere de métodos que permitan llevar el gen o sistema terapéutico a la célula de forma específica y controlada. Para ello, se han desarrollado distintas estrategias moleculares, cuya aplicación puede realizarse mediante dos aproximaciones, la *ex vivo* y la *in vivo*, presentando cada una de ellas ciertas restricciones en función de la patología a tratar.

2.1.1. Terapia génica *ex vivo*

La terapia génica *ex vivo* consiste en el trasplante de células previamente extraídas, cultivadas y transfectadas. Según el origen de las células cultivadas se diferencian dos tipos de trasplante, autólogo y alogénico, siendo el primero con células propias del paciente y el segundo con células procedentes de un donante compatible. Aunque ambas opciones son viables, prima el el trasplante autólogo ya que el alogénico requiere de inmunosupresión debido al riesgo de desarrollarse la enfermedad de injerto frente a huesped.

La aplicación *ex vivo* presenta importantes ventajas ya que permite seleccionar las células con mayor eficacia de transfección y mantener un control exhaustivo de todo el proceso. A pesar de ello, esta estrategia no permite el tratamiento de patologías en las que sus células diana no crecen en cultivo, por lo que actualmente el desarrollo de la terapia génica *ex vivo* se centra en el uso de células madre hematopoyéticas (HSC) para el tratamiento de enfermedades hematológicas e inmunoterapias oncológicas.[3]

2.1.2. Terapia génica *in vivo*

La terapia génica *in vivo* a diferencia de la terapia *ex vivo*, implica la transfección génica a la célula dentro del organismo por lo que se trata de un método menos invasivo, ya que no es necesario el trasplante de las células, evitando su posible contaminación. La terapia génica *in vivo* se considera un método menos invasivo debido a que no es necesaria la extracción y posterior trasplante de las células transfectadas, aunque con ello, se pierde el control exhaustivo sobre el proceso de transfección génica. Esta diferencia implica una menor eficacia de transfección, que depende directamente de la especificidad tisular del vector. La estrategia *in vivo* ha sido utilizada en el tratamiento de la hemofilia B y diversas formas hereditarias de ceguera, como la acromatopsia, coroideremia, neuropatía óptica hereditaria de Leber, retinosquiasis ligada al cromosoma X y retinitis pigmentosa ligada al cromosoma X. [1]

Junto con el desarrollo de las técnicas moleculares y su aplicación mediante las técnicas *in vivo* y *ex vivo*, ha sido necesario el desarrollo de vectores que permitan el acceso del gen o sistema terapéutico a la célula. Inicialmente, se contemplanaba el uso de ADN desnudo como terapia.[1] Sin embargo, la baja estabilidad plasmática del ADN debido a su exposición a enzimas de restricción y la escasa eficacia de transfección, hicieron manifiesta la necesidad de recurrir a nuevos métodos para hacer llegar la terapia génica a la célula.

Aunque la mayoría de las estrategias utilizadas hasta ahora se han basado en métodos físicos y biológicos, el rápido avance en el campo de la nanomedicina ha supuesto la introducción de las nanopartículas como vectores para terapia génica como una prometedora alternativa que pretende suplir las carencias de las vías utilizadas hasta el momento.

Por ello, la investigación actual en terapia génica se encuentra estrechamente ligada al desarrollo de nuevas nanopartículas capaces de adaptarse al tipo de terapia utilizada.

A pesar de los continuos avances que se están produciendo en el campo, la terapia génica sigue presentando el mismo problema, *Delivery! Delivery! Delivery!*. [4] Por ello, en este TFG se describen los distintos vectores que se encuentran actualmente en desarrollo, destacando los distintos tipos de nanopartículas, su situación en el mercado y su futuro.

3. OBJETIVOS

- Desarrollar aspectos generales de la terapia génica y la necesidad de vectores para su aplicación.
- Relacionar conceptos clave de la nanomedicina para la vectorización de fármacos, con su aplicación en terapia génica.

- Describir y comparar las principales nanopartículas desarrolladas hasta el momento específicamente para vectorizar terapia génica.
- Aportar una visión actual sobre la investigación y mercado de estos nuevos medicamentos formulados con nanopartículas.

4. METODOLOGÍA

Para la realización de esta revisión bibliográfica se ha obtenido información de las bases de datos *Web of Science*, *Scopus* y *PubMed* utilizando las palabras clave “*Gene therapy*”, “*Nanoparticles*”, “*Gene delivery*”, “*Genome-editing*”, “*Non-viral*”, “*Vector*”, “*Nanotechnology*”, “*CRISPR*”, “*Gene silencing*”, “*Delivery*”, “*Targeting*”, “*Nanomedicine*” y “*Nanocarrier*”.

Para obtener la información sobre estado y desarrollo de ensayos clínicos se ha recurrido a la base de datos *ClinicalTrials.gov* del NIH (del inglés, *National Institutes of Health*). Se ha utilizado el gestor de referencias *Mendeley®* para las citas bibliográficas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ESTRATEGIAS MOLECULARES EN TERAPIA GÉNICA

Tradicionalmente, el enfoque terapéutico de la terapia génica se basaba únicamente en la introducción de un gen exógeno codificante para una determinada proteína cuya deficiencia es causa de una determinada patología.[1] Esta estrategia limitaba la terapia génica al tratamiento de enfermedades monogénicas deficitarias como la fenilcetonuria, el síndrome de la inmunodeficiencia combinada severa o la hemofilia, dejando huérfanas a otras enfermedades monogénicas producidas por una función excesiva de una determinada proteína como la amiloidosis hereditaria por transtiretina y enfermedades poligénicas como el cáncer.[1]

La constante investigación en el desarrollo de las distintas técnicas moleculares aplicadas a la terapia génica ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias moleculares como la edición genómica y el silenciamiento génico, resolviendo así las limitaciones de la terapia génica tradicional.[1] Dentro de estas técnicas destaca el sistema CRISPR/Cas y el silenciamiento de genes mediante ARN de interferencia.

5.1.1. CRISPR/Cas

CRISPR es un sistema de inmunidad adaptativa procariota que confiere a las bacterias resistencia frente a agentes externos como plásmidos y fagos. Esto es debido a que CRISPR conserva secuencias del ADN de dichos fagos sirviendo como memoria inmunológica para detectar y destruir el ADN de nuevos virus similares. Como consecuencia de su capacidad para reconocer y editar secuencias de genes específicos el sistema ha despertado un gran interés como herramienta de edición genómica, destacando su aplicación como regulador de la expresión génica en humanos.[5]

El mecanismo de CRISPR/Cas permite incorporar ADN exógeno mediante su transcripción y procesamiento en ARN CRISPR (ARNcr), a partir del cual se forma un complejo con el ARN transactivador (ARNtracr) y la proteína asociada Cas con actividad nucleasa encargada de cortar el ADN de la célula diana por un segmento específico. Posteriormente, se ha descubierto que el sistema puede ser simplificado mediante la fusión del ARNtracr y del ARNcr, en un único ARN guía (ARNsg), encargado de dirigir a la proteína Cas a la región de ADN de interés para su edición. [5] Se han desarrollado tres estrategias diferentes para el transporte de CRISPR/Cas al núcleo, la primera estrategia consiste en utilizar un plásmido codificante para

Cas y el ARNsg de forma que solo se requiere un único proceso de transfección.[6] La segunda estrategia se basa en el transporte de ARNm que codifica para Cas y el ARNsg, mientras que la tercera estrategia transporta directamente el complejo formado por Cas y el ARNsg (RNPs, del inglés, *Ribonucleoprotein complexes*). (Fig. 1). Un estudio realizado por Liang *et al.*[7] compara la eficacia de la edición genómica de las tres estrategias en diferentes líneas celulares de mamíferos. El uso de RNPs presentó una eficacia de edición génica del 87% y 94% en células madre pluripotentes inducidas y células Jurkat respectivamente, eficacia que es superior a las otras dos estrategias en el mismo tipo de células. Además de presentar mejores resultados en eficacia, las RNPs destacan por reducir efectos adversos e inmunogenicidad respecto al plásmido y el ARNm Cas. Las RNPs también muestran mejores características para su vectorización gracias a su carga positiva que favorece la formación de complejos con nanopartículas. Todo ello posiciona a las RNPs como la opción más versátil en la aplicación del sistema CRISPR.[6]

En la actualidad encontramos 16 ensayos clínicos activos de terapia génica con el sistema CRISPR, aunque, solo uno de ellos ha llegado a la fase I por ahora. El estudio evalúa la seguridad del tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico con el trasplante autólogo de linfocitos T editados con CRISPR/Cas9. Por ahora la traslación clínica de CRISPR solo ha sido posible *ex vivo*, debido a la preocupación sobre las consecuencias de modificar el genoma del paciente de por vida.[8]

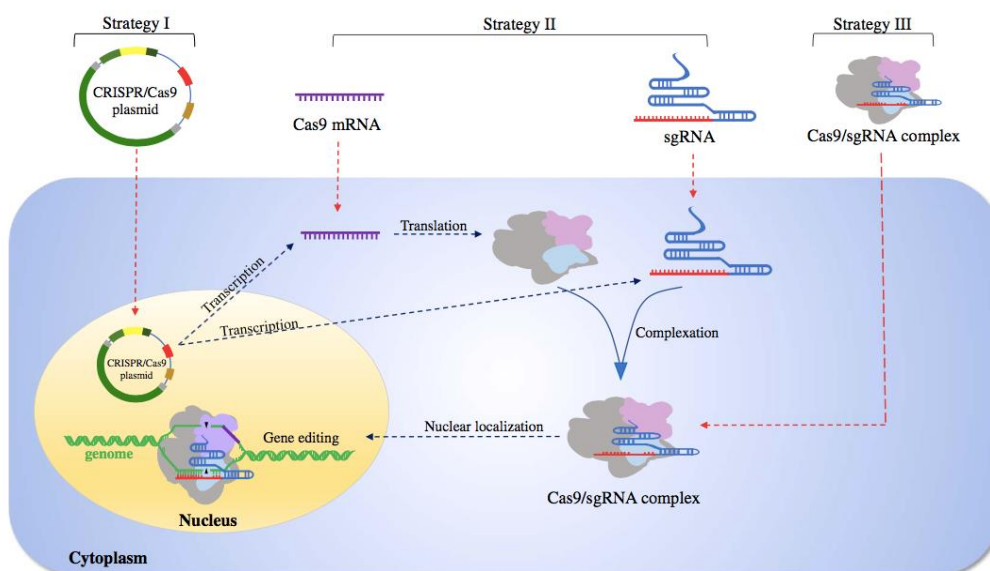


Figura 1. Estrategias de aplicación del sistema CRISPR/Cas [6]

5.1.2. Silenciamiento génico

El silenciamiento génico es un sistema eucariota de defensa que regula la expresión génica de la célula mediante la inhibición y control de la expresión de genes endógenos y exógenos perjudiciales para la célula, como son el material genético de los virus y los transposones. El conocimiento de este sistema ha llevado a su aplicación en la medicina como una de las principales estrategias moleculares utilizadas en terapia génica. [9]

La terapia de silenciamiento génico se basa en el descubrimiento del ARN pequeño de interferencia (ARNi) y en su capacidad para unirse a secuencias de ARNm complementario y degradarlo mediante el mecanismo conocido como ARN de interferencia (ARNi).[10] Para ello se han desarrollado distintas formas de expresión del ARNi, destacando la utilización directa del ARNi y la aplicación de ADN plasmídico (ADNp), que expresa ARN de horquillado corto

(ARNhc). (Fig. 2). En ambas formas de silenciamiento génico, el ARN es procesado para formar posteriormente un complejo de inducción del silenciamiento (RISC) con el ARNm complementario produciéndose su degradación.[10] El estudio realizado por Matsui *et al.*[11] compara la eficacia de transfección del ADNp y del ARNip como supresores de la expresión del gen *mdr1a/1b* que codifica para la glicoproteína P. Los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo* muestran la eficacia para suprimir la expresión del gen, sin embargo, la supresión es mayor con el uso del ARNip, diferencia que se atribuye a la necesidad de entrada en el núcleo en el caso del ADNp para que se lleve a cabo su transcripción. La principal barrera para el desarrollo del ARNip como estrategia de silenciamiento génico reside en la baja estabilidad del ARNip y su dependencia de enzimas celulares para su activación y reconocimiento del ARNm diana. Esto dificulta la realización de modificaciones químicas que mejoren su estabilidad y especificidad.[12] No obstante, se han desarrollado estrategias para su modificación química y vectorización mediante nanopartículas en los últimos años, abriendo su paso a la clínica. Hasta hoy se han realizado 60 ensayos clínicos en terapia génica con ARNi para el tratamiento de varios tipos de cáncer como el melanoma, la leucemia mieloide crónica y el mieloma. La mayoría de ellos se encuentran o han completado su fase I y en 7 de ellos el ARNi está formulado con nanopartículas.[13]

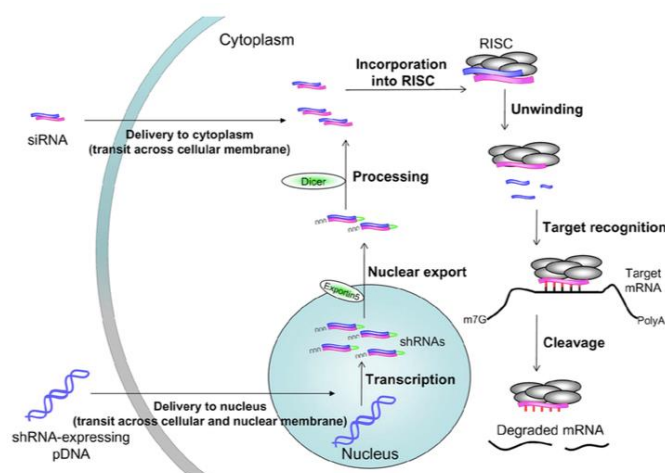


Figura 2. Esquema de silenciamiento génico mediante ARNip y ADNp [10]

5.2. TRANSFECCIÓN GÉNICA Y VECTORIZACIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, para que la terapia génica pueda llevarse a cabo es necesario que se produzca un proceso de transfección génica, que consiste en la interacción del gen o sistema terapéutico en el genoma de la célula diana. Por ello, la eficacia del tratamiento depende directamente de la eficacia de transfección.

Los primeros estudios con terapia génica presentaban como limitación la baja eficacia de transfección, condicionando su avance.[1] Debido a la necesidad de mejorar la eficacia de transfección en la aplicación de la terapia génica *in vivo*, surge la utilización de vectores que transporten y liberen el agente terapéutico con una mayor eficacia. La vectorización consiste en la optimización del proceso de distribución del medicamento, gen o sistema terapéutico para que alcance su biofase de manera específica, de tal forma que aumente su eficacia disminuyendo sus posibles efectos adversos. Para ello, el vector debe ser capaz de transportar la carga de material genético de forma estable, dirigirse de forma específica a la célula diana e interactuar con las membranas celulares protegiendo su carga hasta llegar al núcleo. De esta forma se definen como características esenciales para los vectores en terapia génica la

especificidad, la no inmunogenicidad, la biocompatibilidad, la capacidad de carga, y la eficacia de transfección.

Las estrategias de vectorización en terapia génica se dividen en dos grandes categorías, la vectorización viral y la no viral, siendo en esta última donde se encuadran las nanopartículas, que son el objeto principal de este TFG.

5.2.1. Vectorización viral

La capacidad de los virus para infectar células humanas e integrar su material genético en la célula ha supuesto la posibilidad de su uso como vectores en terapia génica. Para ello se utilizan virus modificados con la capacidad de liberar de manera específica el gen terapéutico infectando las células diana. Se han utilizado distintos tipos de virus modificados como adenovirus, virus del herpes simple, etc. Destacan el lentivirus y los virus adeno-asociados como los vectores con mejores resultados en la clínica, aunque determinados efectos secundarios han limitado su uso a nivel global. [14]

5.2.1.1. Lentivirus

Consiste en una forma modificada del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que en el momento de infección retrotranscribe su ARN a ADN para ser integrado en el material genético de la célula infectada, donde el gen integrado se expresa de forma estable.[15]

5.2.1.2. Virus adeno-asociados

Se trata de un virus de ADN monocatenario, no patógeno, que puede permanecer sin integrarse o integrarse en un sitio neutral del genoma, por lo que se le considera como un vector más seguro que el lentivirus.

La eficacia del uso de vectores virales ha sido probada con éxito en ensayos clínicos, aunque también se han observado importantes problemas de seguridad. En estudios como el realizado por Fisher *et al.*[16] se observó una relación entre el tratamiento con virus adeno-asociados y síntomas de leucemia. A los 3 años de seguimiento de los pacientes, estos presentaron síntomas de leucemia, coincidiendo con la integración del vector retrovírico en las proximidades del proto-oncogén responsable de la proliferación de las células patológicas. Esto ha supuesto una fuerte limitación para la aplicación de la terapia génica con vectores virales, dando paso a las nanopartículas como posible solución para su aplicación.

5.2.2. Vectorización no viral

Inicialmente, la alternativa a la vectorización viral consistía en la aplicación de métodos físicos para conseguir favorecer la entrada del gen terapéutico en la célula diana. Estos métodos, como la electroporación y la microinyección, actúan directamente sobre la permeabilidad de las membranas para favorecer la transfección. La electroporación aumenta la permeabilidad celular mediante la aplicación de corriente eléctrica. Mientras que la microinyección consiste en la inyección directa del gen terapéutico. Ambos métodos se caracterizan por ser demasiado invasivos y laboriosos, por lo que su aplicación *in vivo* no resulta viable. [6] Es por esto que en la actualidad, las nanopartículas se presentan como la alternativa principal, para la vectorización no viral *in vivo*.

5.3. NANOPARTÍCULAS PARA TERAPIA GÉNICA

Las nanopartículas se definen como estructuras de tamaño, entre 1 y 100 nm en al menos una de sus dimensiones.[17] Los nanomateriales que conforman las nanopartículas presentan propiedades que condicionan su tamaño y forma determinando su comportamiento químico, magnético y óptico. Por ello, requieren de una síntesis, purificación y caracterización específicas para obtener las propiedades deseadas. Debido a la gran variedad de nanopartículas según sus propiedades, son objeto de diversas aplicaciones industriales, agroalimentarias, ambientales y biomédicas. [18] El rápido avance en investigación de las nanopartículas y su aplicación en la medicina ha supuesto la consolidación de la nanomedicina como una nueva disciplina dedicada al estudio de las nanopartículas como medio para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades.

La investigación en nanopartículas para el transporte de fármacos se ha centrado en el desarrollo de nuevos medicamentos antitumorales gracias a su capacidad para dirigirse hacia los tumores gracias a la influencia del denominado efecto de incremento de permeabilidad y retención, o “EPR effect”. Este efecto se basa en los cambios fisiológicos producidos en los vasos sanguíneos que irrigan el tumor. (Fig. 3) Las células del endotelio vascular se encuentran más separadas en tejido tumoral que en el tejido sano, por espacios que pueden variar a lo largo del tejido irrigado de entre 200 y 600 nm. A su vez, la circulación linfática está disminuida permitiendo también la retención de las nanopartículas en el tejido tumoral. Este proceso se conoce como vectorización pasiva.[19] El tamaño de la nanopartícula de entre 10-100 nm, facilita su extravasación al tumor y evita su filtración renal. Además, las nanopartículas pueden dirigir el fármaco de forma activa, aumentando su selectividad por el tejido tumoral mediante la incorporación en su superficie de ligandos de receptores que se encuentran sobreexpresados en este tejido, conduciendo a la internalización de las nanopartículas por endocitosis mediada por receptor en la célula tumoral.[19] Una de las claves fundamentales para favorecer el desarrollo de ambos tipos de vectorización, pasiva y activa, consiste en aumentar el tiempo de circulación sistémica de las nanopartículas, ya que amplía la probabilidad de que estas lleguen a su tejido diana. [20]

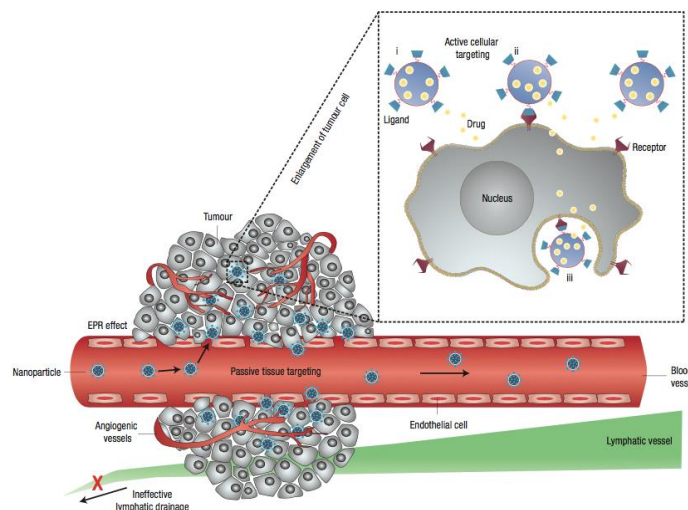


Figura 3. Esquema de mecanismos de vectorización pasiva y activa. [19]

Las nanopartículas en circulación sistémica son reconocidas y opsonizadas por proteínas séricas denominadas opsoninas, lo que favorece su reconocimiento y eliminación por las células del sistema fagocítico mononuclear. Otro proceso que condiciona su tiempo en circulación es la agregación de las nanopartículas producida por interacciones electrostáticas, resultando en

agregados que quedan retenidos en capilares. El estudio realizado por Huang *et al.*[21] describe la formación de agregados de nanopartículas lipídicas cargadas positivamente. Los agregados quedaron retenidos en los capilares pulmonares, impidiendo la llegada de las nanopartículas al hígado, su órgano diana. La principal estrategia para impedir estos procesos que condicionan el tiempo de circulación sistémica de las nanopartículas, y con ello la biodisponibilidad del fármaco que transportan es la *pegilación*. [20] Ésta consiste en el recubrimiento de la superficie de las nanopartículas con polietilenglicol (PEG). [20] El PEG es un polímero hidrofílico soluble en disolventes orgánicos y acuosos con una gran flexibilidad conformacional. Estas propiedades son las responsables de su capacidad para reducir la interacción de las nanopartículas entre ellas y con las opsoninas, disminuyendo su inmunogenicidad y aumentando su tiempo de circulación plasmática. Desde las primeras formulaciones comercializadas con nanopartículas *pegiladas* como Doxil® y Genexol PM®, la pegilación se ha convertido en un recurso ampliamente utilizado en la funcionalización de la superficie de las nanopartículas. [20]

El uso de las nanopartículas para el transporte de fármacos y otros sistemas terapéuticos implica el desarrollo de medicamentos con sistemas de liberación a medida. Estos sistemas son más específicos para la patología a tratar que los sistemas convencionales, minimizando los efectos secundarios y mejorando su eficacia. [19] Todo ello convierte a las nanopartículas en sistemas atractivos para la vectorización de la terapia génica.

5.3.1. Desarrollo de nanopartículas para terapia génica

El desarrollo de nanopartículas como vectores en terapia génica tiene como objetivo resolver las limitaciones que presenta esta terapia en cuanto a su transporte y entrada en la célula diana. (Fig. 4) La primera limitación se debe a la inestabilidad plasmática del ADN y ARN, ambos son susceptibles de degradación por medio de endonucleasas plasmáticas y tisulares, lo que hace necesario el desarrollo de nanopartículas capaces de proteger y transportar estos sistemas aumentando su tiempo de circulación en sangre y con ello su eficacia. [22]

Además de proteger el sistema terapéutico que transportan, las nanopartículas deben favorecer su extravasación al tejido diana, su internalización celular por endocitosis y posteriormente favorecer el escape del endosoma. [22]

Para favorecer su extravasación a tejido diana se utilizan ligandos de receptores sobreexpresados en las células diana, modificando la superficie de las nanopartículas con ligandos como los anticuerpos, proteínas, y aptámeros. Además de modificar su superficie, las nanopartículas pueden diseñarse para que sean sensibles a los cambios físicos o químicos que se producen en el tejido diana debido a su patología o a estímulos externos. Este tipo de nanopartículas denominadas estímulo-respuesta pueden ser sensibles al pH, a la temperatura, a la luz, o al campo magnético. [15] La internalización celular del sistema terapéutico es crítica para la eficacia del tratamiento, para ello se utilizan péptidos adyuvantes de la integración

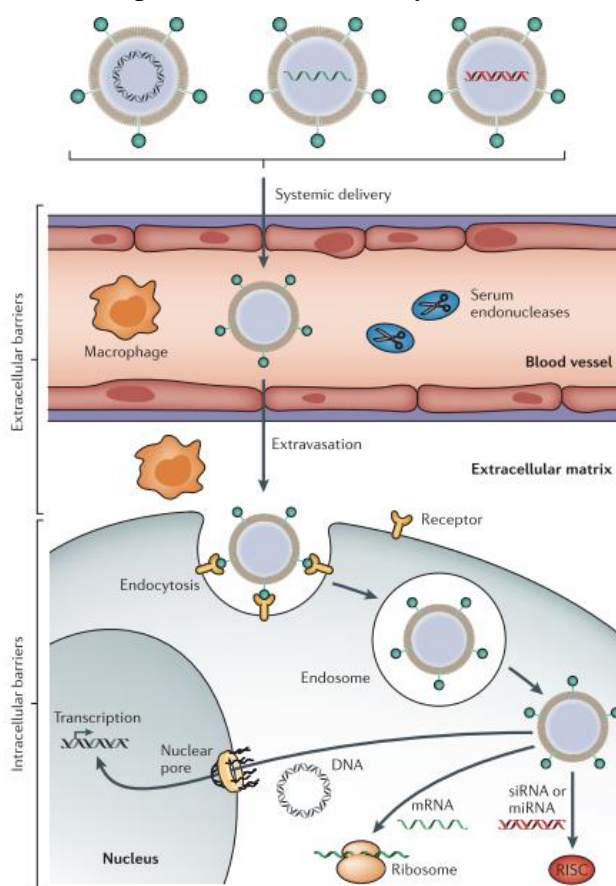


Figura 4. Proceso de vectorización de ácidos nucleicos con nanopartículas. [21]

celular que presentan secuencias de translocación que promueven la entrada de la nanopartícula en la célula y su endocitosis. Para su posterior escape endosomal las nanopartículas incorporan agentes desestabilizantes del endosoma, como la cloroquina, la melitina y la polietilenimina [PEI], que gracias a su carácter básico, provocan la entrada de protones e iones cloruro al interior del endosoma produciendo su lisis.[12]

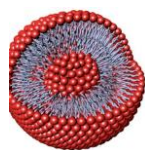
Dentro de los distintos tipos de nanopartículas que se encuentran en investigación para terapia génica se describen a continuación las de mayor relevancia. Según su origen químico distinguimos dos grandes grupos de nanopartículas, orgánicas e inorgánicas.

5.3.2. Nanopartículas orgánicas

Las nanopartículas orgánicas son todas aquellas formadas a partir de compuestos de síntesis orgánica como los polímeros, los lípidos, y las proteínas. Se trata del grupo más investigado para su uso como nanopartículas para el transporte de fármacos, y en el que encontramos un mayor número de ensayos clínicos y medicamentos en el mercado.[23]

Las nanopartículas orgánicas son un grupo muy heterogéneo con la capacidad de transportar diferentes fármacos o sistemas, lo cual se debe al estudio de diferentes nanomateriales y métodos para su síntesis, que condicionan sus características. Esto supone una gran versatilidad, permitiendo el diseño a medida de las nanopartículas para una determinada terapia y patología.

5.3.2.1. Nanopartículas lipídicas



Se clasifican como nanopartículas lipídicas a todas aquellas cuyo componente principal son lípidos. Éstas se caracterizan por ser las que tienen un uso más extendido, debido principalmente a que presentan propiedades óptimas de biocompatibilidad y biodegradabilidad. También cuentan con una gran similitud con las membranas biológicas, ya que facilita su entrada en la célula.[24]

Las nanopartículas lipídicas fueron las primeras en desarrollarse como vectores para el transporte de fármacos, con el desarrollo de los primeros liposomas. Los liposomas son estructuras esféricas formadas por una o varias capas lipídicas separadas por fases acuosas, permitiendo encapsular compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos en su interior. Por su capacidad para encapsular moléculas altamente hidrofóbicas, junto a sus excelentes propiedades de biocompatibilidad, los liposomas se han establecido como la principal nanopartícula para el transporte de fármacos quimioterápicos como la doxorubicina y otros compuestos altamente hidrofóbicos como la anfotericina B, cuyas formulaciones liposomales Doxil® y AmBiosome® fueron las primeras formulaciones con nanopartículas en salir al mercado.[19]

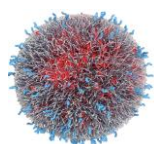
En su aplicación para la terapia génica, las nanopartículas lipídicas están formadas por lípidos catiónicos que aportan la carga positiva necesaria para la formación de complejos con la carga negativa de los ácidos nucleicos. Con este objetivo, se utilizan lípidos catiónicos sintéticos formados por una estructura de cabeza catiónica, cola hidrofóbica y un dominio de unión entre ambos. Las diferencias entre los distintos dominios dan lugar a los diferentes lípidos catiónicos sintéticos que se utilizan para la formación de liposomas como vectores en terapia génica.[22]

En la actualidad, el uso de las nanopartículas lipídicas en terapia génica se está especializando en la vectorización del ARN. Las formulaciones lipídicas conocidas como SNALP (del inglés, *stable nucleic acid-lipid particle*), se caracterizan por su capacidad para llevar los ácidos nucleicos al hígado gracias a su funcionalización con la apolipoproteína E (apoE), ligando de alta afinidad por su receptor específico presente en los hepatocitos. Esto se ha observado en estudios como el realizado por Jayaprakash KN *et al.*[25] que evalúa la eficacia del mecanismo de internalización de SNALP dependiente de la apoE, comparando la actividad

del ARNip entre la formulación con apoE y la formulación SNALP independiente de apoE. La formulación de SNALP con apoE presentó mejores resultados de internalización celular. Al igual que se utiliza con las nanopartículas para el transporte de fármacos, la formulación SNALP incluye también PEG, con el objetivo de formar una cubierta exterior neutra que impida su agregación e interacción con otras moléculas en sangre, aumentando su tiempo en circulación.[22]

Dentro de las nanopartículas lipídicas destaca también el desarrollo de micelas lipídicas para la vectorización de ADNp. El estudio realizado por Zhishen *et al.*[26] desarrolla la síntesis de micelas lipídicas termosensibles cargadas positivamente que interactúan con la carga negativa del ADNp, formando los denominados lipoplexos. Estas nanopartículas conocidas bajo las siglas MPMs (del inglés, *polyplex micelles with mixed shells*) están funcionalizadas por grupos termosensibles que cambian su comportamiento de hidrofílico a hidrofóbico en función de la temperatura, formando una corona heterogénea en su superficie. El estudio compara las micelas lipídicas no termosensibles con las MPMs, siendo estas últimas las que presentaron un mayor empaquetamiento del ADNp y un mayor tiempo de circulación.

5.3.2.2. Nanopartículas poliméricas



Se clasifican como nanopartículas poliméricas a todas aquellas nanopartículas formadas por polímeros. Estos polímeros pueden ser naturales o sintéticos, siendo estos últimos los más utilizados. Las propiedades de este tipo de nanopartículas dependen directamente de las características inherentes de los polímeros que las forman, por ello, es necesario realizar una síntesis controlada del polímero o copolímeros que se van a utilizar, ya que estos deben ser de un peso molecular, grado de polimerización y polaridad específicas.[19]

Los polímeros que se utilizan para la formación de nanopartículas deben ser biodegradables y biocompatibles, generando productos de degradación que puedan ser metabolizados y eliminados fácilmente. Para la formación de las nanopartículas poliméricas se pueden seguir dos estrategias, utilizando polímeros ya sintetizados o mediante la polimerización “in situ”. Dentro de la familia de nanopartículas poliméricas encontramos los polimerosomas, los dendrímeros, y las micelas poliméricas.[19]

Las micelas poliméricas representan el subgrupo más utilizado para el transporte de fármacos con nanopartículas poliméricas. Estas estructuras están formadas por copolímeros de carácter anfifílico, que en contacto con un medio acuoso se reorganizan formando micelas. [27] Su estructura esférica formada por un núcleo hidrofóbico y una cubierta hidrofílica hace posible el transporte de fármacos altamente hidrófobos al igual que los liposomas. Sin embargo, estos sistemas presentan una menor estabilidad, por lo que se han desarrollado micelas cuyo núcleo se encuentra unido covalentemente al fármaco que transportan, este tipo de micelas conocidas por sus siglas CCPM (del inglés, *core-crosslinked polymeric micelles*) presentan una estabilidad mayor, permitiendo una liberación controlada del fármaco, lo que las posiciona como principal alternativa al uso de liposomas.[28] Otras nanopartículas poliméricas utilizadas en el transporte de fármacos son los dendrímeros y los polimerosomas, aunque frente a las micelas poliméricas y otras nanopartículas orgánicas presentan un menor desarrollo y traslación clínica.

Las nanopartículas poliméricas utilizadas como vectores para terapia génica presentan la biodegradación como principal característica para su aplicación clínica. Por ello, se han desarrollado nanopartículas a partir de polímeros biodegradables, como el Poli(ácido láctico-co-glicólico) (PGLA), copolímero formado por Ácido láctico y glicólico, que se hidroliza en sus monómeros biocompatibles que son metabolizados y eliminados.[29] Este tipo de nanopartículas han sido utilizadas para el transporte de terapia génica con ADN y ARN. Zhang

et al.[30] desarrolla nanopartículas de PLGA para la vectorización de ADNp que expresa ARNi, mostrando una alta eficacia de inhibición, demostrando la capacidad de estas nanopartículas para vectorizar ADN. Al igual que para el transporte de fármacos se utiliza la pegilación como estrategia para mejorar el tiempo en circulación de las nanopartículas. Sekar *et al.*[31] sintetiza nanopartículas de PLGA-b-PEG para la vectorización de micro ARN antisentido para la inhibición de ARNm, responsable de la inducción de la metástasis y antiapoptosis en el cáncer de mama triple negativo, logrando una reducción del crecimiento del tumor del 40%.

Destaca también el uso de otros polímeros como la polietilimina (PEI) pegilada que estabiliza el ADN mediante la formación de poliplexos, además presenta grupos imina que se cargan positivamente al pH ácido del endosoma, favoreciendo la entrada de iones cloruro que desestabilizan el endosoma provocando su rotura y con ello el escape endosomal de las nanopartículas.[22] Debido a estas dos propiedades, las nanopartículas de PEI-PEG han sido objeto de un gran desarrollo para su uso en terapia génica. En la actualidad, se han desarrollado nanopartículas con PEI modificado mejorando su estabilidad y biocompatibilidad. Zhang *et al.*[29] desarrolla micelas formadas por el copolímero PEI-b-PLMD-b-PEI (del inglés, poly-ethylenimine-b-poly(lactide-co-3(S)-methyl-morpholine-2,5-dione)-b-polyethylenimine), capaces de formar poliplexos estables con ADNp, sistema capaz de inhibir la proliferación de células del músculo liso para el tratamiento de enfermedades coronarias. Las nanopartículas sintetizadas mostraron tener la capacidad para formar complejos estables con el ADNp, que fue transfectado con éxito a las células endoteliales.

También se han desarrollado dendrímeros para su uso en terapia génica. Éstos son macromoléculas poliméricas altamente ramificadas, con una gran facilidad para conjugar ligandos. Los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) han sido los más estudiados para el transporte de fármacos y terapia génica debido a su biocompatibilidad y a su tamaño, que facilita su excreción renal.[19] Los dendrímeros transportan el sistema terapéutico conjugado al igual que el resto de ligandos, por lo que se han desarrollado estrategias para optimizar la conjugación de ambos. La estrategia elaborada por Ying *et al.*[32] consiste en el desarrollo de dendrímeros en forma de corbata, presentando en uno de los dos extremos el agente terapéutico y en el otro los ligandos para su vectorización activa. Siguiendo esta estrategia, se elaboraron dendrímeros conjugados con micro ARN, poliarginina y el péptido Arg-Gly-Asp como ligandos. Los dendrímeros presentaron capacidad para proteger el micro ARN mediante la formación de dendriplexos, que lograron la correcta transfección del micro ARN.

5.3.3. Nanopartículas inorgánicas

Se definen como nanopartículas inorgánicas aquellas que están formadas a partir de materiales inorgánicos. Componen un grupo muy heterogéneo que destaca por su sencillez y facilidad de escalado en su síntesis y funcionalización. Son muy versátiles, ya que debido a sus propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas, son utilizadas para diferentes aplicaciones médicas como son el diagnóstico de imagen, la terapia fototérmica y la vectorización de fármacos y de terapia génica.[19] Dentro de este grupo se encuentran las nanopartículas de carbono, de grafeno, de óxido de hierro, de oro, de sílice mesoporosa y los nanotubos de carbono.

Las nanopartículas inorgánicas presentan características de liberación controlada que las diferencian del resto de nanopartículas, ya que además de las estrategias habituales de pegilación y conjugación con ligandos para favorecer su vectorización pasiva y activa, tienen también la capacidad de responder a estímulos externos ópticos.[33] Este es el caso de las nanopartículas de oro, que pueden utilizarse como vehículos multifuncionales que combinen el transporte de fármacos y la terapia fototermal. El estudio realizado por Bishof *et al.*[34] prueba la eficacia de la combinación de ambas terapias. Desarrolla nanoesferas de oro pegiladas y

conjugadas con el factor de necrosis tumoral (TNF- α), que combina con la aplicación de hipertermia en la zona del tumor para el tratamiento de cáncer de mama *in vivo*. Los resultados mostraron la supresión de la irrigación del tumor y una reducción en la supervivencia celular al 0,05% mediada por TNF- α . Otras nanopartículas inorgánicas como son las TCL-SPIONs (del inglés, *thermally crosslinked superparamagnetic iron oxide Nanoparticles*) han sido utilizadas combinando su uso para el diagnóstico de imagen por resonancia magnética junto con su capacidad para transportar fármacos, detectando tumores y liberando el fármaco antitumoral en el tejido patológico disminuyendo la toxicidad en tejidos no diana.[33]

La modificación de las nanopartículas inorgánicas para el transporte de genes puede realizarse de acuerdo con tres estrategias diferentes.[35] La más destacada, al igual que en las nanopartículas orgánicas consiste en la funcionalización con grupos de carga positiva que formen un complejo con el material genético a transportar. Otra estrategia, se basa en la conjugación directa de la nanopartícula con el material genético. Por último, se han desarrollado complejos de polímero-nanopartículas inorgánicas. En esta última estrategia cabe destacar el desarrollo de conjugados dendrímero-nanopartícula, ya que mejora en gran medida su eficacia de transfección.[35]

5.3.3.1. Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro destacan por ser las más estudiadas dentro de las nanopartículas inorgánicas. Esto es debido a su facilidad de funcionalización, que permite la utilización de estas, en técnicas de imagen, así como a su buena biocompatibilidad.[35] Aunque inicialmente, el extenso desarrollo de este tipo de nanopartículas tenía como fin el diagnóstico de imagen, el estudio de nuevas técnicas de síntesis de estos nanovectores ha permitido su uso como vectores de terapia génica.[36]

Se han desarrollado diferentes técnicas para la síntesis de las nanopartículas de oro, cuya evolución ha permitido un mayor control sobre su tamaño y forma. Distinguimos conforme dichas características las denominadas “nanoshells”, formadas por un núcleo de sílice cubierto por una monocapa de oro, y “nanorods”, formadas por cilindros de oro. En ambos casos la superficie de estas nanopartículas es modificada con aminoácidos, péptidos catiónicos y otras moléculas con grupos amino, dotando a la superficie de carga positiva para poder formar complejos con el ADN.[37] El uso de PEI para modificar la superficie de las nanopartículas de oro, es una de las principales estrategias, debido a su capacidad para potenciar la transfección génica. En el estudio realizado por T.G.Parck *et al.*[38] se sintetizan nanopartículas de oro funcionalizadas con PEI conjugado con catecol para el transporte de ARNiP. Las nanopartículas formaron complejos estables con el ARNiP logrando una excelente eficacia de transfección. También se han desarrollado nanopartículas de oro confinadas en dendrímeros (Au DENPs del inglés, *dendrimer entrapped gold Nanoparticles*) formando poliplexos que estabilizan el material genético vectorizado.[35] X.Cao *et al.*[39] desarrollan Au DENPs utilizando dendrímeros PAMAM modificados con β -Ciclodextrinas (Au DENPs- β -CD) para la vectorización de ARNiP para el tratamiento del glioblastoma. Las nanopartículas lograron una alta eficacia de transfección, posicionando las Au DENPs como una alternativa para la vectorización de ARNiP. (Fig. 5)

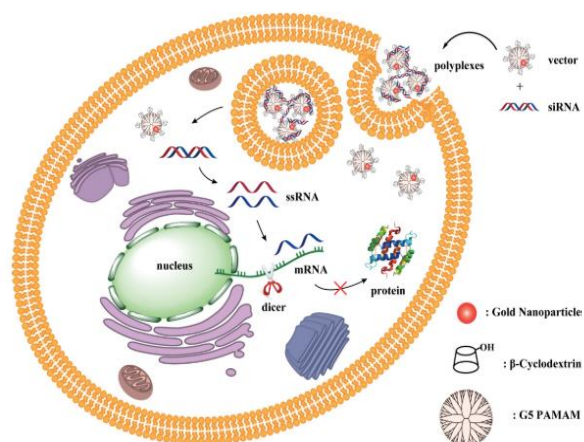
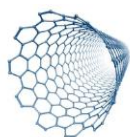


Figura 5. Esquema de vectorización de Au DENPs [39]

5.3.3.2. Nanotubos de carbono



Los nanotubos de carbono están formados por láminas de grafeno constituyendo una estructura tubular hueca. Pueden estar formados por una única lámina de grafeno o varias, denominándose monopared (SWNTs del inglés, *single-walled nanotubes*) o multipared (MWNT del inglés, *multi-walled nanotubes*) respectivamente.[35] Presentan como ventaja principal frente a otras nanopartículas que su mecanismo de entrada en la célula es independiente de la endocitosis, por lo que la eficacia de transfección no se ve comprometida por el escape endosomal.[35] Para estabilizar el ADN es necesaria la modificación de su superficie con grupos cargados positivamente para lo que se utilizan polímeros catiónicos. Por este método se han sintetizado SWNTs funcionalizados con glicopolímeros para la vectorización de DNAp.[40] Estos nanotubos modificados además de biocompatibles, presentaron una eficacia de transfección similar al agente de transfección comercial lipofectamineTM.

5.3.4. Comparativa de las nanopartículas para terapia génica

Tabla 1. Comparativa de las propiedades nanopartículas para terapia génica. [22],[35],[41]

Clasificación	NP	Biomaterial	Tamaño (nm)	Ventajas	Desventajas
Orgánicas	Poliméricas: Micelas Polimerosomas Dendrimeros	PLGA	50-500	Biocompatible Biodegradable	Requieren de reactivos de transfección: PEI Cloroquina Melitina
		PEI	50-500	Síntesis sencilla, con capacidad de controlar tamaño y peso molecular	
PLMD-PEI		50-500	Fácil funcionalización Forman complejos estables con ácidos nucleicos: Poliplexos		
PAMAM		50-500	Baja toxicidad		
	Lipídicas: Liposomas SNALP Micelas MPMs	Lípidos catiónicos	80-200	Biocompatible Baja inmunogenicidad Similitud con las membranas biológicas Rápida internalización Forman complejos estables con ácidos nucleicos: lipoplexos Fácil funcionalización Fácil conjugación	Requieren de reactivos de transfección: PEI Cloroquina Metilina
Inorgánicas	AuNPs: Nanoshells Nanorods AuDENPs	Oro	4-1000	Biocompatible Alta relación S/V Síntesis sencilla Fácil funcionalización Fácil conjugación Estable Terapia fototérmica	No biodegradables Requieren de reactivos de transfección
	Nanotubos de carbono: SWNTs MWNTs	Láminas de grafeno	0,4-100	Biocompatible Síntesis sencilla Fácil funcionalización Fácil conjugación Mecanismo de internalización celular independiente de endocitosis	No biodegradables

5.3.5. Investigación y Mercado



La nanomedicina está siendo objeto de numerosos estudios en investigación preclínica, entre los que encontramos estudios preclínicos sobre nanopartículas para terapia génica.[42]

Debido a su complejidad, la terapia génica presenta nuevos requerimientos en cuanto a su regulación, seguridad y ética frente al resto de alternativas terapéuticas, lo que dificulta su traslación clínica.[1] Las nanopartículas como vector aportan también una dificultad añadida a su traslación, ya que para que ésta se produzca se requiere una extensa investigación preclínica y la homogenización de criterios para realizar la caracterización necesaria para llevar a cabo un ensayo clínico.[43] De hecho hay un gran número de publicaciones académicas pero no más de 80 nanomedicinas en el mercado.[44] Con todo ello, desde los primeros ensayos clínicos con nanopartículas como vectores para terapia génica llevados a cabo en 2003[42], ha habido un aumento en el número de los ensayos clínicos. Esto se ha debido al desarrollo y comercialización de otras nanomedicinas. A todo esto, se suma la preocupación por la seguridad de los vectores virales. En la actualidad, se han aprobado o se encuentran en desarrollo hasta 2600 ensayos clínicos en terapia génica, de los cuales 304 se han llevado a cabo con vectores no virales.[42] La mayoría de los ensayos clínicos en terapia génica con nanopartículas se han desarrollado con nanopartículas lipídicas, debido al amplio desarrollo de sus homólogos en la vectorización de fármacos con diversas nanomedicinas ya en el mercado, lo que facilita la aprobación de ensayos clínicos por parte de los comités éticos y agencias regulatorias. [45]

Destacan sobre todo los ensayos clínicos de nanopartículas lipídicas como vectores de ARNi que actualmente se encuentran en desarrollo, como el estudio en fase I/II de TKM-080301, que consiste en una formulación de nanopartículas lipídicas para la vectorización de ARNi frente a PLK1 para el tratamiento de cáncer adrenocortical. [15] En el estudio, se han incluido no solo pacientes de cáncer de páncreas, sino que también se han incluido pacientes de cáncer colorrectal, gástrico, mama, y ovarios con metástasis hepática, teniendo todos en común la expresión de PLK1.

El ensayo clínico de mayor relevancia realizado con nanopartículas para la vectorización de la terapia génica es el denominado estudio APOLLO, en el que se investiga una formulación de nanopartículas lipídicas cargadas con Patisiran, ARNi inhibidor específico de la síntesis hepática de la transtiretina, para el tratamiento de la amiloidosis hereditaria mediada por transtiretina. [46] El estudio ha finalizado su fase III con la aprobación de su comercialización por la FDA y la EMA. Bajo el nombre comercial de Onpattro™.

Este medicamento elaborado por la compañía biotecnológica Alnylam Pharmaceuticals, está comercializado en Estados Unidos.[47] En Europa, la aprobación de la comercialización de Onpattro™ se ha llevado a cabo mediante el procedimiento centralizado, lo que significa que a pesar de presentar la aprobación común para todos los estados miembros, sus condiciones de comercialización han de ser negociadas con cada una de las agencias regulatorias estatales. En España, la Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios ha acordado empezar a trabajar en su informe de posicionamiento terapéutico, en el que se discutirá si el medicamento será o no financiado por el sistema nacional de salud.[48]



Figura 6. Primer medicamento comercializado de terapia génica con Nanopartículas, Onpattro™

6. CONCLUSIONES



El desarrollo de la terapia génica con las nuevas estrategias moleculares de silenciamiento y edición genómica supone un gran avance en el ámbito de aplicación clínica de estos tratamientos. Aunque los avances realizados hasta ahora con terapia génica *ex vivo* y con vectores virales *in vivo* están permitiendo el tratamiento de la causa de ciertas patologías, la evolución de estos tratamientos queda totalmente condicionada por el desarrollo de nuevos vectores que permitan optimizar el tratamiento.[4]

La investigación en nanopartículas para terapia génica las está posicionando como nuevos vectores más versátiles y seguros que los vectores virales, lo que ha supuesto una extensa investigación preclínica que ha permitido el desarrollo de las distintas alternativas aquí descritas. Sin embargo, a pesar de la extensa investigación preclínica, encontramos escasos estudios clínicos que superen la fase I/II y un único medicamento comercializado. Esto es debido a la complejidad que supone formular con nanopartículas, ya que presentan problemas de reproducibilidad y escalado.[44] Para el futuro avance de la nanomedicina, y con ello, de la terapia génica, es necesaria la unificación de criterios en la investigación preclínica, estableciendo la información mínima necesaria para el desarrollo de nuevas formulaciones con nanopartículas. Esto será posible mediante la implantación de protocolos, para la caracterización de las nanopartículas, así como su aceptación por parte de la comunidad científica, lo que permitirá la consolidación de las nanopartículas como un nuevo sistema para el transporte de fármacos.[43] El desarrollo de estas formulaciones con el objetivo de avanzar en la introducción de la terapia génica en la práctica clínica, supone un acercamiento a lo que conocemos como medicina personalizada, cuya base reside en el tratamiento de enfermedades basándonos en su etiología genética de forma específica e individual para cada paciente. Todo ello supone una gran complejidad que dificulta el paso de estos prometedores medicamentos al mercado. Al igual que ocurría con los primeros fármacos biológicos comercializados, la apertura de un nuevo mercado como es la terapia génica y la nanomedicina requiere de procedimientos más complejos para su aprobación por parte de las agencias regulatorias.[49]

Debido a que la mayoría de las formulaciones en investigación clínica se encuentran aún en estudio, resulta complicado vaticinar cual de las nanopartículas estudiadas será el candidato más idóneo para continuar con el desarrollo de la terapia génica no viral. Al igual que sucedió con la aprobación de las primeras formulaciones con nanopartículas para el transporte de fármacos, se espera que la reciente comercialización de Onpattro™, suponga un gran avance en el desarrollo de futuros medicamentos con nanopartículas lipídicas para el transporte de ARNi. Las nanopartículas lipídicas presentan un mayor desarrollo preclínico y clínico frente al resto de nanopartículas y presentan propiedades que sin duda pueden hacernos pensar que son mejores candidatas que el resto para continuar con el desarrollo de este tipo de formulaciones. A pesar de ello, cabe recordar que la terapia génica requiere de vectores específicos para cada tipo de sistema o gen terapéutico, por lo que no es posible establecer un único tipo de nanopartículas como la mejor opción para su formulación. El diseño de las nanopartículas para su uso en terapia génica deberá seguir siendo personalizado para cada tipo de patología y terapia, ya que es junto con su seguridad, el valor añadido que ofrecen las nanopartículas frente a los vectores virales.

Cabe destacar que el primer medicamento comercializado con ARNi formulado en nanopartículas no ha sido desarrollado por ninguna de las conocidas como “*big pharma*”, sino que ha sido desarrollado por una Bio-Startup, Alnylam, contrariamente de lo que cabría esperar por la fuerte inversión en investigación que se requiere para lanzar al mercado este tipo de medicamentos. Esto ha generado una gran expectación sobre la facturación generada por la

salida al mercado Onpattro TM, ya que de ello depende que consiga generar suficientes beneficios para seguir invirtiendo en investigación, o si por el contrario los grandes laboratorios tomarán el relevo en la innovación con estos medicamentos.

Todos estos avances están suponiendo una auténtica revolución en la medicina actual, que requerirá de equipos multidisciplinares capaces de hacer frente a las exigencias que este tipo de terapia requiere. Su aplicación clínica abrirá una puerta a todas aquellas enfermedades hasta ahora consideradas crónicas, pero también la abrirá a otro sin fin de aplicaciones que pueden llegar a ser éticamente cuestionables, por lo que su aplicación ha de ir ligada al desarrollo de una legislación que regule su práctica clínica, junto con la correspondiente formación del personal sanitario.

La revolución de la terapia génica ha venido para quedarse y la nanomedicina tiene la oportunidad de consolidarse como una indiscutible aliada para su implantación en la clínica.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. *Science* 2018;359 (6372).
2. Nathwani. Long term gene therapy for FiX. 2015;371(21):1994–2004.
3. Naldini L. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet.* 2011;12(5):301–15.
4. Dowdy SF, Levy M. RNA Therapeutics (Almost) Comes of Age: Targeting, Delivery and Endosomal Escape. *Nucleic Acid Ther.* 2018;28(3):107–8.
5. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol Ther.* 2016;24(3):430–46.
6. Liu C, Zhang L, Liu H, Cheng K. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *J Control Release.* 2017;266(June):17–26.
7. Liang X, Potter J, Kumar S, Zou Y, Quintanilla R, Sridharan M, et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol.* 2015; 208:44–53.
8. Urnov F, Lanphier E, EHlen Haecker S, Werner M, Smolenski J. (Comment) Don't edit the human germ line. *Nature.* 2015; 519:410–1.
9. Mocellin S, Provenzano M. RNA interference: Learning gene knock-down from cell physiology. *J Transl Med.* 2004; 2:1–6.
10. Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Nonviral vector-mediated RNA interference: Its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(9):760–6.
11. Matsui Y, Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y. Sequence-specific suppression of *mdr1a/1b* expression in mice via RNA interference. *Pharm Res.* 2005;22(12):2091–8.
12. Dowdy SF. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. *Nat Biotechnol.* 2017;35(3):222–9.
13. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2019 Feb 28.
14. Wilson RC, Gilbert LA. The Promise and Challenge of in Vivo Delivery for Genome Therapeutics. *ACS Chem Biol.* 2018;13(2):376–82.
15. Chen J, Guo Z, Tian H, Chen X. Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2016;3(September 2015):16023.
16. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science* 2003;302(5644):415–9.
17. Pelaz B, Alexiou C, Alvarez-Puebla RA, Alves F, Andrews AM, Ashraf S, et al. Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano.* 2017;11(3):2313–81.
18. Zaman M, Ahmad E, Qadeer A, Rabbani G, Khan RH. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation. *Int J Nanomedicine.* 2014;9(1):899–912.
19. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol.* 2007;2(12):751–60.

20. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016; 99:28–51.
21. Li S, Rizzo MA, Bhattacharya S, Huang L. Characterization of cationic lipid-protamine–DNA (LPD).pdf. 1998;930–7.
22. Moore MO. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics.* 2014;15(1):43–66.
23. Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf SM, McCullough J. The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2013;9(1):1–14.
24. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(1):36–48.
25. Akinc A, Querbes W, De S, Qin J, Frank-Kamenetsky M, Jayaprakash KN, et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol Ther.* 2010;18(7):1357–64.
26. Li Y, Li J, Chen B, Chen Q, Zhang G, Liu S, et al. Polyplex micelles with thermoresponsive heterogeneous coronas for prolonged blood retention and promoted gene transfection. *Biomacromolecules.* 2014;15(8):2914–23.
27. Ferrari R, Sponchioni M, Morbidelli M, Moscatelli D. Polymer nanoparticles for the intravenous delivery of anticancer drugs: the checkpoints on the road from the synthesis to clinical translation. *Nanoscale.* 2018;10(48):22701–19.
28. Hu Q, Prakash J, Rijcken CJF, Hennink WE, Storm G. High systemic availability of core-crosslinked polymeric micelles after subcutaneous administration. *Int J Pharm.* 2016;514(1):112–20.
29. Lv J, Yang J, Hao X, Ren X, Feng Y, Zhang W. Biodegradable PEI modified complex micelles as gene carriers with tunable gene transfection efficiency for ECs. *J Mater Chem B.* 2016;4(5):997–1008.
30. Zhang C, Wang YS, Wu H, Zhang ZX, Cai Y, Hou HY, et al. Inhibitory efficacy of hypoxia-inducible factor 1 α short hairpin RNA plasmid DNA-loaded poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles on choroidal neovascularization in a laser-induced rat model. *Gene Ther.* 2010;17(3):338–51.
31. Devulapally R, Sekar NM, Sekar T V., Foygel K, Massoud TF, Willmann JK, et al. Polymer nanoparticles mediated codelivery of AntimiR-10b and AntimiR-21 for achieving triple negative breast cancer therapy. *ACS Nano.* 2015;9(3):2290–302.
32. Gray WD, Wu RJ, Yin X, Zhou J, Davis ME, Luo Y. Dendrimeric bowties featuring hemispheric-selective decoration of ligands for microRNA-based therapy. *Biomacromolecules.* 2013;14(1):101–9.
33. Murakami M, Ernsting MJ, Li SD. Theranostic Nanoparticles for Cancer Imaging and Therapy. *Nanomater Drug Deliv Imaging, Tissue Eng.* 2013;155(3):369–93.
34. Visaria RK. Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle-assisted tumor necrosis factor- delivery. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(4):1014–20.
35. Loh XJ, Lee TC, Dou Q, Deen GR. Utilising inorganic nanocarriers for gene delivery. *Biomater Sci.* 2016;4(1):70–86.

36. Hassan S, Prakash G, Bal Ozturk A, Saghadzadeh S, Farhan Sohail M, Seo J, et al. Evolution and clinical translation of drug delivery nanomaterials. *Nano Today*. 2017;15:91–106.
37. Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(11):1307–15.
38. Lee, S. H. Lee, J. S. Kim, A. Maruyama, X. Chen and T. G. Park, *J. Controlled Release*, 2011, 155,3–10.
39. Qiu J, Kong L, Cao X, Li A, Wei P, Wang L, et al. Enhanced Delivery of Therapeutic siRNA into Glioblastoma Cells Using Dendrimer-Entrapped Gold Nanoparticles Conjugated with β -Cyclodextrin. *Nanomaterials*. 2018;8(3):131.
40. Ahmed, X. Jiang, Z. Deng and R. Narain, *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20, 2017–2022.
41. Wong JKL, Mohseni R, Hamidieh AA, MacLaren RE, Habib N, Seifalian AM. Will Nanotechnology Bring New Hope for Gene Delivery? *Trends Biotechnol*. 2017;35(5):434–51.
42. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017 - an update. *J Gene Med*. 2018;20(2):65–77.
43. Faria M, Björnmalm M, Thurecht KJ, Kent SJ, Parton RG, Kavallaris M, et al. Minimum information reporting in bio–nano experimental literature. *Nat Nanotechnol*. 2018;13(9):777–85.
44. Kulkarni JA, Cullis PR, van der Meel R. Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. *Nucleic Acid Ther*. 2018;28(3):146–57.
45. Adams D, Gonzalez-Duarte A, O’Riordan WD, Yang C-C, Ueda M, Kristen A V., et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2018;379(1):11–21.
46. Drugs FDA. Novel Drug Approvals for 2018. FDA. 2018.
47. Grupo de coordinación de Posicionamiento Terapéutico. Información sobre la reunión del 18 de julio de 2018. AEMPS 2018.
48. Venditto VJ, Szoka FC. Cancer nanomedicines: So many papers and so few drugs! *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(1):80–8.
49. Sainz V, Conriot J, Matos AI, Peres C, Zupančič E, Moura L, et al. Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;468(3):504–10.