

# Ingeniería Genética II

## Unidad VIII

***RNAs no codificantes***  
***Parte A: Aplicaciones del iRNA***

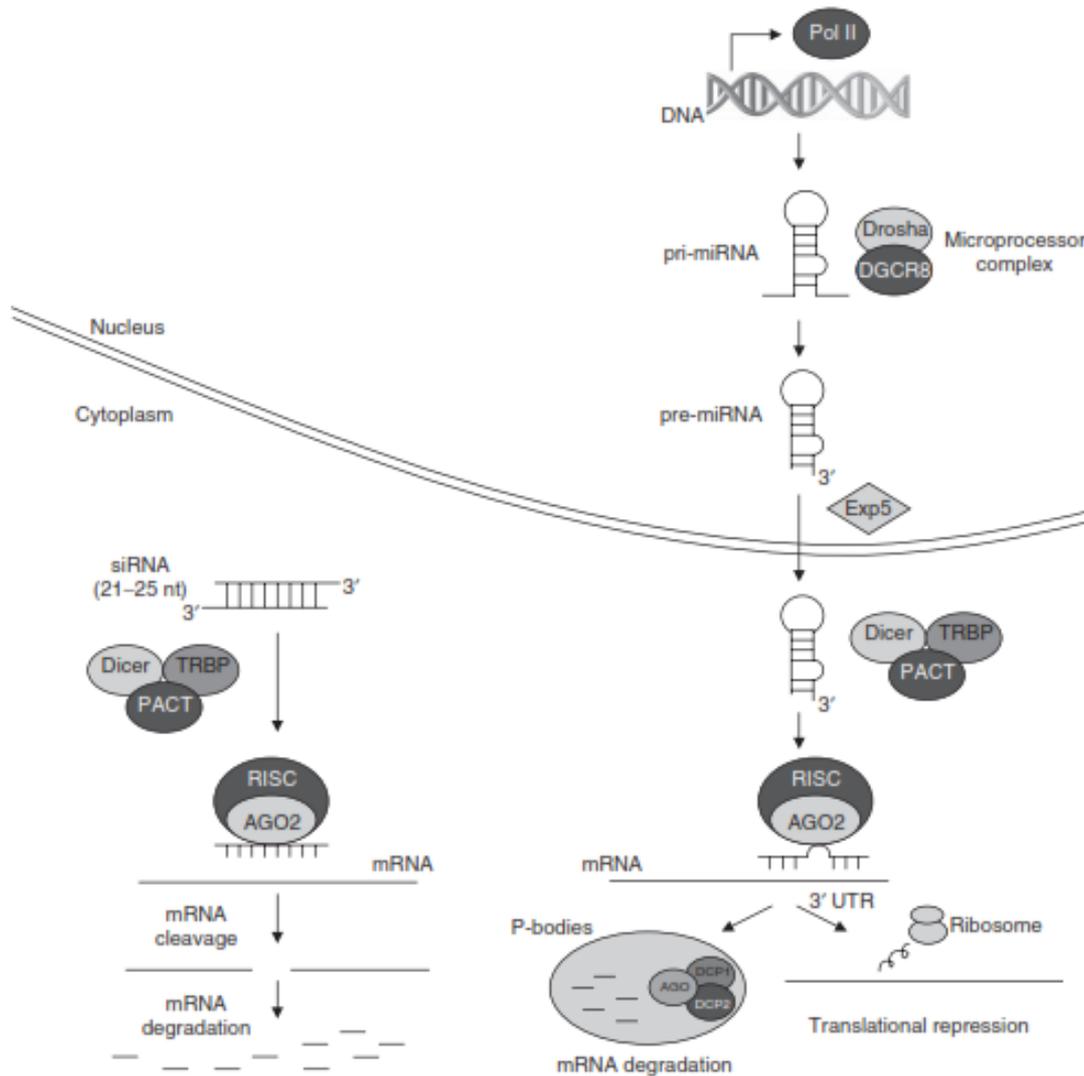
# RNAs no codificantes

## Aplicaciones del iRNA

- El **mecanismo de interferencia de RNA** ha sido descrito en numerosos organismos.
- Su mecanismo, conocido como **PTGS** (*Post-Transcriptional Gene Silencing*) o **Knock down génico** involucra la existencia de un dsRNA pequeño y la participación de varias enzimas intracelulares.
- Su papel en los organismos es central, tanto para la **regulación de la expresión génica**, como para **proteger a la célula de infecciones virales**.
- Ante este panorama, se han desarrollado **estrategias experimentales** para aprovechar el mecanismo de interferencia en **biología molecular básica y aplicada**.

# RNAs no codificantes

## Aplicaciones del iRNA



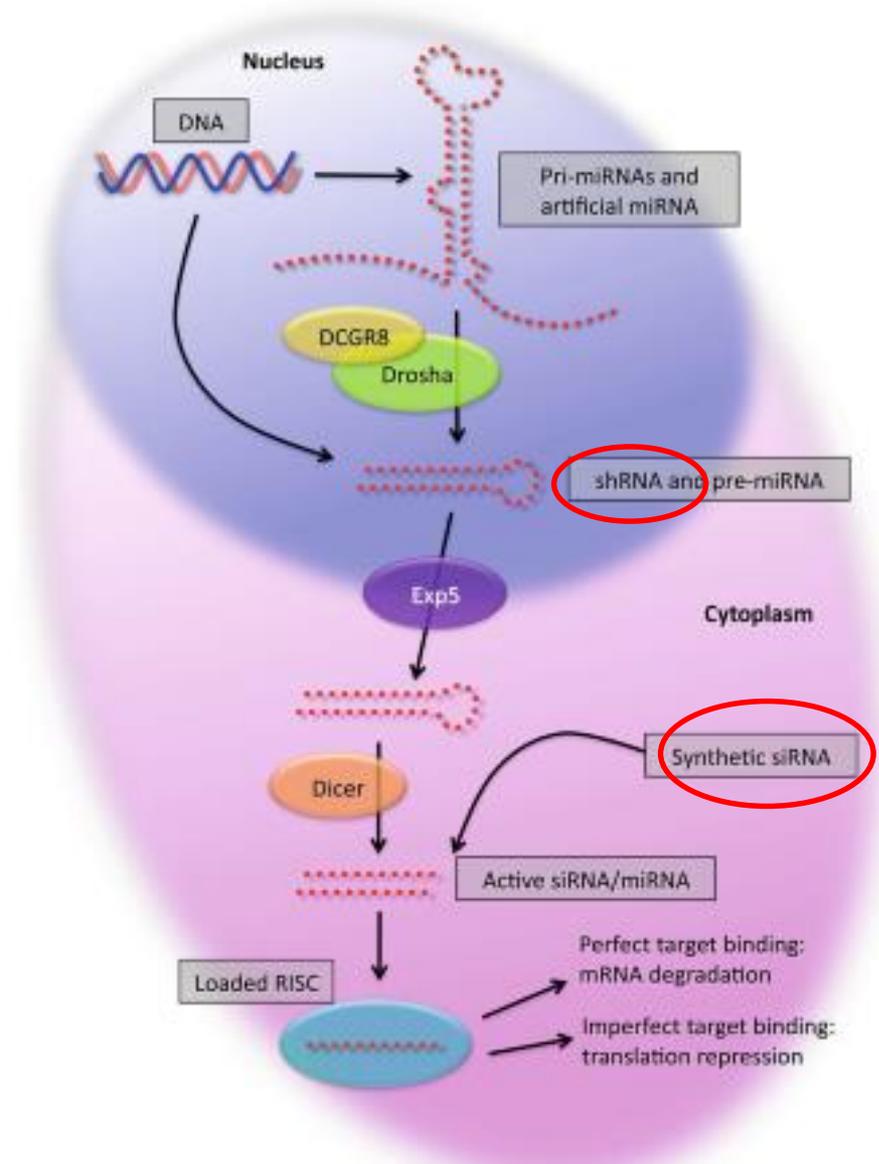
# RNAs no codificantes

## Aplicaciones del iRNA

- El **aprovechamiento** del mecanismo de interferencia de RNA o **iRNA** se **basa** en la **introducción** dentro de la célula de **sdsRNA** (*small dsRNAs*) o de la **síntesis** endógena de **shRNA** (*short hairpin RNAs*).
- Los **sdsRNAs** son **sintéticos** mientras que los **shRNAs** son derivados de la **expresión de genes** **construidos *ad hoc***.
- Tanto en biología básica como aplicada, la **utilización** de **iRNA** pretende **evitar** la **traducción de un mRNA** con el fin de responder preguntas científicas o de constituir una terapia.
- En cualquiera de los dos casos, es **necesario diseñar adecuados sdsRNAs o shRNAs** y **evaluar** los **procedimientos** de su **vehiculización** dentro de las células diana.

# RNAs no codificantes

## Aplicaciones del iRNA



# RNAs no codificantes

## Aplicaciones del iRNA

Biología básica

***Knock down* génico** en modelos celulares o de organismos para **estudiar funciones celulares y orgánicas.**

Biología aplicada

**Diseño de terapias basadas en RNAi** para el **control de enfermedades** tales como:

- *Diferentes tipos de cáncer,*
- *Diversas patologías genéticas,*
- *Procesos anómalos del metabolismo,*
- *Alergias y procesos inflamatorios,*
- *Infecciones virales y de otros parásitos intracelulares.*

# RNAs no codificantes

## Aplicaciones del iRNA

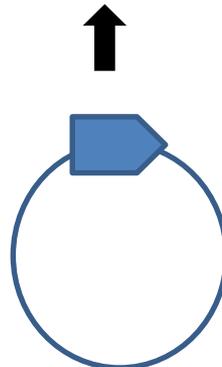
En **cualquiera** de las **posibles utilizaciones** del mecanismo del **iRNA**, es **necesario considerar** lo siguiente:



siRNA sintético



shRNA de síntesis endógena



Construcción genética



Sistema de delivery o vehiculización a la célula diana

# ¿Cuáles son los requerimientos para la síntesis de siRNA?



siRNA sintético

# **iRNAs en biología**

## **Generación de siRNAs sintéticos**

**Flujo de trabajo en la generación de siRNAs**



# iRNAs en biología

## Generación de siRNAs sintéticos

### Consideraciones en la síntesis de siRNAs



- Las **secuencias diana** deberían estar a **50-100 pb *downstream*** del **ATG**.
- **Secuencias** muy **adecuadas** son **AA (N19) TT** o **NA (N21)**, o **NAR (N17) YNN**, donde N es cualquier nucleótido, R es una purina (A, G) e Y es pirimidina (C, U).
- El **contenido** de GC de la secuencia blanco debería estar entre **35-60%**.
- Se deben **evitar repeticiones** de **4 o más nucleótidos**.
- **Evitar secuencias** de los **UTRs**, aunque pueden ser funcionales.
- **Evitar secuencias** con **alta homología** a otros genes.

# iRNAs en biología

## Generación de siRNAs sintéticos

### Consideraciones en la síntesis de siRNAs



- La **fente** de la **información** es conveniente que sea **secuencia transcriptómica**, dado que así se tiene evidencia previa que la región elegida sea transcripta.
- Es conveniente **diseñar varios siRNA distintos** para el *knock down* de un gen, dado que algunos pueden funcionar mejor que otros (en general, 4 siRNAs).
- Los **nucleótidos** de los **extremos** (*overhang*) es conveniente que sean **dNTPs** (reducen costos y son más resistentes a la acción de nucleasas).
- También, es **recomendable** para dar mayor resistencia a las nucleasas que los **nucleótidos** de los **extremos** estén modificados en sus grupos fosfato (**fosforotioatos**).

# iRNAs en biología

## Generación de siRNAs sintéticos

### Consideraciones en la síntesis de siRNAs



- **Reynolds** y colaboradores\* definieron un **score numérico** para considerar en el **diseño de siRNA**.
- El **valor umbral** que debe dar el **score** es **6**.
- Todos los que den un **resultado mayor a 6** son **considerados buenos** candidatos para **siRNA**.
- Es **recomendable** también **diseñar un siRNA control** que **no** tenga **homología significativa** con el **genoma** de la célula en estudio.

# siRNAs en biología

## Generación de siRNAs sintéticos

Criteria	Description	Score	
		Yes	No
1	Moderate to low (30%-52%) GC Content	1 point	
2	At least 3 A/Us at positions 15-19 (sense)	1 point /per A or U	
3	Lack of internal repeats (Tm* < 20°C)	1 point	
4	A at position 19 (sense)	1 point	
5	A at position 3 (sense)	1 point	
6	U at position 10 (sense)	1 point	
7	No G/C at position 19 (sense)		-1 point
8	No G at position 13 (sense)		-1 point

# iRNAs en biología

## Generación de siRNAs sintéticos

### Ejemplo en el diseño de siRNA...

Homo sapiens vimentin (VIM), mRNA, NM\_003380

```

1 GGGCGCGCCA GAGACGCAGC CGCGCTCCCA CCACCCACAC CCACCGCGCC CTCGTTCGCC
61 TCTTCTCCGG GAGCCAGTCC GCGCCACCGC CGCCGCCAG GCCATCGCCA CCCTCCGCAG
121 CCATGTCCAC CAGGTCCGTG TCCTCGTCCT CCTACCGCAG GATGTTTCGGC GGCCCGGGCA
181 CCGCGAGCCG GCCGAGCTCC AGCCGGAGCT ACGTGACTAC GTCCACCCGC ACCTACAGCC
241 TGGGCAGCGC GCTGCGCCCC AGCACCAGCC GCAGCCTCTA CGCCTCGTCC CCGGGCGGCG
301 TGTATGCCAC GCGCTCCTCT GCCGTGCGCC TGGCGAGCAG CGTGCCCGGG GTGCGGCTCC
361 TGCAGGACTC GGTGGACTTC TCGCTGGCCG ACGCCATCAA CACCGAGTTC AAGAACACCC
421 GCACCAACGA GAAGGTGGAG CTGCAGGAGC TGAATGACCG CTTCGCCAAC TACATCGACA
481 AGGTGCGCTT CCTGGAGCAG CAGAATAAGA TCCTGCTGGC CGAGCTCGAG CAGCTCAAGG
541 GCCAAGGCAA GTCGCGCCTA GGGGACCTCT ACGAGGAGGA GATGCGGGAG CTGCGCCGGC
601 AGTGGACCA GCTAACCAAC GACAAAGCCC GCGTCGAGGT GGAGCGCGAC AACCTGGCCG
  
```

**AA(N19)TT**

```

Vimentin cDNA: 5' AACTACATCGACAAGGTGCGCTT
                  |||
sense siRNA: 5' CUACAUCGACAAGGUGCGC-dTdT
                  |||
antisense siRNA:3' dTdT-GAUGUAGCUGUUCCACGCG 5'
  
```

# iRNAs en biología

## Generación de siRNAs sintéticos

### Ejemplo en el diseño de siRNA...

Homo sapiens vimentin (VIM), mRNA, NM\_003380

```

1 GGGCGCGCCA GAGACGCAGC CGCGCTCCCA CCACCCACAC CCACCGCGCC CTCGTTTCGCC
61 TCTTCTCCGG GAGCCAGTCC GCGCCACCGC CGCCGCCAG GCCATCGCCA CCCTCCGCAG
121 CCATGTCCAC CAGGTCCGTG TCCTCGTCCT CCTACCGCAG GATGTTTCGGC GGCCCGGGCA
181 CCGCGAGCCG GCCGAGCTCC AGCCGGAGCT ACGTGACTAC GTCCACCCGC ACCTACAGCC
241 TGGGCAGCGC GCTGCGCCCC AGCACCAGCC GCAGCCTCTA CGCCTCGTCC CCGGGCGGCG
301 TGTATGCCAC GCGCTCCTCT GCCGTGCGCC TCGGGAGCAG CGTGCCCGGG GTGCGGCTCC
361 TGCAGGACTC GGTGGACTTC TCGCTGGCCG ACGCCATCAA CACCGAGTTC AAGAACACCC
421 GCACCAACGA GAAGGTGGAG CTGCAGGAGC TGAATGACCG CTTCGCCAAC TACATCGACA
481 AGGTGCGCTT CCTGGAGCAG CAGAATAAGA TCCTGCTGGC CGAGCTCGAG CAGCTCAAGG
541 GCCAAGGCAA GTCGCGCCTA GGGGACCTCT ACGAGGAGGA GATGCGGGAG CTGCGCCGGC
601 AG↑TGGACCA GCTAACCAAC GACAAAGCCC GCGTCGAGGT GGAGCGCGAC AACCTGGCCG
  
```

**AA(N19)TT**

```

Vimentin cDNA: 5' AACTACATCGACAAGGTGCGCTT
                   |||
sense siRNA: 5' CUACAUCGACAAGGUGCGC-dTdT
                   |||
antisense siRNA:3' dTdT-GAUGUAGCUGUCCACGCG 5'
  
```

**dNTPs** (más económicos y resistentes a nucleasas)

# iRNAs en biología

## Generación de siRNAs sintéticos

### Síntesis de oligonucleótidos para siRNA

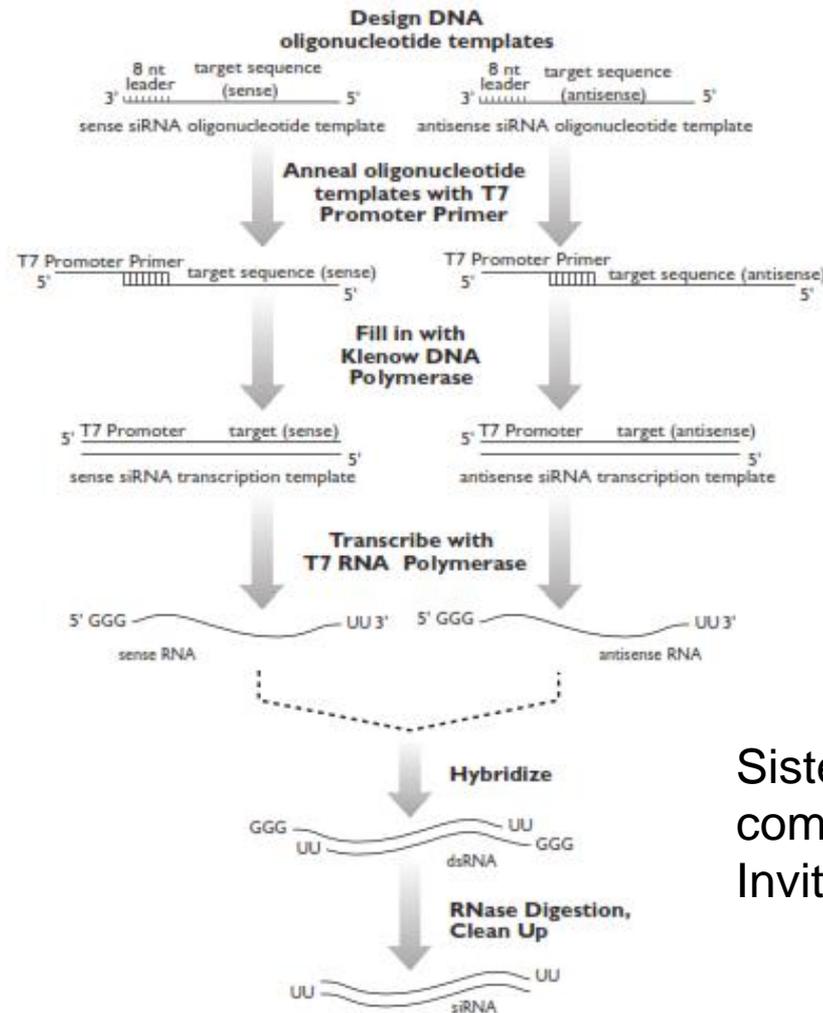


- Una vez **diseñados**, los **oligonucleótidos** son **sintetizados** mediante **procedimientos químicos** tradicionales.
- Cuando se disponen de los **dos oligonucleótidos** (*sense* y *antisense*), los mismos deben ser **mezclados en iguales cantidades** moleculares en un **buffer** adecuado (Acetato de potasio 100 mM; HEPES-KOH 30 mM a pH 7,4; Acetato de Magnesio 2mM).
- Se debe **calentar 1 minuto a 90°C**, y luego **incubar 1 hora a 37°C**.
- Muchas **empresas comercializan** los **siRNAs** ya **preparados**, e incluso ofrecen muchos siRNAs validados para numerosos genes de distintos organismos.

# iRNAs en biología

## Generación de siRNAs sintéticos

Una alternativa para la generación de siRNAs :

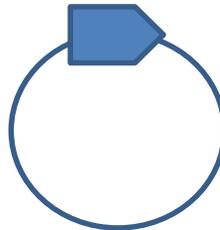


Sistema comercializado por Invitrogen

# ¿Cuáles son los requerimientos para la generación de shRNAs a partir de construcciones genéticas?



shRNA de síntesis endógena

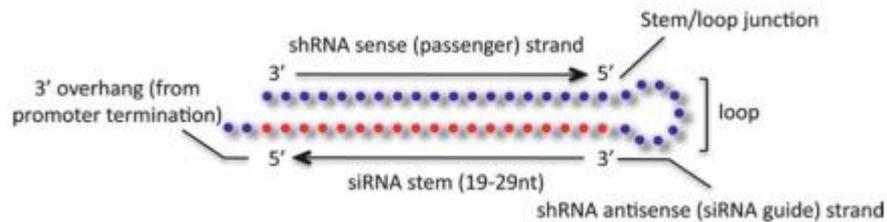


Construcción genética

# siRNAs en biología

## Generación de shRNAs

Flujo de trabajo en la generación de shRNAs



# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

### Consideraciones en el diseño del gen para shRNA



- Los **shRNAs** son **transcriptos** que serán **generados** dentro de la **célula diana**.
- Por ende, es **necesario** realizar una **construcción genética** que contenga un gen adecuado que exprese el shRNA apropiado para el gen que se desea silenciar.
- Esto **requerirá** de un **clonado molecular** completo en *Escherichia coli*, requiriéndose para tal fin de un plásmido que actúe de plataforma, y de la constitución de un inserto que derive en la generación del shRNA.
- Así, esta **construcción genética contendrá** un **gen funcional** en la célula diana donde se desea silenciar el gen, el cual debería generar un transcripto que sea procesado por la maquinaria celular responsable de la interferencia del RNA.

# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

### Consideraciones en el diseño del gen para shRNA



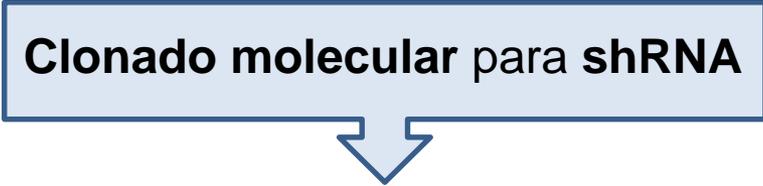
- El **gen** que se debe construir **debe contener** los **componentes sintácticos adecuados** para que sea funcional en la célula en estudio.
- Así, pueden utilizarse **promotores para RNA pol II** (típicos de los genes de miRNA), o **promotores para RNA pol III**.
- Una **ventaja** de los **segundos** es que son **muy fuertes** y el **producto** de RNA **no posee el tag de poly A** en el extremo 3'.
- En cualquier de los casos, la **región transcribible** debe **generar un dsRNA**.



# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

### Clonado molecular para shRNA

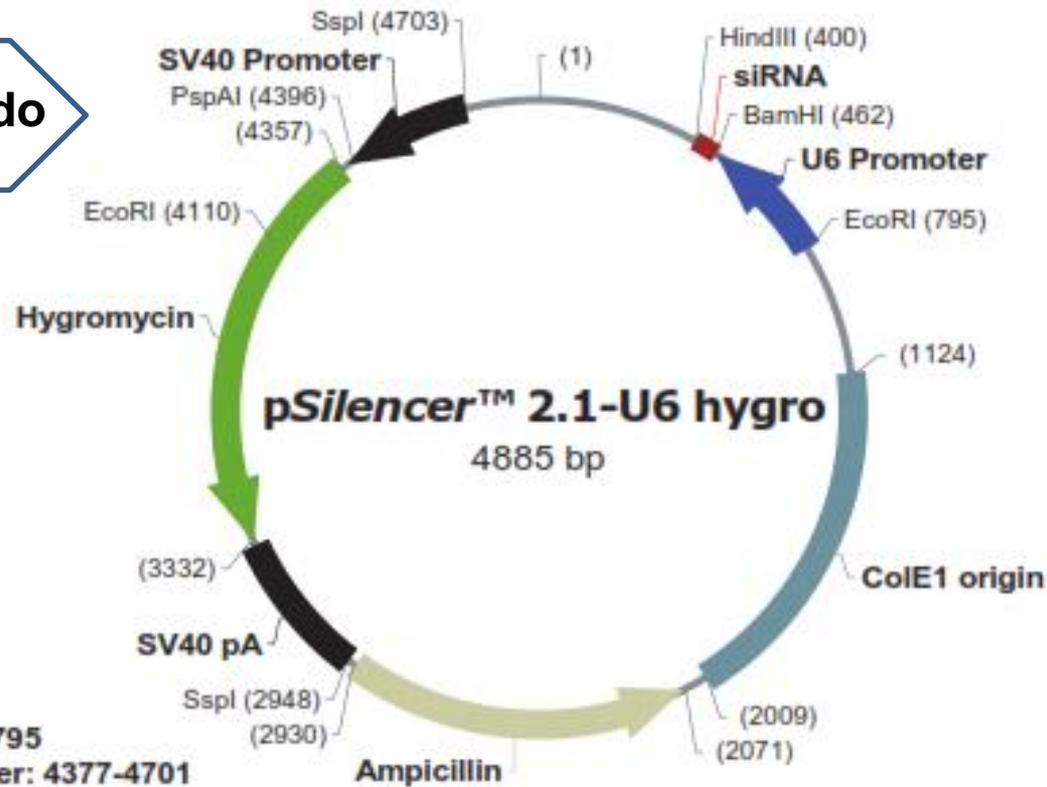


- 1) Objetivo: silenciar un gen en estudio.
- 2) Diseño de la molécula.
- 3) Aislamiento de plásmido (MCS flanqueado por regiones adecuadas para la transcripción dentro de la célula en estudio).
- 4) Aislamiento de inserto (generación de *sense/loop/antisense*)
- 5) Apertura del plásmido.
- 6) Compatibilización de extremos.
- 7) Ligación de plásmido e inserto.
- 8) Transformación en *Escherichia coli*.
- 9) Selección de Bacterias transformantes.
- 10) Selección de Bacterias conteniendo la construcción genética de interés.

# siRNAs en biología

## Generación de shRNAs

Ejemplo de plásmido

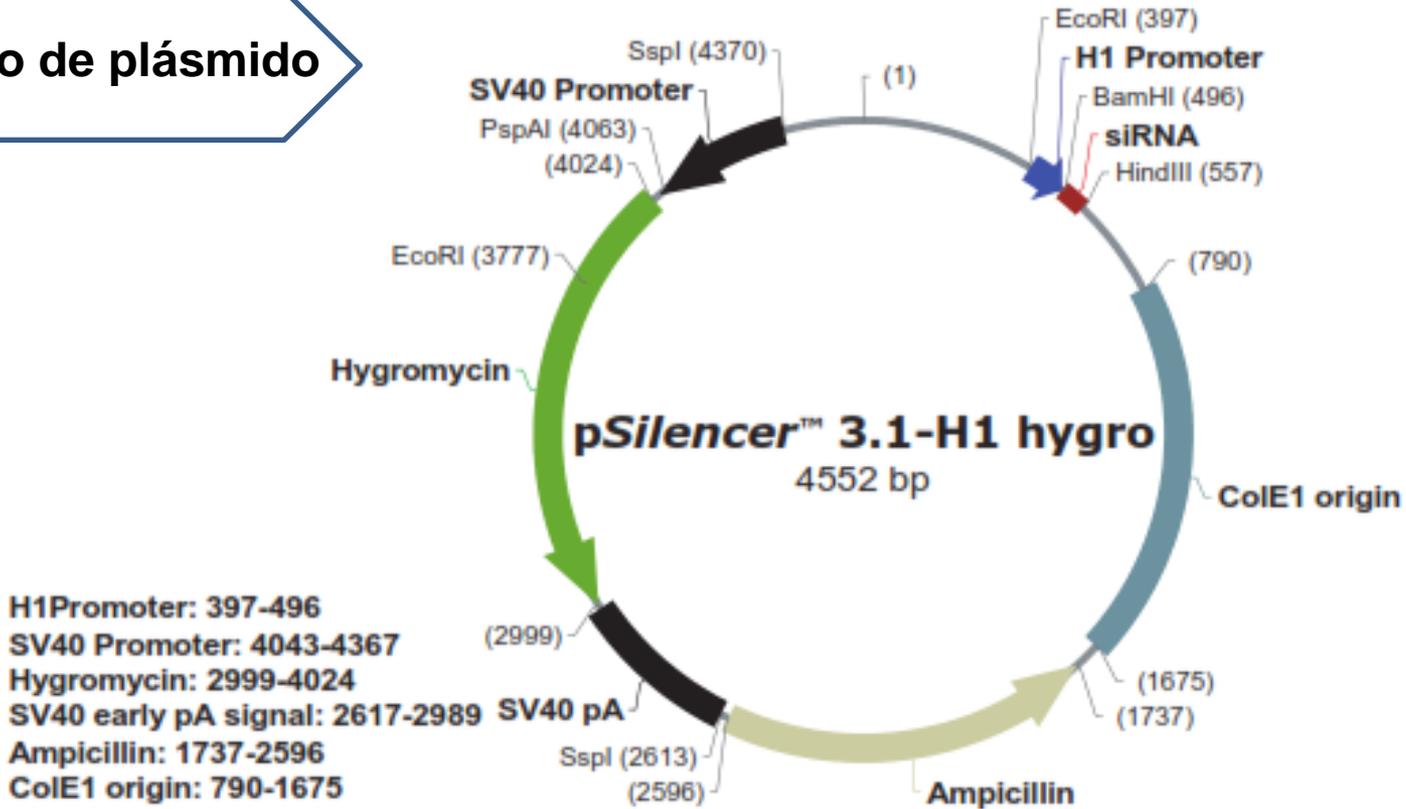


U6 Promoter: 462-795  
SV40 early Promoter: 4377-4701  
Hygromycin: 3332-4357  
SV40 early pA signal: 2951-3323  
Ampicillin: 2071-2930  
ColE1 origin: 1124-2009

# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

Ejemplo de plásmido

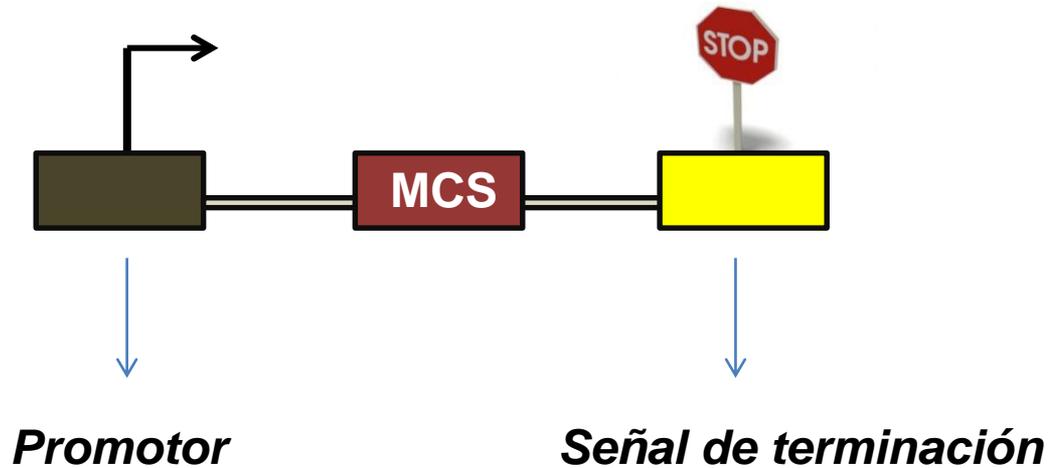


# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

Región de clonado

Los **plásmidos** para **generar shRNA** contienen la siguiente región de clonado:

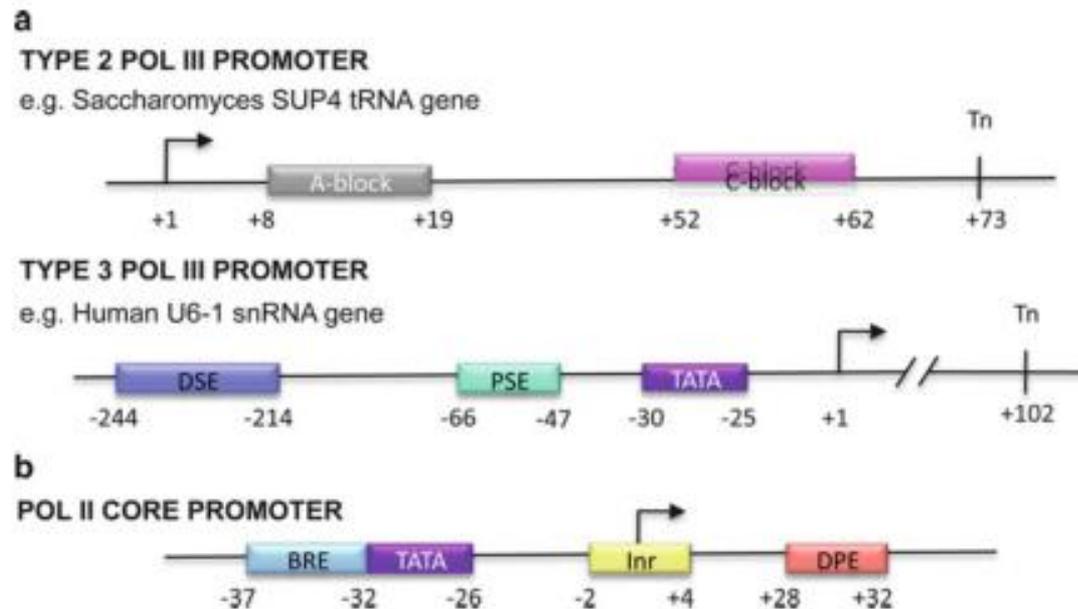


# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

Promotores

Los promotores más empleados son los de RNA pol III y RNA pol II:



# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

### Promotores

Las **ventajas** del uso de los **promotores** para **RNA pol III** son:

- *Son promotores compactos y fuertes.*
- *Producen en la célula sncRNAs*
- *Tienen señales de terminación pequeñas (4-5 timidinas) dejando extremos 3' precisos.*

En general, los **más utilizados** son los **promotores H1 y U6**.

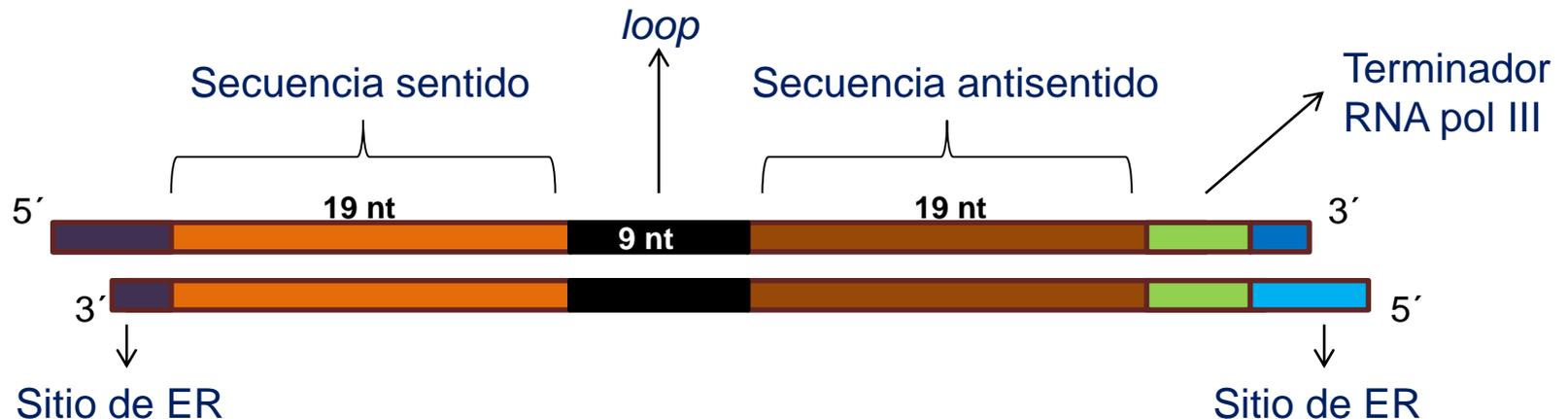
# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

### Insertos

- Para la **generación del inserto**, es necesario **considerar los mismos criterios** que en el **diseño y síntesis de siRNA** antes descritos.

- De este modo, una vez **detectadas las regiones potenciales** para silenciar (de 2 a 4 por gen), **deben diseñarse oligonucleótidos** de ssDNA que posean las siguientes características:



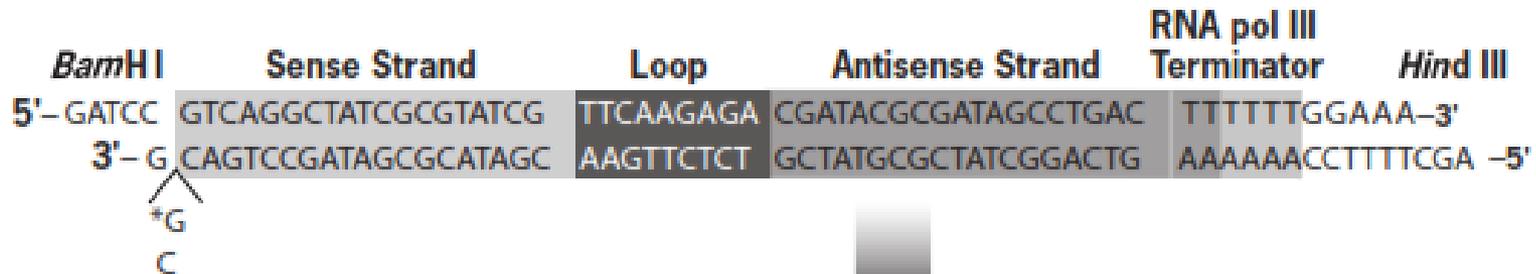
# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

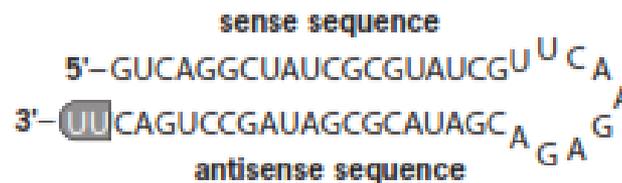
Example Target Sequence (AA plus 19 nt)



Annealed Hairpin siRNA Template Insert (order these 2 oligonucleotides)



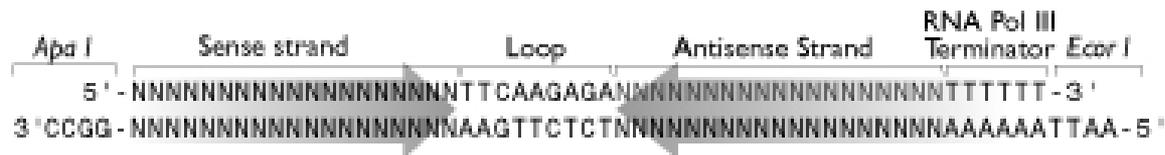
Hairpin siRNA Structure



# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

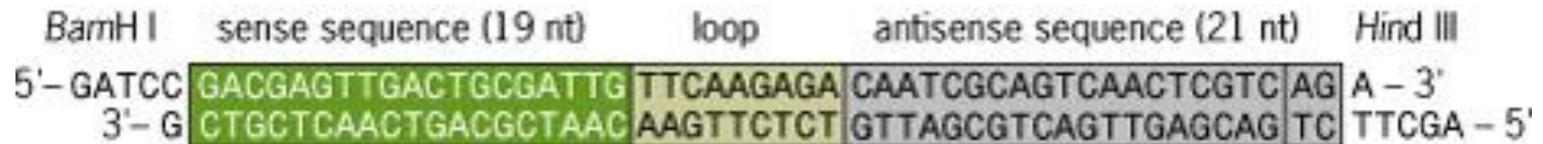
Otros ejemplos de insertos para vectores con promotores de RNA pol III...



# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

Ejemplos de insertos para vectores con **promotores de RNA pol II**...

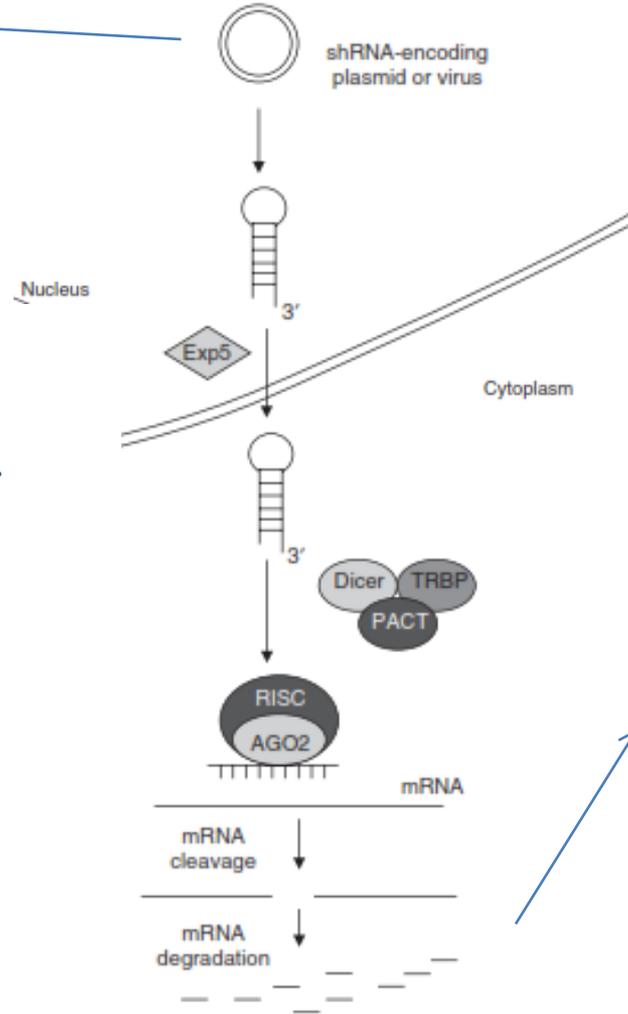


# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

Construcción genética

Mecanismo de los shRNA

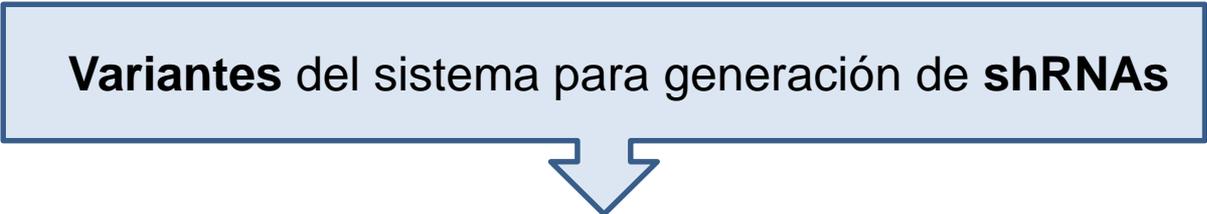


Silenciamiento

# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

**Variantes** del sistema para generación de **shRNAs**



- ***Expresión inducible de shRNAs***
- ***Expresión de múltiples shRNAs***

# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

### *Expresión inducible de shRNAs*

- En estos **sistemas**, existe un **elemento de secuencia** que **controla la transcripción del gen** que expresa los shRNA.
- Uno de los sistemas más utilizados es el **sistema inducible por tetraciclina**.
- La simple **adición del antibiótico** (tetraciclina o doxiciclina) **desbloquea** el **gen** (Tet-On), mientras que su **remoción** lo **bloquea** (Tet-Off).

# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

### *Expresión inducible de shRNAs*

- El **sistema contiene** un la **secuencia operadora Tet** *downstream* al promotor (**TetO**).
- También, contiene un **gen** que codifica una **proteína transactivadora** (**Tet repressor**).
- La proteína **Tet repressor** se **une** muy eficientemente a **TetO**, **evitando** la **transcripción**.
- La simple **adición** de **tetraciclina** o de **doxiciclina** forma un **complejo** con la **proteína represora**, la cual deja de unirse a TetO.

# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

*Expresión inducible de shRNAs*

{TTCCOCTATTCAGTGTGATAGAGATCT}

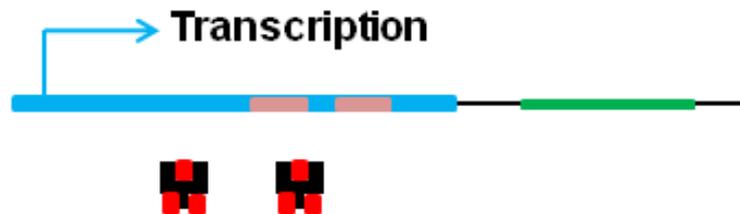
Tet operator

Inducible system



tetR protein

Tetracycline (or doxycycline)



Expression is  
tetracycline-dose dependent  
(commonly used at 1µg/ml)

# iRNAs en biología

## Generación de shRNAs

### *Expresión de múltiples shRNAs*

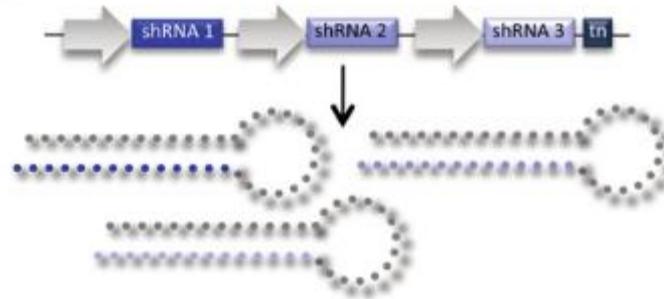
- Es posible expresar varios shRNAs a partir de una **única construcción**.
- Esto se ha intentado construyendo **varios genes** en un mismo plásmido.
- Aunque también se ha realizado generando **1 gen** que expresa un **dsRNA** grande.

# iRNAs en biología

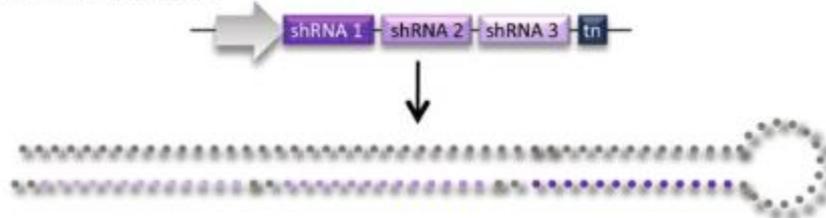
## Generación de shRNAs

### *Expresión de múltiples shRNAs*

Multiple promoter shRNA



Long hairpin RNA/Extended shRNA



**¿Cuáles son los mecanismos  
de vehiculización más  
utilizados para siRNA y  
shRNA?**



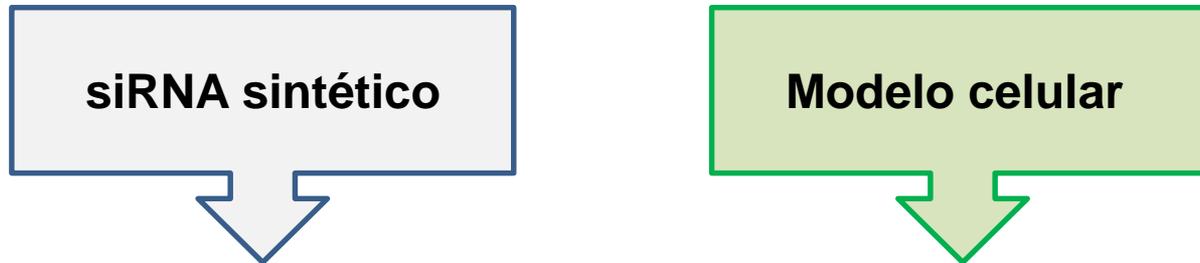
# iRNAs en biología

## Delivery de siRNA y construcciones de shRNA

- Ya **generados** los **siRNAs sintéticos** o realizada la **construcción genética para la biogénesis de shRNA**, es **necesario** utilizar un **sistema de *delivery* o vehiculización** de los ácidos nucleicos en las células deseadas.
- La **aplicación de iRNA** puede ser **en cultivo celular o en organismos**, siendo en ambos casos diferente la aproximación.
- Por otro lado, los **siRNAs sintéticos** siempre tendrán un **efecto transitorio**, mientras que las **construcciones para generar shRNA pueden establecerse** de manera **definitiva**.

# siRNAs en biología

## Delivery de siRNA y construcciones de shRNA



- El **procedimiento clásico** es la **transfección** (lipofección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio).
- En este diseño experimental, es importante **contar con un control negativo de siRNA**.
- También es importante **poner a punto la transfección** con un **plásmido control** que **expresa una proteína indicadora**.
- El **análisis** de la eficiencia del silenciamiento debe realizarse mediante **Northern Blot**, **RT-qPCR** y/o **Western Blot**.

# iRNAs en biología

## Métodos de transfección

### PROCEDIMIENTOS DE TRANSFECCIÓN

Con fosfato de Calcio

Con lípidos

Con polímeros  
catiónicos

Por electroporación

- El DNA disuelto en un *buffer* fosfato genera un precipitado en contacto con iones de calcio.

- La célula incorpora el precipitado mediante endocitosis.

- Los lípidos catiónicos forman complejos estables con el DNA.

- Estos complejos se asocian a las membranas celulares e ingresan por endocitosis.

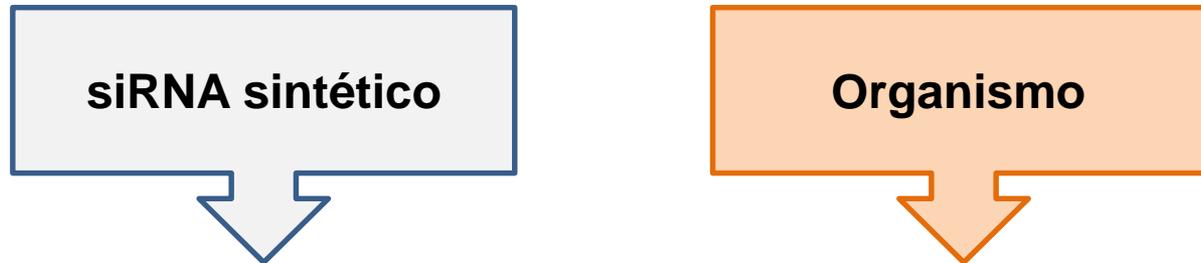
- El DEAE-Dextrano es un polication que se asocia al DNA.

- El complejo se asocia a las membranas celulares e ingresa por endocitosis.

- El DNA ingresa por los microporos de las células al someterlas con un pulso eléctrico.

# siRNAs en biología

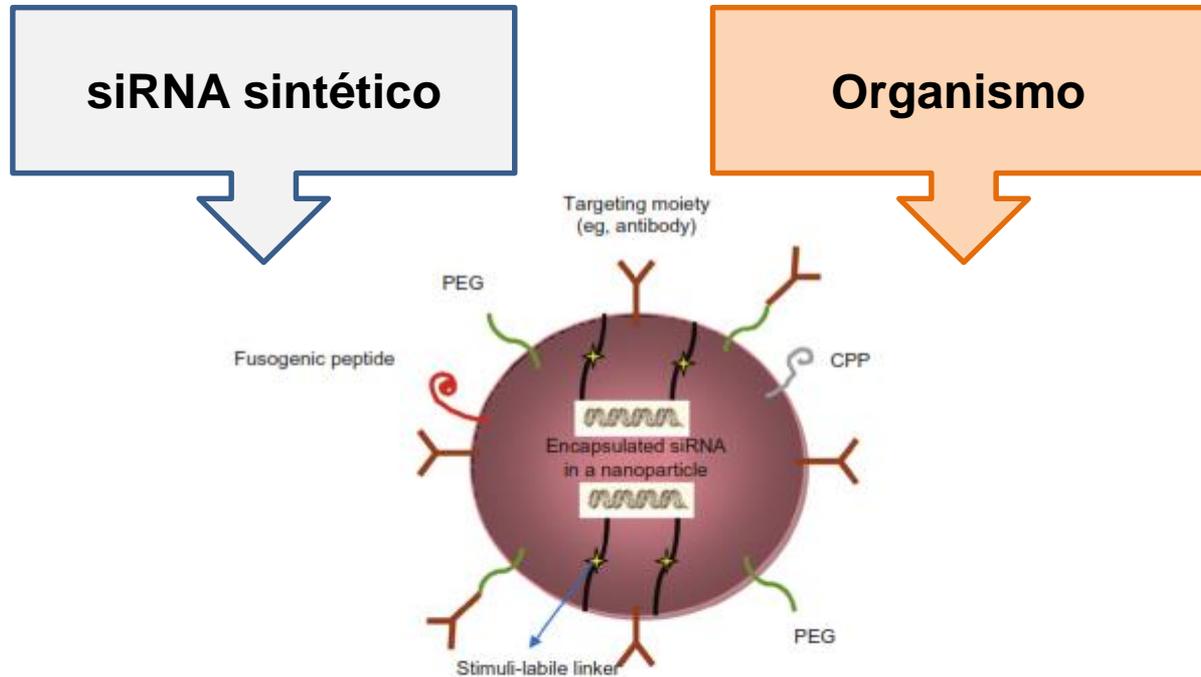
## Delivery de siRNA y construcciones de shRNA



- El uso de **siRNAs sintéticos** en **organismos** tiene **aplicaciones biomédicas**.
- En estos casos, es **complejo** direccionar el **siRNA** a las **células diana**.
- Si bien **se puede administrar siRNA desnudo**, es **conveniente** armar **complejos** que conduzcan a una **mayor vida media** y a una **mejor biodistribución**.

# siRNAs en biología

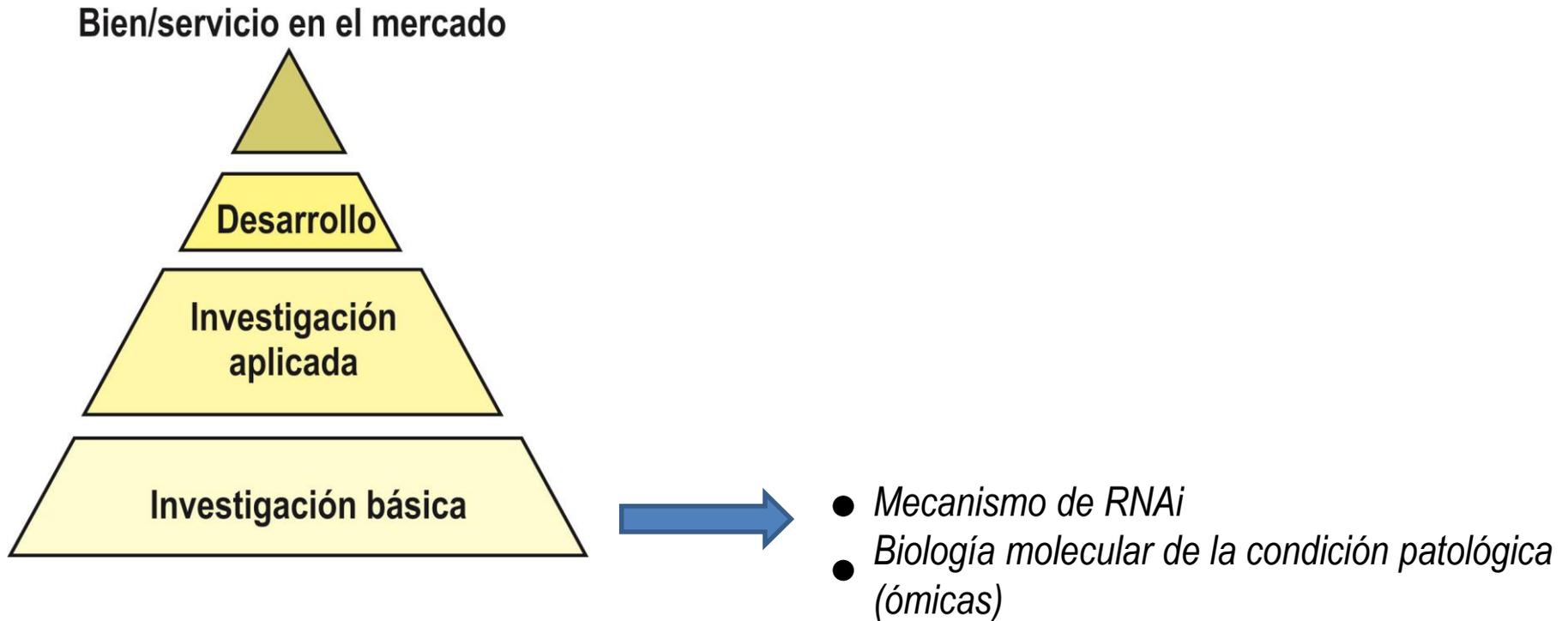
## Delivery de siRNA y construcciones de shRNA



Component	Design goal
siRNA complexed in a cationic polymeric nanoparticle	Protection from enzymatic degradation; efficient transport and cellular uptake
Polyethylene glycol (PEG) shell	Retarded clearance by RES and renal filtration; reduced toxicity
Targeting moiety (eg, folic acid, peptide or antibody)	Specific binding to target tissue/cell
Cell-penetrating peptide (CPP)	Enhanced cellular internalization
Fusogenic peptide or lipid, or endosome destabilizing polymer	Facilitated siRNA release from the endosome
Stimuli-labile linker	Efficient siRNA dissociation from its carrier in the cytoplasm

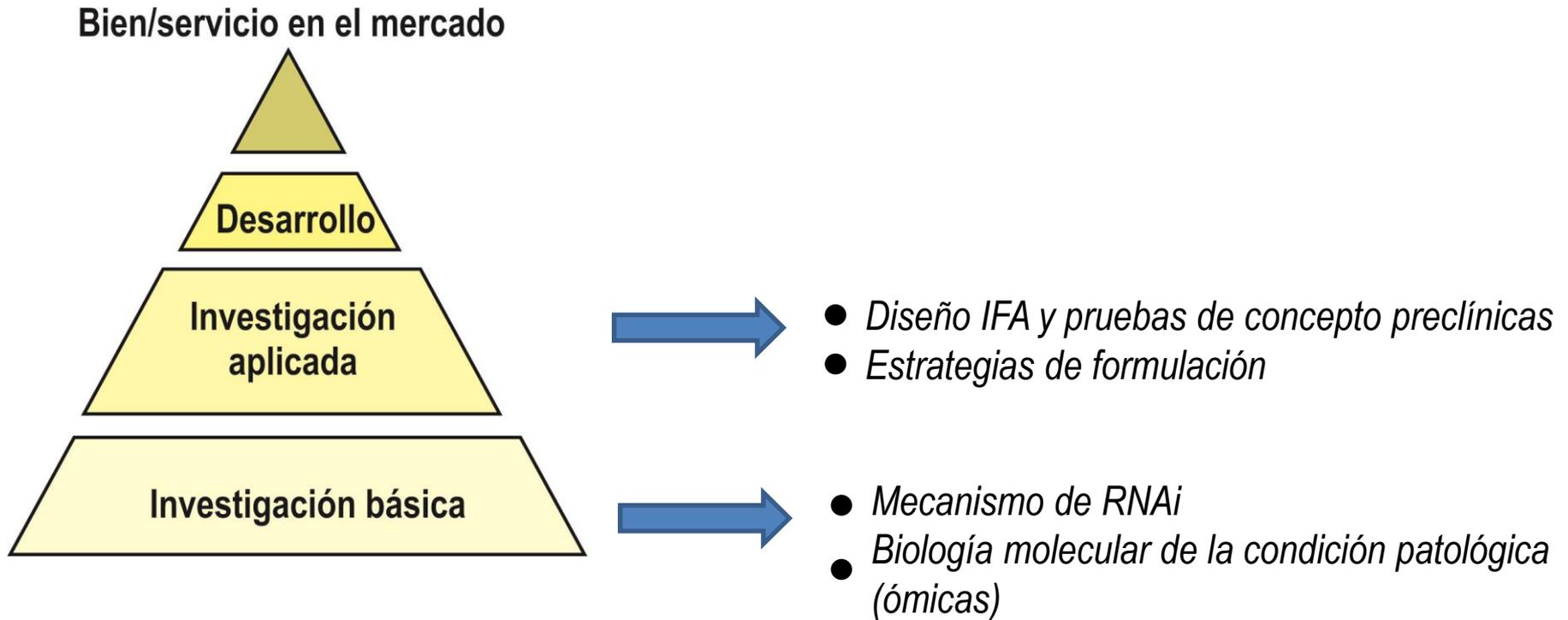
# iRNAs en biología

Ensayos preclínicos y clínicos para tratamientos en seres humanos



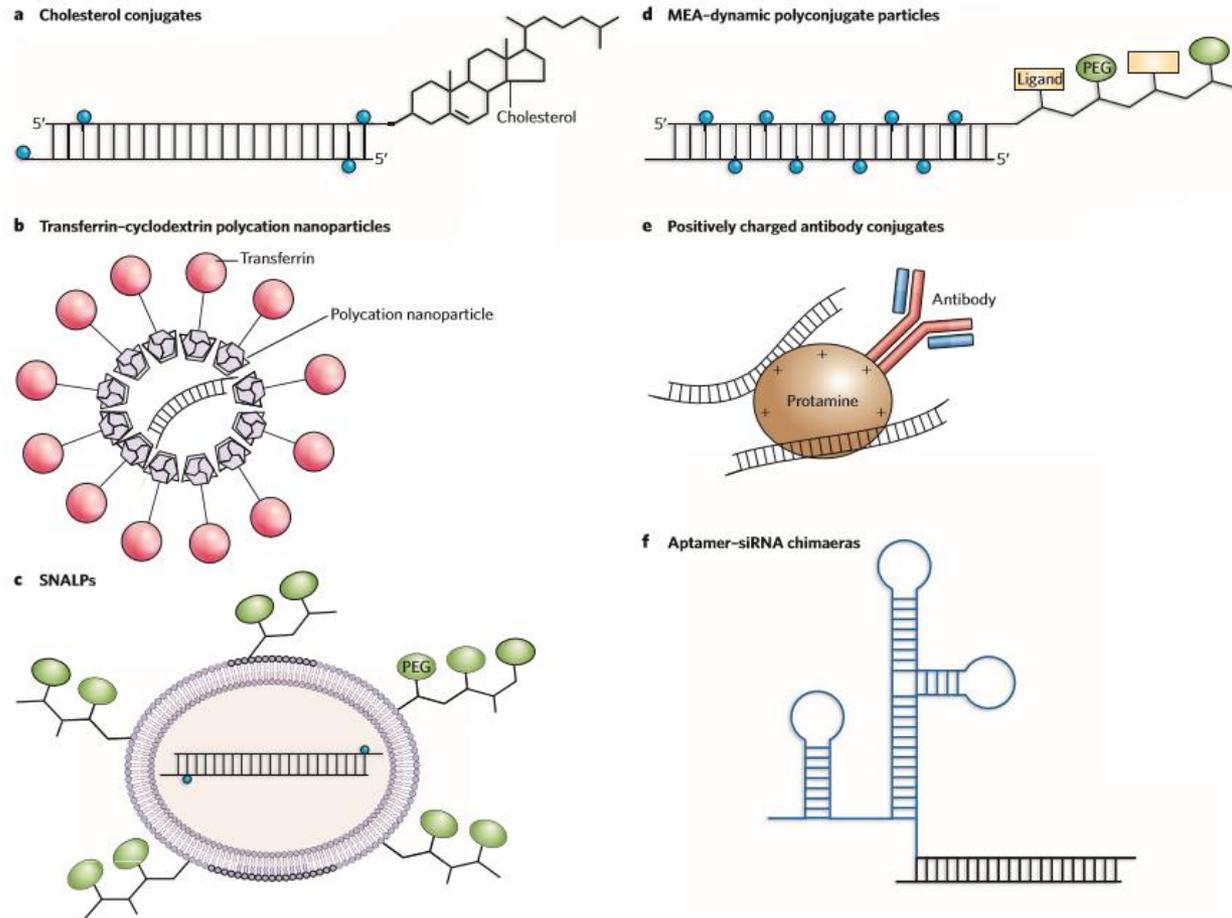
# iRNAs en biología

## Ensayos preclínicos y clínicos para tratamientos en seres humanos



# siRNAs en biología

## Ensayos preclínicos y clínicos para tratamientos en seres humanos

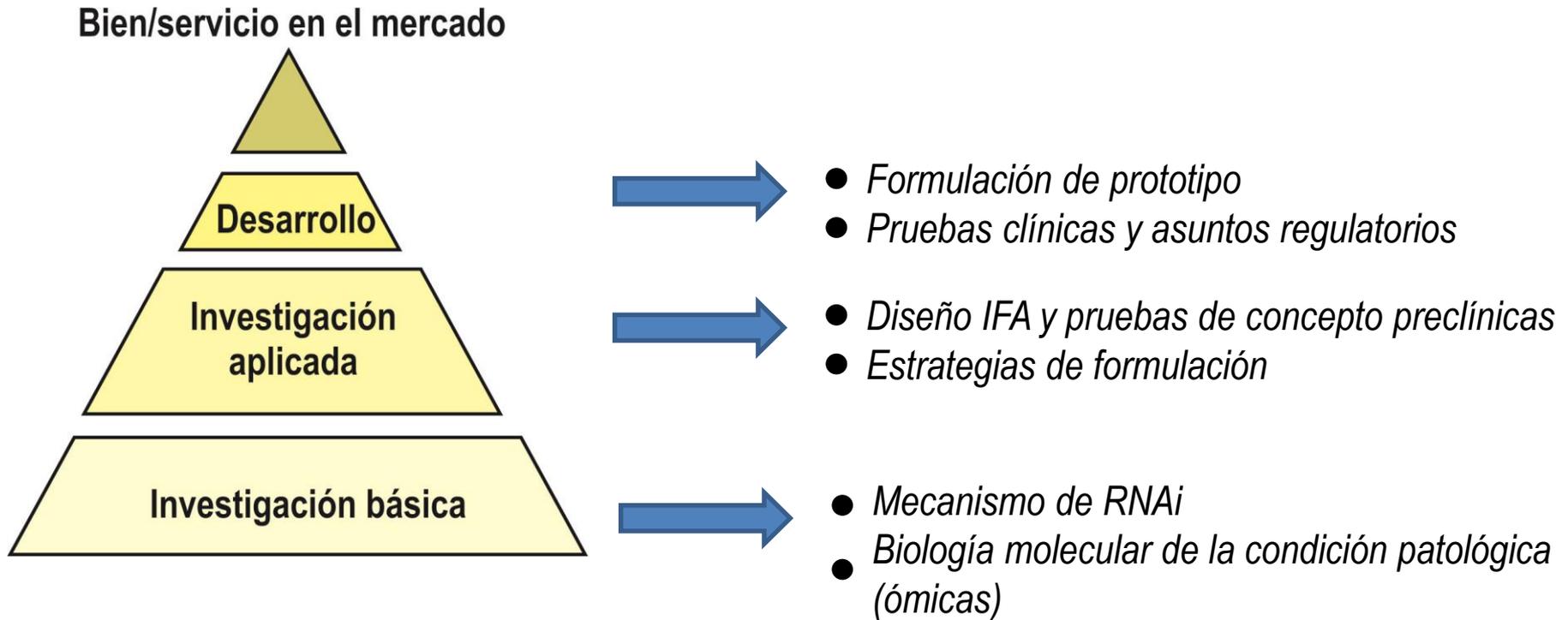


**Figure 2 | In vivo delivery strategies for therapeutic siRNAs.** a, Cholesterol groups can be linked to modified siRNAs to enhance their stability before systemic delivery. The most common siRNA modifications are 2'-O-methyluridine or 2'-fluorouridine substitutions (blue circles) combined with phosphorothioate linkages. b, Polycation nanoparticles can direct delivery of the siRNAs to specific cells through the use of surface ligands (such as transferrin) that bind to receptors on target cells. c, SNALPs encapsulate modified siRNAs into cationic or neutral lipid bilayers coated with diffusible PEG-lipid conjugates. SNALPs allow siRNAs to be taken

up by cells and released by endosomes. d, Masked endosomolytic agent (MEA)-Dynamic PolyConjugates (DPCs) are similar to SNALPs but smaller, and contain a ligand that allows targeted cell delivery. The release of the siRNA from the endosome is also improved by the inclusion of a pH-labile bond in the MEA-DPC particles. e, Tagging specific antibodies with protamine or other positive charges allows the delivery of siRNAs to specific cell types via receptor-mediated uptake. f, Chemically linking or co-transcribing siRNAs with RNA aptamers allows the targeted delivery of the siRNAs to cells expressing the appropriate receptor.

# iRNAs en biología

## Ensayos preclínicos y clínicos para tratamientos en seres humanos



# iRNAs en biología

## Ensayos preclínicos y clínicos para tratamientos en seres humanos

### FARMACOCINÉTICA

Lo que el organismo le hace al fármaco

### FARMADINÁMICA

Lo que el fármaco le hace al organismo



Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en cultivos celulares.

Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en modelo animal.  
Determinación de modos de administración.

# iRNAs en biología

## Ensayos preclínicos y clínicos para tratamientos en seres humanos

### FARMACOCINÉTICA

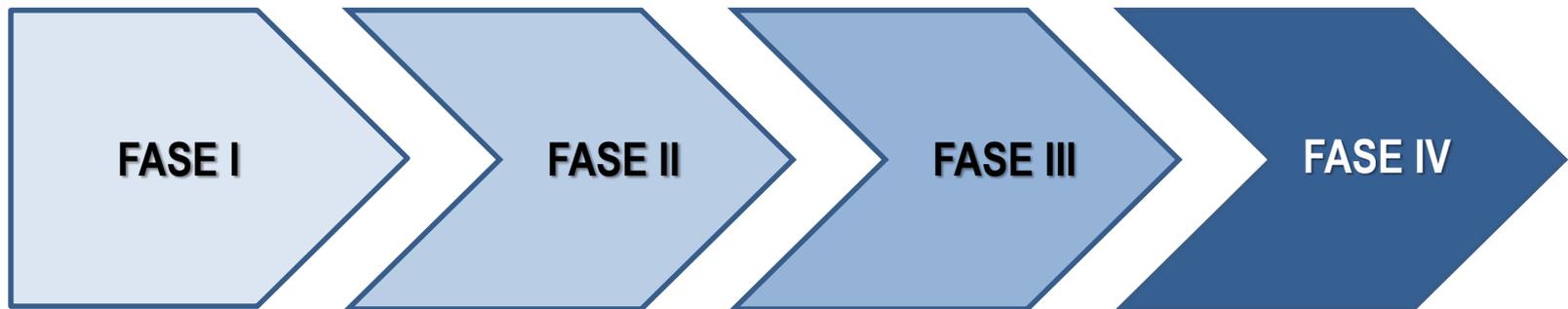
Lo que el organismo le hace al fármaco

### FARMADINÁMICA

Lo que el fármaco le hace al organismo



- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en cultivos celulares.
- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en modelo animal.  
Determinación de modos de administración.
- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en personas.



# iRNAs en biología

## Ensayos preclínicos y clínicos para tratamientos en seres humanos

### FARMACOCINÉTICA

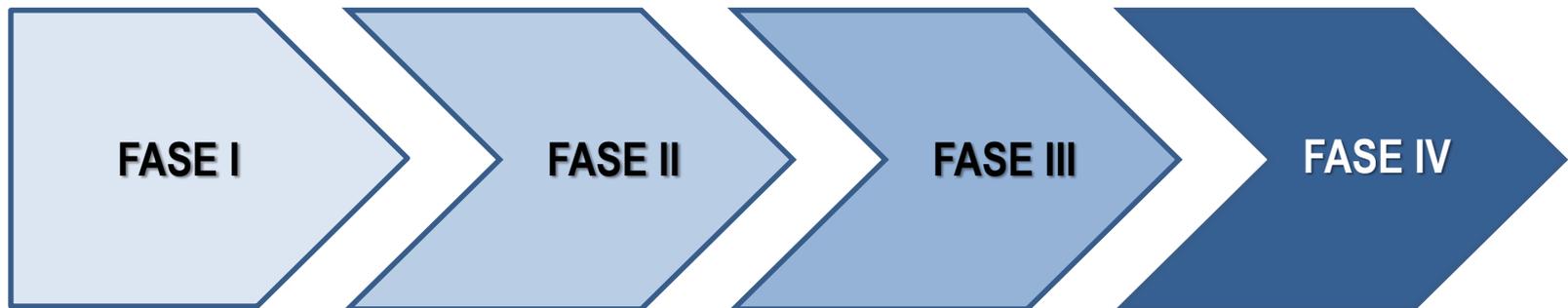
Lo que el organismo le hace al fármaco

### FARMADINÁMICA

Lo que el fármaco le hace al organismo



- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en cultivos celulares.
- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en modelo animal.  
Determinación de modos de administración.
- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en personas.



↓  
*¿Es seguro el tratamiento?*

# iRNAs en biología

## Ensayos preclínicos y clínicos para tratamientos en seres humanos

### FARMACOCINÉTICA

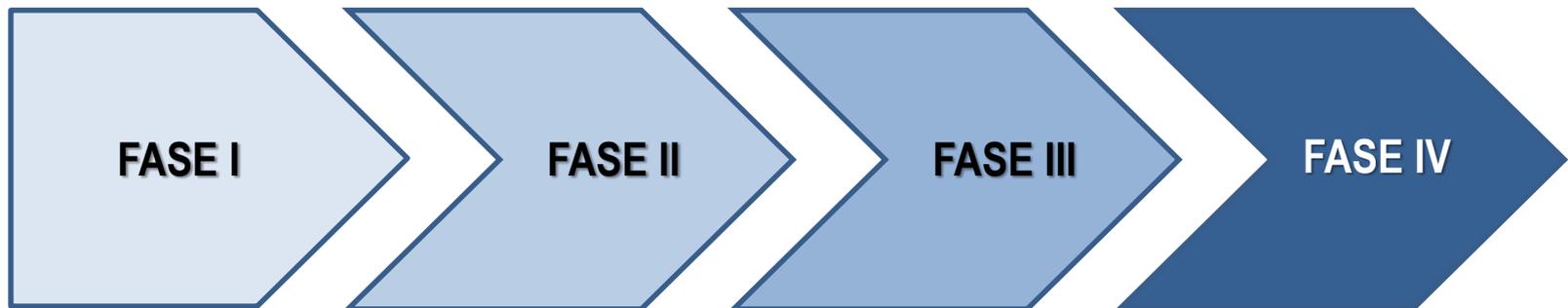
Lo que el organismo le hace al fármaco

### FARMADINÁMICA

Lo que el fármaco le hace al organismo



- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en cultivos celulares.
- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en modelo animal.  
Determinación de modos de administración.
- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en personas.



¿Es eficaz el tratamiento?

# iRNAs en biología

## Ensayos preclínicos y clínicos para tratamientos en seres humanos

### FARMACOCINÉTICA

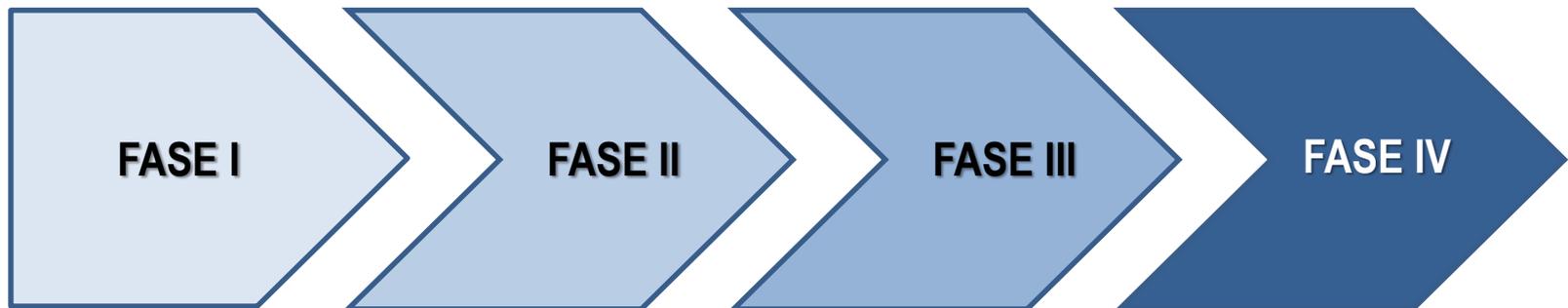
Lo que el organismo le hace al fármaco

### FARMADINÁMICA

Lo que el fármaco le hace al organismo



- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en cultivos celulares.
- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en modelo animal.  
Determinación de modos de administración.
- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en personas.



*¿Es mejor que tratamientos vigentes?*

# iRNAs en biología

## Ensayos preclínicos y clínicos para tratamientos en seres humanos

### FARMACOCINÉTICA

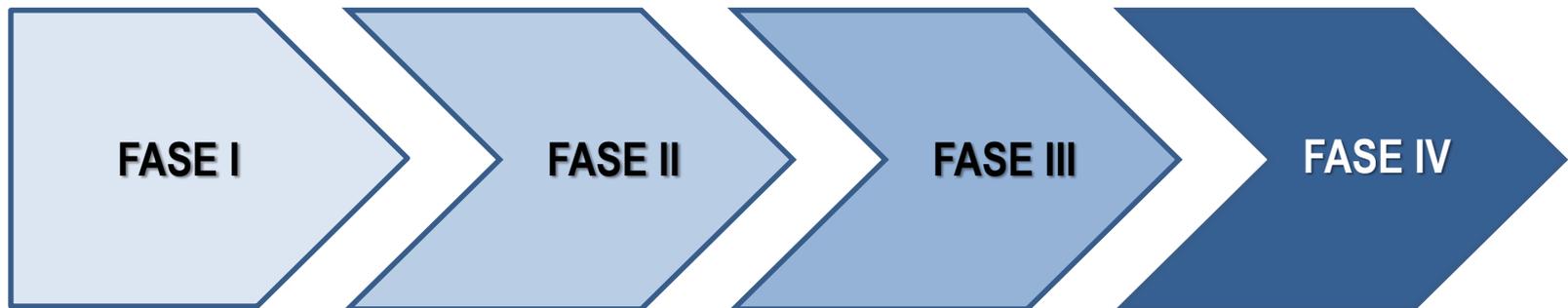
Lo que el organismo le hace al fármaco

### FARMADINÁMICA

Lo que el fármaco le hace al organismo



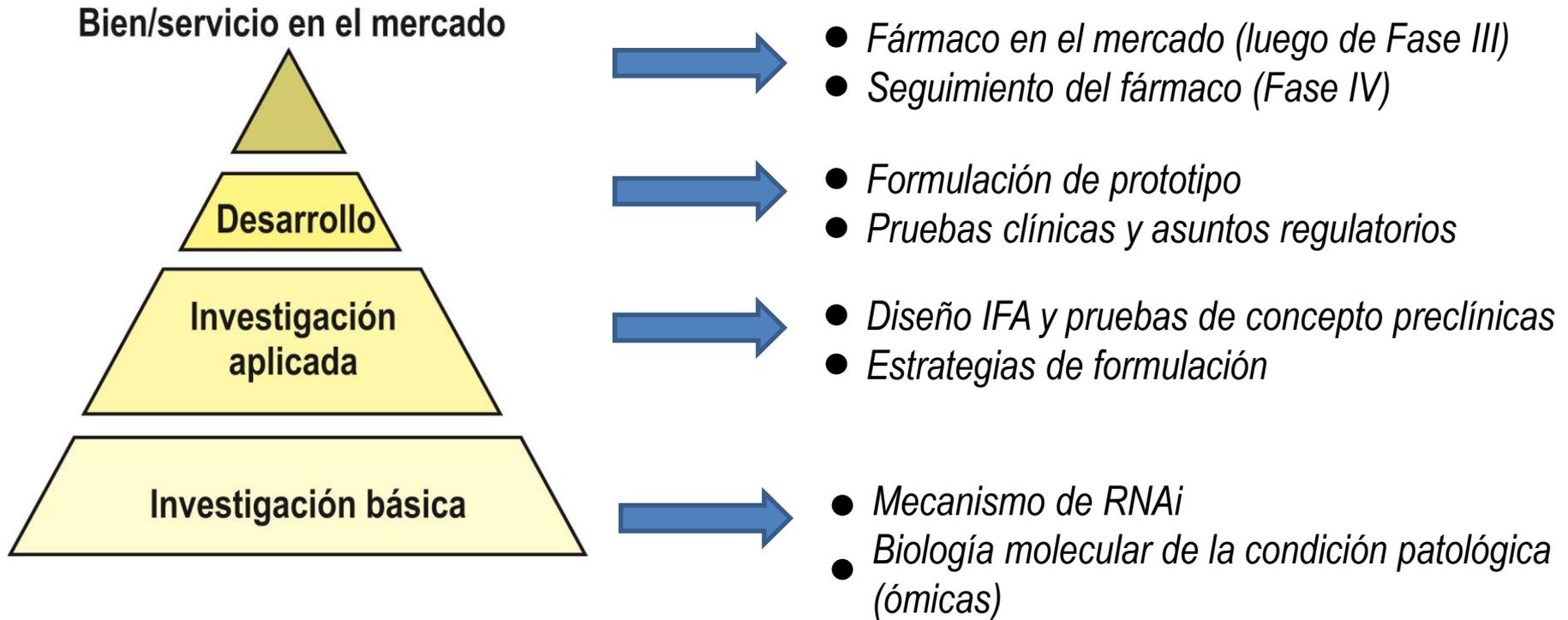
- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en cultivos celulares.
- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en modelo animal.  
Determinación de modos de administración.
- Resultados exitosos de toxicidad y eficacia en personas.



¿Hay efectos secundarios a largo plazo?

# iRNAs en biología

## Ensayos preclínicos y clínicos para tratamientos en seres humanos



# iRNAs en biología

## Delivery de siRNA y construcciones de shRNA

**Table 4** Ongoing clinical trials in cancer and other diseases

Clinical setting	Product	Targeted gene	Location	Disease	Admin	Phase	Stage
<b>Cancer</b>							
1	Proteasome siRNA and tumor antigen RNA-transfected dendritic cells	Immunoproteasome	USA	Melanoma	Vaccination	I	Recruiting
2	SV40	Tyrosine kinase	Israel	CML	–	–	Completed
3	CALAA-01	Ribonucleotide reductase (M2 subunit)	USA	Cancers	IV	I	Recruiting
4	Atu027	An siRNA	Germany	Advanced solid cancer	IV	I	Recruiting
5	TKM-080301	PLK1 gene product	USA	MCRC(liver); MPC(liver); MGC(liver); MBC(liver); MOC(liver)	Intra-arterial	I	Recruiting
6	AHR siRNA	Aromatic hydrocarbon receptor	Taiwan	Neuroblastoma	–	–	Completed
7	siG12D LODER	–	Israel	PD-Adk; PC	–	I	Recruiting
8	B4GALNT	–	Taiwan	Neuroblastoma	–	–	Completed
<b>Others</b>							
1	AGN211745 siRNA027	VEGFR receptor-I	USA	CNV-AMD	IVT	I/II	Completed*
2	AGN 211745; ranibizumab	VEGFR receptor-I	USA	AMD	IVT	II	Terminated
3	td101	Keratins, K6a	USA	Pachyonychia C	Intradermal	I	Completed
4	QPI-1007	Caspase 2	USA	Optic atrophy;	IVT	I	Recruiting

# iRNAs en biología

## Delivery de siRNA y construcciones de shRNA

Clinical setting	Product	Targeted gene	Location	Disease	Admin	Phase	Stage
5	Bevasiranib	VEGF	USA	N-AAION DME	IVT	II	Completed
6	PRO-040201; placebo	–	USA	Hypercholesterolemia	–	I	Terminated
7	–	IL-10	Taiwan	Preeclampsia	–	–	Terminated
8	SYL1001	–	Spain	Ocular pain; dry eye	Topical	I	Recruiting
9	Bevasiranib; ranibizumab	VEGF	–	ARMD	IVT	III	Withdrawn
10	I5NP; placebo	p53	USA	Injury of kidney Ac renal failure	IV	I	Completed
11	I5NP; saline	p53	USA	Delayed graft function; other complication of kidney transplant	IV	I/II	Recruiting
12	SYL040012	β2adrenergic receptor	Spain	Hypertension Glaucoma; ocular	Local	I/II	Recruiting
13	Simvastatine	Keratin (K6a-K17)	Israel	Pachyonychia C	Topical	I	Not yet recruiting
14	TBX3	TBX3	USA	Human ES cell differentiation	–	–	Unknown
15	Bevasiranib	VEGF	USA	MD	IVT	II	Completed
16	PF-04523655; PF-04523655 and ranibizumab; ranibizumab; PF-04523655	–	USA	Choroidal Neovascularite Diabetic retinopathy DME	IVT	II	Not yet recruit

**Abbreviations:** MCRC, metastatic colorectal cancer; MPC, metastatic pancreatic cancer; MGC, metastatic Gastric cancer; MBC, Metastatic Breast cancer; MOC, Metastatic Ovarian Cancer; PD-ADK, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma; PC, Pancreatic Carcinoma; Pachyonychia C, Pachyonychia Congenita; N-AAION, Non-Arteric Anterior Ischemic Optic Neuropathy; DME, Diabetic Macular Edema; ARMD, Age Related Macular Degeneration; MD, Macular Degeneration; CML, Chronic Myeloid Leukemia; AMD-CNV, Age-Related Macular Degeneration- Choroidal Neovascularization; AMD, Age-Related Macular Degeneration; IVT, Intravitreal Therapy.

# iRNAs en biología

## Delivery de siRNA y construcciones de shRNA

Published online: 07 April 2017

Springer

**Table 1** Synthetic RNAi-Based Drugs In Phase 2–3 Clinical Trials

Drug	Target (cell role)	Chemistry / formulation	Route	Disease	Phase	Status/completion	Company/collaborator	Refs
PF-04523655 (PF-655)	RTP801 / (hypoxia-inducible)	Naked siRNA, O-methylated	IVT	AMD, DME	II	Completed/2013	Quark / Pfizer	16, 18
QPI-1002* <sup>1</sup> (ISNP)	p53 (apoptotic)	Naked siRNA, O-methylated	IV	AKI DGF	II III	Recruiting / 2018* <sup>2</sup> Recruiting / 2019* <sup>2</sup>	Quark	40
QPI-1007	CASP2 (apoptotic)	Naked siRNA, O-methylated; changes in sense strand	IVT	NAION Glaucoma	II / III II	Recruiting / 2019* <sup>2</sup> Completed / 2015	Quark	52
TKM-080301 (TKM-PLK1)	PLK1 (kinase)	siRNA / SNALP	IV	Solid tumors, HCC, NET, ACC, lymphoma	I / II	Completed / 2015	Arbutus	59–62
Atu027	PKN3 (kinase)	siRNA / LIPOPLEX	IV	Pancreatic cancer	I / II	Completed / 2016	Silence / Granzer; FGK	67, 70
SYL040012 (Bamosiran)	ADRB2 ( $\beta$ 2 receptor)	Naked siRNA	Eye drops	Ocular hypertension, glaucoma	II	Completed / 2013; 2016	Sylentis	82–85
SYL1001	TRPV1 (nociceptor)	Naked siRNA	Eye drops	Ocular pain in Dry Eye Syndrome	II	Completed / 2016	Sylentis	92, 93
Patisiran (ALN-TTR02)	TTR (amyloidogenic)	siRNA / Lipid particle, ApoE	IV	TTR-mediated Amyloidosis	III	Active / 2017* <sup>2</sup>	Alnylam	99, 101, 103, 104
siG12D-LODER	KRAS (oncogene, GTPase)	siRNA / Miniature PLGA device	Intra-tumoral	Pancreatic cancer* <sup>3</sup>	II	Active, not yet recruiting / 2020* <sup>2</sup>	Silenseed	112
Miravirsen	miR-122 (microRNA)	AntimiR, antisense oligodeoxynucleotide, LNA, PS	SC	Hepatitis C infection	II	Complete / 2011	Santaris	119, 126–128

ACC adrenocortical carcinoma; ADRB2 adrenoceptor beta 2; AKI acute kidney injury after cardiac surgery; AMD Age-Related Macular Degeneration; ApoE apolipoprotein E; CASP2 Caspase 2; DGF Delayed Graft Function in kidney transplantation; DME Diabetic Macular Edema; HCC hepatocellular carcinoma; IV intravenous injection; IVT intravitreal injection; KRAS Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; LNA locked nucleic acid; miR-122 microRNA 122; NAION Acute Non-Arteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy; NET neuroendocrine tumors; PKN3 protein kinase N3; PLK1 Polo-like kinase-1; PS phosphorothioated; SC subcutaneous injection; SNALP stable-nucleic-acid-lipid particles; TRPV1 transient receptor potential vanilloid 1; TTR transthyretin. \*1- drug licensed to Novartis; \*2- estimated completion data; \*3- siG12D-LODERs combined with chemotherapy treatment (Gemcitabine + nab-Paclitaxel). Company names: Quark Pharmaceuticals; Pfizer; Arbutus Biopharma Corporation; Silence Therapeutics GmbH; Granzer Regulatory Consulting and Services; FGK Clinical Research GmbH; Sylentis, S.A.; Alnylam Pharmaceuticals; Silenseed Ltd.; Santaris Pharma A/S

Pharm Res  
DOI 10.1007/s11095-017-2134-2



EXPERT REVIEW

## The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market

Ricardo Titze-de-Almeida<sup>1</sup> • Catherine David<sup>2</sup> • Simoneide Souza Titze-de-Almeida<sup>1</sup>

# iRNAs en biología

## Delivery de siRNA y construcciones de shRNA

Published online: 07 April 2017

Springer

**Table 1** Synthetic RNAi-Based Drugs In Phase 2–3 Clinical Trials

Drug	Target (cell role)	Chemistry / formulation	Route	Disease	Phase	Status/completion	Company/collaborator	Refs
PF-04523655 (PF-655)	RTP801 / (hypoxia-inducible)	Naked siRNA, O-methylated	IVT	AMD, DME	II	Completed/2013	Quark / Pfizer	16, 18
QPI-1002* <sup>1</sup> (ISNP)	p53 (apoptotic)	Naked siRNA, O-methylated	IV	AKI DGF	II III	Recruiting / 2018* <sup>2</sup> Recruiting / 2019* <sup>2</sup>	Quark	40
QPI-1007	CASP2 (apoptotic)	Naked siRNA, O-methylated; changes in sense strand	IVT	NAION Glaucoma	II / III II	Recruiting / 2019* <sup>2</sup> Completed / 2015	Quark	52
TKM-080301 (TKM-PLK1)	PLK1 (kinase)	siRNA / SNALP	IV	Solid tumors, HCC, NET, ACC, lymphoma	I / II	Completed / 2015	Arbutus	59–62
Atu027	PKN3 (kinase)	siRNA / LIPOPLEX	IV	Pancreatic cancer	I / II	Completed / 2016	Silence / Granzer; FGK	67, 70
SYL040012 (Bamosiran)	ADRB2 ( $\beta$ 2 receptor)	Naked siRNA	Eye drops	Ocular hypertension, glaucoma	II	Completed / 2013; 2016	Sylentis	82–85
SYL1001	TRPV1 (nociceptor)	Naked siRNA	Eye drops	Ocular pain in Dry Eye Syndrome	II	Completed / 2016	Sylentis	92, 93
Patisiran (ALN-TTR02)	TTR (amyloidogenic)	siRNA / Lipid particle, ApoE	IV	TTR-mediated Amyloidosis	III	Active / 2017* <sup>2</sup>	Alnylam	99, 101, 103, 104
siGI2D-LODER	KRAS (oncogene, GTPase)	siRNA / Miniature PLGA device	Intra-tumoral	Pancreatic cancer* <sup>3</sup>	II	Active, not yet recruiting / 2020* <sup>2</sup>	Silenseed	112
Miravirsen	miR-122 (microRNA)	AntimiR, antisense oligodeoxynucleotide, LNA, PS	SC	Hepatitis C infection	II	Complete / 2011	Santaris	119, 126–128

ACC adrenocortical carcinoma; ADRB2 adrenoceptor beta 2; AKI acute kidney injury after cardiac surgery; AMD Age-Related Macular Degeneration; ApoE apolipoprotein E; CASP2 Caspase 2; DGF Delayed Graft Function in kidney transplantation; DME Diabetic Macular Edema; HCC hepatocellular carcinoma; IV intravenous injection; IVT intravitreal injection; KRAS Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; LNA locked nucleic acid; miR-122 microRNA 122; NAION Acute Non-Arteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy; NET neuroendocrine tumors; PKN3 protein kinase N3; PLK1 Polo-like kinase-1; PS phosphorothioated; SC subcutaneous injection; SNALP stable-nucleic-acid-lipid particles; TRPV1 transient receptor potential vanilloid 1; TTR transthyretin. \*1- drug licensed to Novartis; \*2- estimated completion data; \*3- siGI2D-LODERs combined with chemotherapy treatment (Gemcitabine + nab-Paclitaxel). Company names: Quark Pharmaceuticals; Pfizer; Arbutus Biopharma Corporation; Silence Therapeutics GmbH; Granzer Regulatory Consulting and Services; FGK Clinical Research GmbH; Sylentis, S.A.; Alnylam Pharmaceuticals; Silenseed Ltd.; Santaris Pharma A/S

Pharm Res  
DOI 10.1007/s11095-017-2134-2



EXPERT REVIEW

## The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market

Ricardo Titze-de-Almeida<sup>1</sup> • Catherine David<sup>2</sup> • Simoneide Souza Titze-de-Almeida<sup>1</sup>

# iRNAs en biología

## Primer terapia aprobada por FDA de RNAi (siRNA)

### Biologics Blog

[HOME](#)[SUBSCRIBE](#)

#### SEARCH BLOG

#### CATEGORIES

- 101
- AIA
- Biobetters
- Biosimilars
- Biotechnology
- BPCIA
- EMA
- FDA
- Gene Therapy
- Interchangeables
- IPR
- Labeling

## FDA Approves First-Ever siRNA Therapy

NICOLE A. CONLON | IRENA ROYZMAN  
AUGUST 10, 2018

SHARE THIS PAGE: [✉](#) [in](#) [t](#) [f](#)

Today FDA **approved** the first-ever “small interfering RNA” (siRNA) product, marking a significant milestone in the story of RNA interference (RNAi) technology and clearing the way for a new type of therapeutic. Alnylam® secured approval and Orphan Drug Designation for its siRNA product Onpattro (patisiran), a therapy for the rare hereditary disease transthyretin-mediated amyloidosis in adult patients. The disease is caused by mutations in a protein called “transthyretin” which leads to symptoms of neuropathic pain, loss of sensation in the hands and feet, and wheel-chair confinement. In Alnylam’s Phase III clinical trial, Onpattro improved multiple clinical manifestations of the disease and demonstrated safe administration of a siRNA product.

The approval comes after over a decade of pursuing RNAi as a therapy. A series of big pharma exits from the RNAi space suggested that the technical hurdles associated with bringing a therapeutic siRNA

# iRNAs en biología

Primer terapia aprobada por FDA de RNAi (siRNA)

## FULL PRESCRIBING INFORMATION

### 1 INDICATIONS AND USAGE

ONPATTRO is indicated for the treatment of the polyneuropathy of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis in adults.



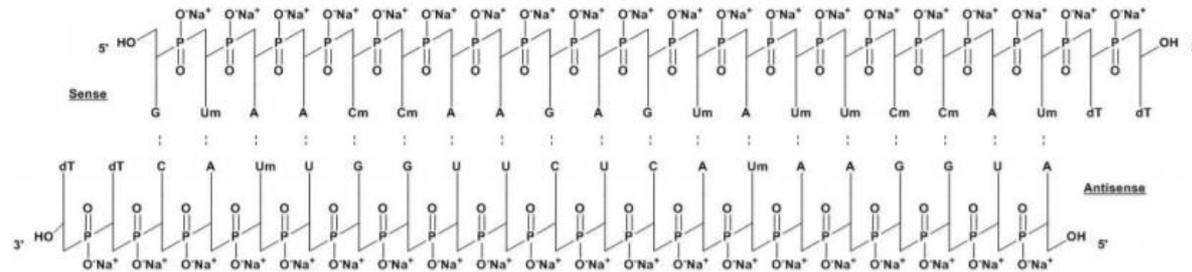
# iRNAs en biología

## Primer terapia aprobada por FDA de RNAi (siRNA)

### 11 DESCRIPTION

ONPATTRO contains patisiran, a double-stranded small interfering ribonucleic acid (siRNA), formulated as a lipid complex for delivery to hepatocytes. Patisiran specifically binds to a genetically conserved sequence in the 3' untranslated region (3'UTR) of mutant and wild-type transthyretin (TTR) messenger RNA (mRNA).

The structural formula is:



A, adenosine; C, cytidine; G, guanosine; U, uridine; Cm, 2'-*O*-methylcytidine; Um, 2'-*O*-methyluridine; dT, thymidine

ONPATTRO is supplied as a sterile, preservative-free, white to off-white, opalescent, homogeneous solution for intravenous infusion in a single-dose glass vial. Each 1 mL of solution contains 2 mg of patisiran (equivalent to 2.1 mg of patisiran sodium). Each 1 mL also contains 6.2 mg cholesterol USP, 13.0 mg (6*Z*,9*Z*,28*Z*,31*Z*)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino) butanoate (DLin-MC3-DMA), 3.3 mg 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC), 1.6 mg  $\alpha$ -(3'-[[1,2-di(myristyloxy)propanoxy] carbonylamino]propyl)- $\omega$ -methoxy, polyoxyethylene (PEG<sub>2000</sub>-C-DMG), 0.2 mg potassium phosphate monobasic anhydrous NF, 8.8 mg sodium chloride USP, 2.3 mg sodium phosphate dibasic heptahydrate USP, and Water for Injection USP. The pH is ~7.0.

The molecular formula of patisiran sodium is C<sub>412</sub> H<sub>480</sub> N<sub>148</sub> Na<sub>40</sub> O<sub>290</sub> P<sub>40</sub> and the molecular weight is 14304 Da.

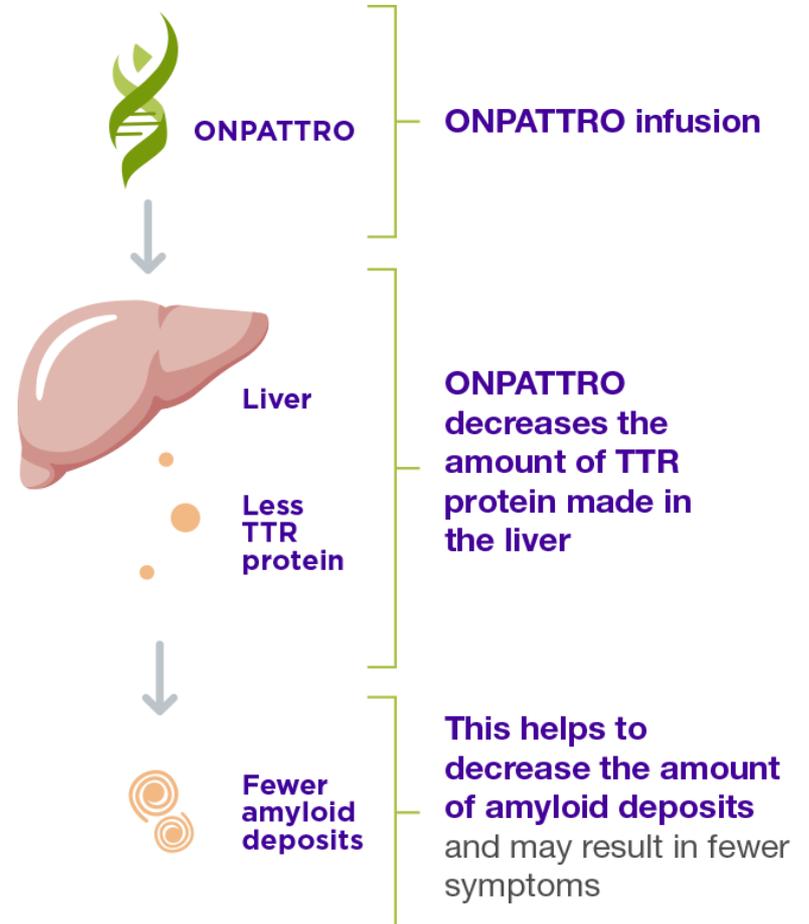
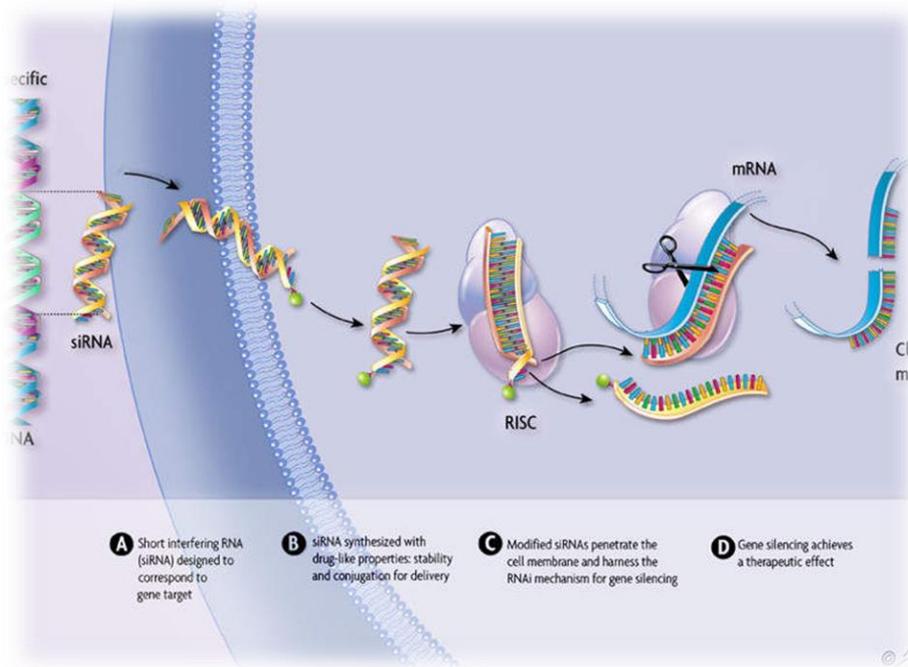
### 12 CLINICAL PHARMACOLOGY

#### 12.1 Mechanism of Action

Patisiran is a double-stranded siRNA that causes degradation of mutant and wild-type TTR mRNA through RNA interference, which results in a reduction of serum TTR protein and TTR protein deposits in tissues.

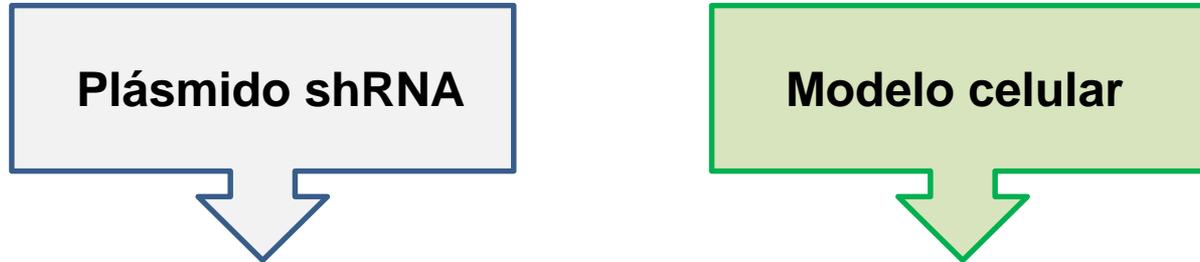
# siRNAs en biología

## Primer terapia aprobada por FDA de RNAi (siRNA)



# iRNAs en biología

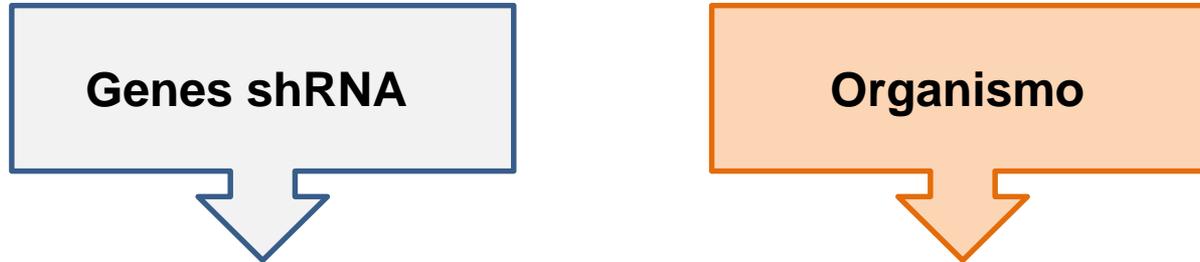
## Delivery de siRNA y construcciones de shRNA



- El **procedimiento clásico** es la **transfección** (lipofección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio).
- En este diseño experimental, es importante **contar con un control negativo de shRNA**.
- También es importante **poner a punto la transfección** con un **plásmido control** que **expresa una proteína indicadora**.
- El **análisis** de la eficiencia del silenciamiento debe realizarse mediante ***Northern Blot***, **RT-qPCR** y/o ***Western Blot***.

# iRNAs en biología

## Delivery de siRNA y construcciones de shRNA



- El uso de **genes que expresen shRNA** en **organismos** requiere de la **vehiculización** mediante **sistemas virales o no virales**.
- Los **sistemas no virales** son **similares** a los empleados para los **siRNAs sintéticos**.
- Los **sistemas virales** implican **incorporar el gen en el genoma de un virus**, el cual en función de su tropismo transportará dicha secuencia terapéutica a la célula diana.
- Los **virus** más utilizados fueron **retrovirus, adenovirus, adeno-asociados, herpes virus**.

# iRNAs en biología

## Delivery de siRNA y construcciones de shRNA



Los analizaremos en la unidad de **“Terapia génica”**

# ¿Cuáles son los desarrollos de RNAi en biotecnología agrícola?



# iRNAs en plantas e invertebrados

- En **muchas especies** de **plantas e invertebrados**, se **asocian** al mecanismo de **interferencia del RNA...**
  - ...**actividad de amplificación del dsRNA** por actividad RNA polimerasa RNA dependiente (RdRP), y
  - ...**movilidad de dsRNA entre células.**

# iRNAs en plantas e invertebrados

- En **muchas especies** de **plantas e invertebrados**, se **asocian** al mecanismo de **interferencia del RNA...**
  - ...**actividad de amplificación del dsRNA** por actividad RNA polimerasa RNA dependiente (RdRP), y
  - ...**movilidad de dsRNA entre células.**

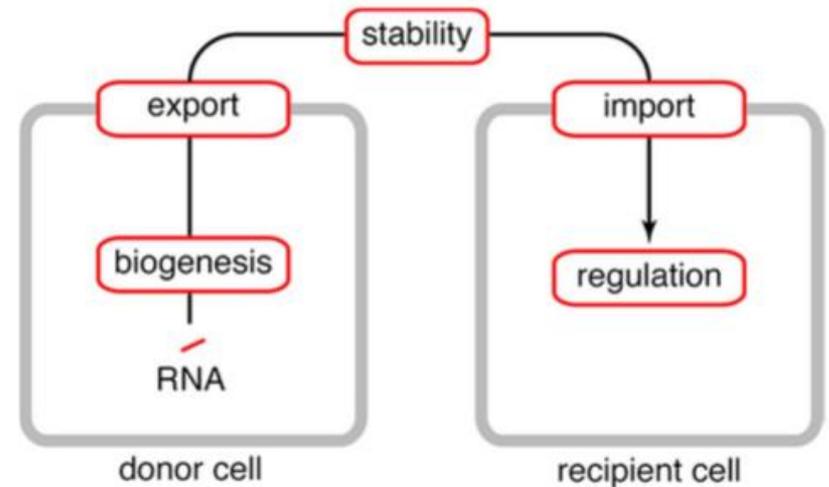
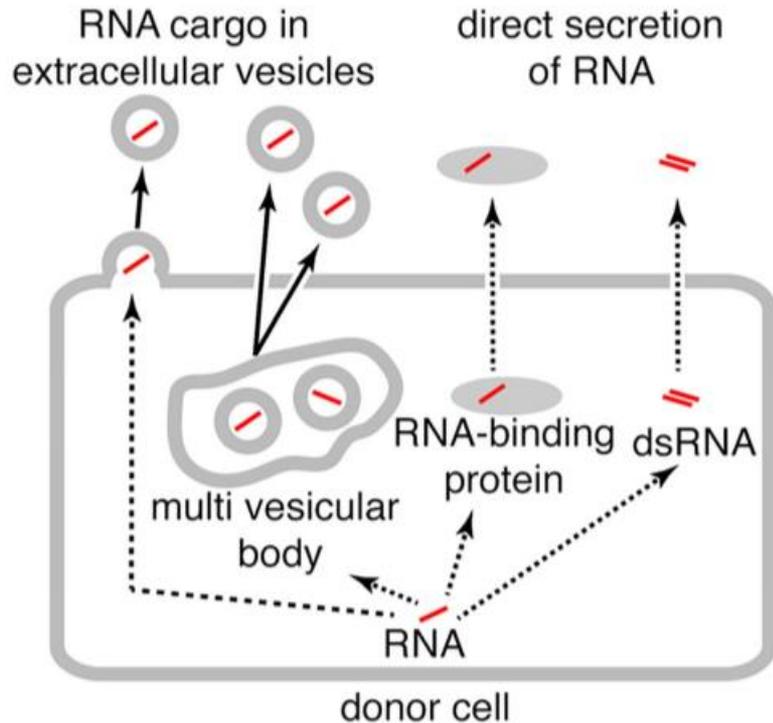


Estrategias de control de invertebrados, método: *RNAi feeding*

Estrategias de control de virus en plantas, por *aplicación tópica de dsRNA*

# iRNAs en plantas e invertebrados

## Control de poblaciones de invertebrados plaga



Published in final edited form as:

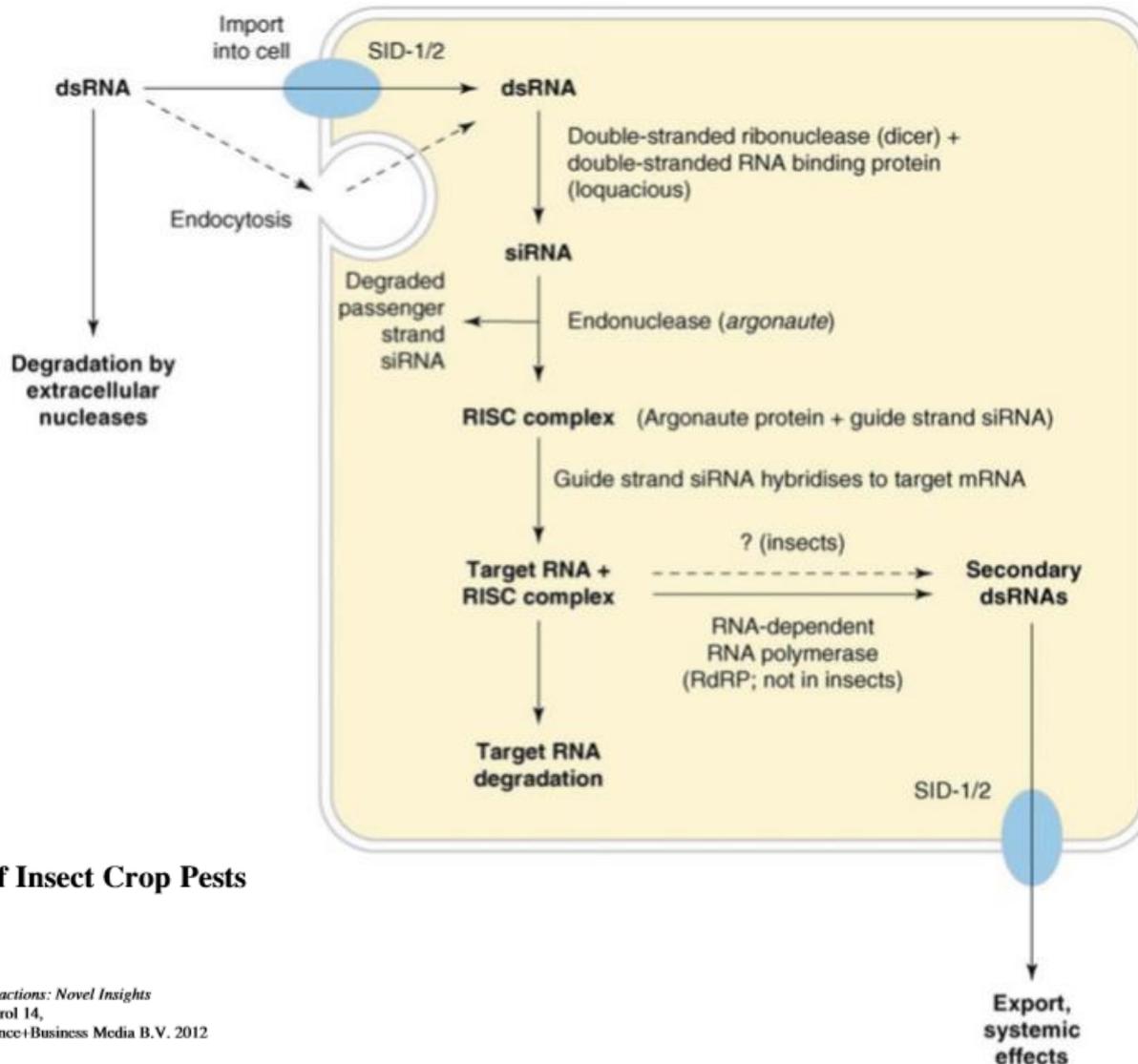
*Genesis*. 2015 July ; 53(7): 395–416. doi:10.1002/dvg.22871.

## Movement of regulatory RNA between animal cells

Antony M. Jose

# iRNAs en plantas e invertebrados

## Control de poblaciones de invertebrados plaga



### Chapter 7 Use of RNAi for Control of Insect Crop Pests

Luc Swevers and Guy Smaghe

# iRNAs en plantas e invertebrados

## Control de poblaciones de invertebrados plaga

Management of Insect Pest by RNAi — A New Tool for Crop Protection  
<http://dx.doi.org/10.5772/61807>

Specie	Order	Crop	Target Gene	Remarks	Reference
<i>Diabrotica v. virgifera</i>	Coleoptera	<i>Zea mays</i>	<i>vATPase</i>	Mortality	[67]
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Coleoptera	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>β-actin, Shrub</i>	Mortality	[68]
<i>Helicoverpa armigera</i> <i>Spodoptera exigua</i>	Lepidoptera	<i>Nicotiana tabacum</i>	Nuclear receptor complex of 20-hydroxyecdysone ( <i>HaEcR</i> )	Molting defect and larval lethality	[45]
<i>Helicoverpa armigera</i>	Lepidoptera	<i>Nicotiana tabacum</i>	Molt-regulating transcription factor gene ( <i>HR3</i> )	Developmental deformities and larval lethality	[70]
<i>Helicoverpa armigera</i>	Lepidoptera	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>HaAK</i>	Developmental Deformities and larval lethality	[71]
<i>Myzus persicae</i>	Hemiptera	<i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>MpC001, Rack1</i>	Progeny reduced	[72]
<i>Myzus persicae</i>	Hemiptera	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>serine protease</i>	Progeny reduced	[73]
<i>Myzus persicae</i>	Hemiptera	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>hunchback(hb)</i>	Inhibited reproduction	[74]
<i>Bemisia tabaci</i>	Hemiptera	<i>Nicotiana rustica</i>	<i>vATPase</i>	Mortality	[75]

Blancos de acción

**Table 1.** Overview of the recently published studies on the use of plant-RNAi against different insect pests

# iRNAs en plantas e invertebrados

## Control de poblaciones de invertebrados plaga

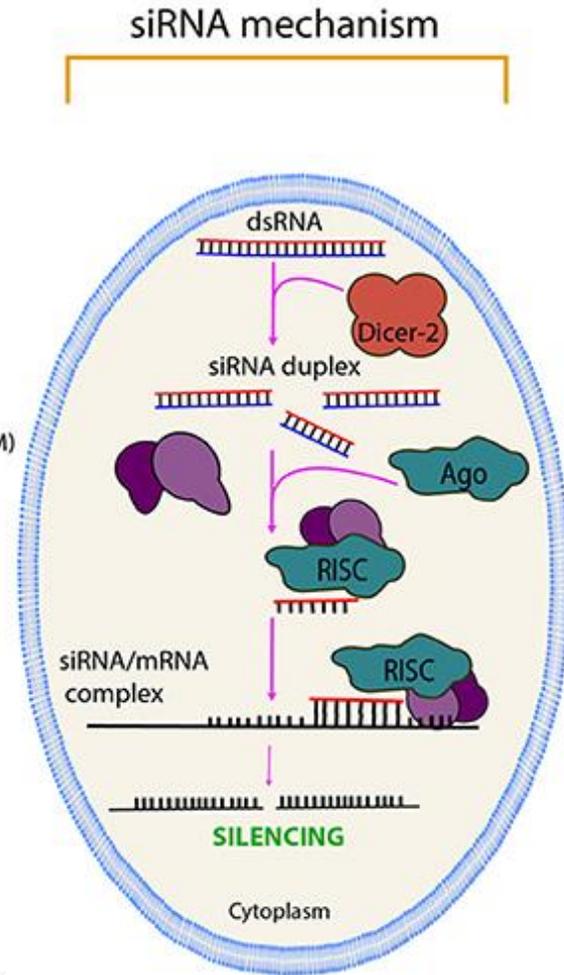
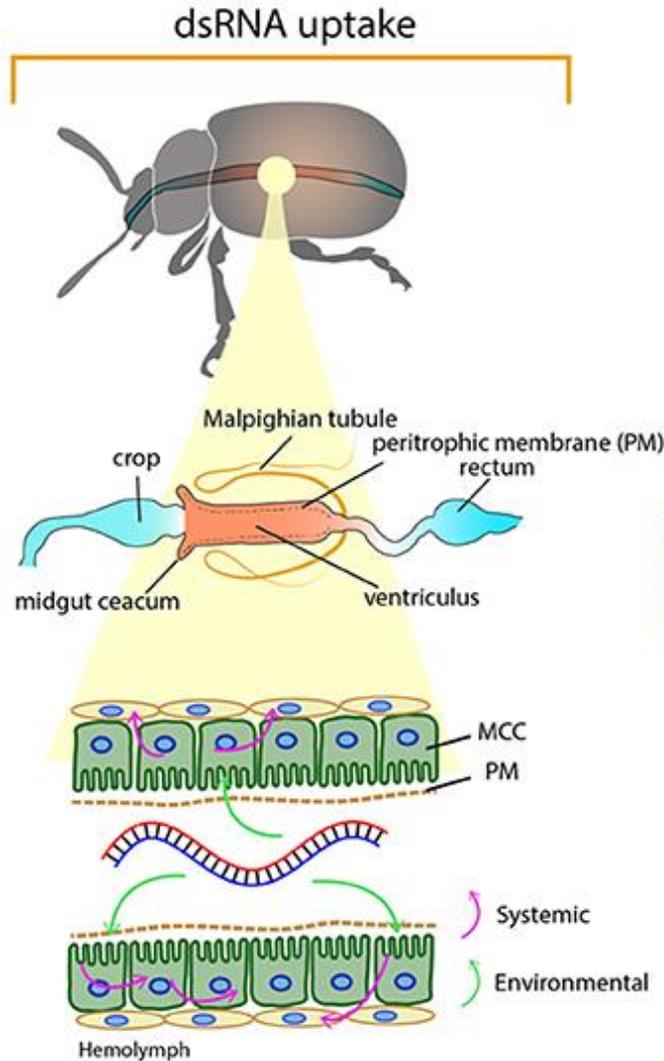
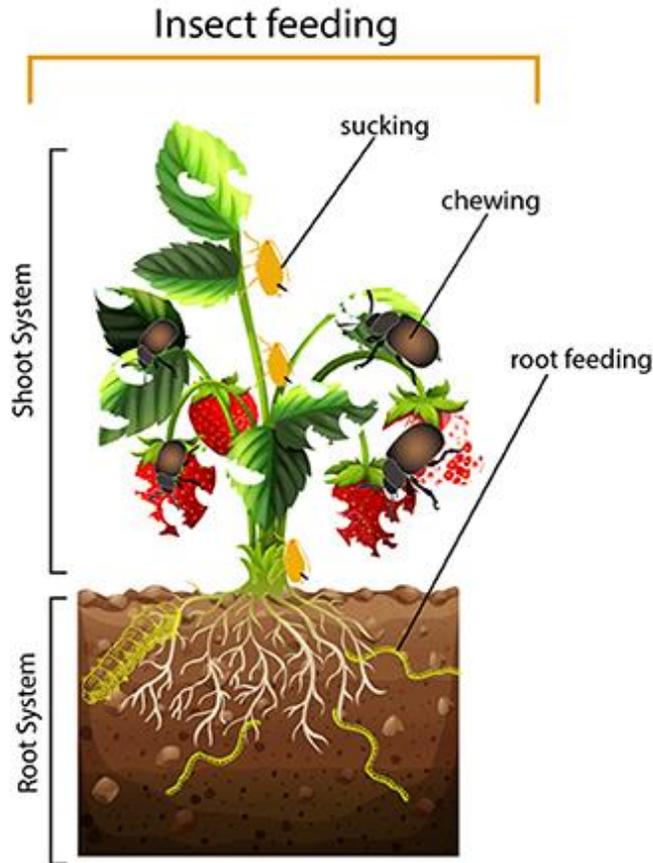


Ingredientes  
activos

- **Diseño de dsRNA con secuencia de los genes diana.**
- Los **dsRNA** se generan **sintéticos**, o se producen en **bacterias**.  
  
Para ello, se necesitan **construcciones genéticas**
- adecuadas y cepas de *Escherichia coli* deficientes en RNAsa III (por ej. HT115).
- Los **extractos de dsRNA** deben **formularse** para su uso en **condiciones de campo**.

# iRNAs en plantas e invertebrados

## Control de poblaciones de invertebrados plaga



**Transformative** or non-transformative  
RNAi-mediated plant protection ?

# iRNAs en plantas e invertebrados

## Control de virus en plantas

- **Diseño de dsRNA con secuencia de los genes diana.**
- Los **dsRNA** se generan **sintéticos**, o se producen en **bacterias**.  
Para ello, se necesitan **construcciones genéticas**
- adecuadas y cepas de *Escherichia coli* deficientes en RNAsa III (por ej. HT115).
- Los **extractos de dsRNA** deben **formularse** para su uso en **condiciones de campo**.

**Ingredientes  
Activos** para  
*virus de  
plantas*

# iRNAs en plantas e invertebrados

## Control de virus en plantas

**BMC Biotechnology**



Research article

**Open Access**

### **Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections**

Francisco Tenllado, Belén Martínez-García, Marisol Vargas and José Ramón Díaz-Ruíz\*

Address: Departamento de Biología de Plantas, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez 144, Madrid 28006, Spain

Email: Francisco Tenllado - [tenllado@cib.csic.es](mailto:tenllado@cib.csic.es); Belén Martínez-García - [cibmg78@cib.csic.es](mailto:cibmg78@cib.csic.es); Marisol Vargas - [mvargas@cib.csic.es](mailto:mvargas@cib.csic.es); José Ramón Díaz-Ruíz\* - [jrdiazruiz@cib.csic.es](mailto:jrdiazruiz@cib.csic.es)

\* Corresponding author

Published: 20 March 2003

Received: 10 January 2003

*BMC Biotechnology* 2003, 3:3

Accepted: 20 March 2003

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/3/3>

© 2003 Tenllado et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article: verbatim copying and redistribution of this article are permitted in all media for any purpose, provided this notice is preserved along with the article's original URL.