

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**Acido ribonucleico (RNA) e terapia: potenzialità, sfide e applicazioni nel
trattamento del cancro.**

RELATORE: Chiar.ma prof.ssa Lisa Dalla Via

LAUREANDO: Daniele Valentini

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

Indice

Introduzione.....	3
1. Terapie a base di RNA e loro meccanismo d'azione.....	5
1.1. Oligonucleotidi antisenso (ASO).....	5
1.2. Small interference RNA (siRNA).....	6
1.3. Aptameri.....	6
1.4. Vaccini a base di mRNA.....	6
1.5. miRNA.....	7
1.5.1. miRNA come biomarcatori.....	7
1.5.2. miRNA come agenti terapeutici.....	8
1.6. CRISPR-Cas-9.....	10
1.7. circular RNA (circRNA).....	12
2. Modificazioni chimiche dell'RNA.....	15
2.1. Modificazioni chimiche degli ASOs e dei siRNA.....	15
2.2. Modificazioni chimiche dei vaccini a mRNA.....	16
2.3. Modificazioni chimiche degli aptameri.....	17
2.4. Alternative all'uso di mRNA convenzionali.....	18
2.5. Modificazioni chimiche del sgRNA del sistema CRISPR-Cas-9.....	19
2.6. Modificazioni chimiche e sintesi dei circRNA.....	19
3. Sfide delle terapie a base di RNA e potenziali soluzioni.....	21
3.1. Immunogenicità.....	21
3.1.1. Screening delle reazioni avverse immuno-mediate.....	22
3.1.2. Utilizzo di "tiny" RNA antisenso.....	22
3.1.3. Applicazione della terapia a RNA metronomica.....	22
3.1.4. Terapia di combinazione con RNA.....	22
3.1.5. Uso di Small-Molecule Inhibitors of miRNA (SMIRs).....	23
3.1.6. Targeting dei ncRNA utilizzando inibitori degli elementi bloccanti e degli elementi strutturali.....	24
4. Sistemi di drug-delivery per la terapia a base di RNA.....	25
4.1. Targeting passivo.....	26
4.1.1. Nanoparticelle lipidiche (LNPs).....	26
4.1.1.1. Lipidi cationici ionizzabili.....	27
4.1.1.2. Fosfolipidi e colesterolo.....	28
4.1.1.3. PEG-lipidi.....	29
4.1.1.4. Meccanismo d'azione delle LNPs.....	29
4.1.1.5. Limiti della tecnologia delle LNPs.....	29
4.1.2. Polimeri e nanoparticelle polimeriche.....	29
4.1.3. Coniugazione con lipidi.....	31

4.1.4. Delivery con Bacterial Mini Cells.....	31
4.1.5. Coniugazione con peptidi.....	31
4.2. Targeting attivo.....	31
4.2.1 Coniugazione con N-acetilgalattosammina (GalNAc).....	31
4.2.2. Coniugati oligonucleotide-anticorpo monoclonale (AOCs).....	32
4.2.2.1 Coniugazione con interazioni ioniche.....	33
4.2.2.2. Coniugazione per affinità.....	35
4.2.2.3 Coniugazione diretta.....	35
4.2.3. Delivery per coniugazione con un aptamero.....	36
4.2.4. LNPs coniugate con mAb.....	36
5. Nuove strategie di delivery.....	37
5.1. Esosomi.....	37
5.2 Acidi nucleici sferici (SNAs).....	37
5.3 Nanostrutture di DNA.....	38
6. Terapie a base di RNA nel cancro.....	39
6.1. Vaccini antitumorali a RNA.....	39
6.1.1. Vaccini a base di TAA.....	40
6.1.2. Vaccini a base di TSA.....	41
6.2. mRNA codificanti per citochine.....	42
6.3. mRNA codificanti per soppressori tumorali.....	42
6.4. mRNA codificanti per anticorpi.....	43
6.5. mRNA codificanti Cas9 per l'editing genetico.....	44
6.6 siRNA in sperimentazione clinica per il trattamento del cancro.....	45
6.7 miRNA in sperimentazione clinica nel trattamento del cancro.....	48
6.8. circRNA come potenziali target e agenti terapeutici nel cancro.....	50
Conclusioni.....	52
Bibliografia.....	54

Introduzione.

Un numero rilevante di malattie umane è influenzato da fattori genetici; i farmaci tradizionali combattono la patologia modulando generalmente le vie a valle del gene che causa la malattia. Una strategia terapeutica più accurata ed efficace che si sta affermando consiste nel modificare il prodotto genico difettoso, tale strategia prende il nome di terapia genica.

Le terapie geniche basate sul DNA rappresentano un campo di ricerca attivo e attualmente sono stati approvati diversi farmaci a base di DNA. Tuttavia, molte aziende biofarmaceutiche si stanno concentrando anche su un altro acido nucleico, caratterizzato da un maggiore potenziale terapeutico: l'RNA, sviluppando terapie in grado di regolare in modo specifico i geni che causano la patologia. Comparata con la terapia genica a base di DNA, la terapia a base di RNA ha alcuni vantaggi: è efficace anche nelle cellule in senescenza, le molecole usate hanno un tasso di penetrazione più elevato nelle cellule bersaglio e non si integrano nel genoma annullando, quindi, il potenziale rischio di mutazioni.

La maggior parte di questi prodotti sono acidi nucleici di origine sintetica costituiti da sequenze di RNA non-codificanti (ncRNA).

I ncRNA sono generati da una grande parte del genoma che non codifica per le proteine, ma produce dei trascritti che regolano l'espressione genica e la funzione delle proteine. Le due principali classi di ncRNA identificate finora, sono: i microRNA (miRNA) e i long ncRNA (lcnRNA).

La comprensione dei meccanismi di regolazione basati sui ncRNA ha creato interessanti opportunità per lo sviluppo di terapie che sfruttano il meccanismo di regolazione genica endogeno e che possono direttamente mirare sia ai mRNA che agli RNA non codificanti (ncRNA) attraverso l'accoppiamento tra le basi secondo Watson-Crick. (Crook, S.T. 2018)

Molti ncRNA sono espressi in modo differenziato negli stati patologici e si pensa che contribuiscano allo sviluppo e alla progressione delle malattie. Pertanto, rappresentano un grande potenziale come marcatori diagnostici, bersagli terapeutici o farmaci. (Harries, L.W. 2019) Infatti, selezionando la corretta sequenza nucleotidica, un RNA può, teoricamente, colpire qualsiasi gene di interesse.

Lo sviluppo delle terapie a base di RNA trova il suo inizio nel 1978 con la proposta del meccanismo con cui gli oligonucleotidi antisenso (ASO) riescono a modulare l'espressione genica. La ricerca ha continuato nello sviluppo della tecnologia dell'RNA fino a quando, all'inizio degli anni '90 sono stati scoperti piccoli frammenti di RNA in grado di legarsi alle proteine, chiamati aptameri. Alla fine dello stesso decennio si ha l'approvazione in terapia del primo ASO: Fomivirsen. Contestualmente, si ha anche la scoperta del fenomeno del RNA interferenza (RNAi). Agli inizi degli anni 2000 si identificano i miRNA e si testano *in vitro* i primi siRNA, fino ad arrivare nel 2018 all'approvazione di Patisiran, il primo farmaco che sfrutta l'RNAi come meccanismo di regolazione genica. (Fig. 1)

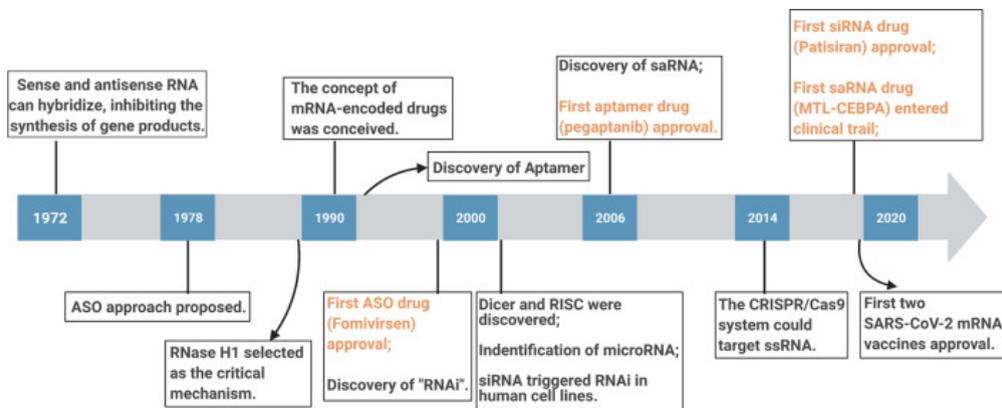


Figura 1. Evoluzione delle terapie a base di RNA. (Yiran, Z. 2022)

1. Terapie a base di RNA e loro meccanismo d'azione.

1.1. Oligonucleotidi antisenso (ASO).

Lo sviluppo di questa classe terapeutica si basa sulla tecnologia antisenso: nel DNA riconosciamo due filamenti: senso e antisenso. Il filamento antisenso funge da stampo per la trascrizione dell'mRNA, che verrà tradotto a proteina. Il secondo filamento trascrive per una molecola di mRNA antisenso, che risulterà complementare alla molecola senso. L'antisenso può, quindi, formare un doppio filamento che blocca l'attività dell'mRNA stesso, regolando così l'espressione genica.

Strutturalmente gli ASO sono brevi sequenze oligonucleotidiche (12-24 nucleotidi) a singolo filamento di DNA o RNA, con un peso molecolare intorno ai 6-9 kDa. Sono complementari ad uno specifico RNA e possono ridurre, ripristinare o modificare l'espressione di una proteina (Crooke, S.T., 2021).

Gli ASO agiscono attraverso due meccanismi: un meccanismo degradativo e uno non-degradativo, chiamato anche meccanismo a blocco sterico. (Fig. 2a)

Nel meccanismo degradativo un ASO, a struttura DNA simile, lega l'mRNA a cui è complementare, il doppio filamento ASO-RNA recluta l'enzima RNasi H1: un enzima monomero che degrada in maniera specifica il filamento di RNA.

Nel meccanismo non-degradativo si ha la regolazione della trascrizione senza l'ausilio di enzimi specifici. Con questo meccanismo un ASO può bloccare la sintesi proteica per ingombro sterico: le unità ribosomiali non riescono a legarsi al trascritto per iniziare la traduzione in proteina oppure può alterare lo *splicing* del pre-mRNA guidandolo a *splicing* alternativi.

In particolare, quando un ASO si appaia alla sequenza di un attivatore dello *splicing* il fattore di attivazione non riesce a legarsi, con conseguente inibizione del processo di *splicing* del trascritto e un possibile *exon-skipping*. Il risultato finale è, quindi, la repressione del gene e la mancata produzione di proteina.

Contrariamente, se l'ASO si appaia alla sequenza di un repressore dello *splicing*, il blocco del legame con il fattore di inibizione dello *splicing* porta ad un'attivazione del processo e al cosiddetto *exon inclusion*.

1.2. *Small interference RNA (siRNA)*.

I siRNA sono piccole molecole di RNA a doppio filamento, con un peso molecolare intorno ai 13kDa che riescono a inibire la sintesi proteica.

Rientrano nel fenomeno dell'RNA interferenza (RNAi): un meccanismo di difesa naturale della cellula verso gli RNA estranei di origine virale che identifica le molecole di RNA a doppio filamento di origine patogena e le degrada. (Schuster, S. 2019)

Una volta entrato nella cellula il siRNA si associa ad alcune proteine per formare un complesso ribonucleoproteico il *RNA-induced silencing complex (RISC)*, al cui interno la proteina Argonauta 2 (Ago 2) degrada uno dei due filamenti, mentre quello rimanente funge da stampo per complessare l'mRNA bersaglio impedendo la traduzione in proteina. (Fig. 2b)

Una caratteristica peculiare dei siRNA è che il filamento all'interno del complesso RISC riesce a complessare il filamento bersaglio solo se è perfettamente complementare e da questo nasce la loro grande specificità.

1.3. *Aptameri*.

Gli aptameri sono catene oligonucleotidiche a singolo filamento con una struttura tridimensionale ben definita, che sono in grado di legare e inibire le proteine. (Adachi, T. 2019)

Posso agire legando specificatamente una proteina e antagonizzando il suo legame con il corrispondente recettore, oppure possono fungere da trasportatori per trasferire altri agenti terapeutici verso uno specifico tessuto o cellula bersaglio. In questo secondo meccanismo l'aptamero è specifico per un recettore o proteina espressa sulla superficie cellulare. (Fig. 2d)

1.4. *Vaccini a base di mRNA*.

L'avvento della pandemia da SARS-CoV-2 ha permesso lo sviluppo, l'approvazione e l'uso dei primi vaccini a base di mRNA. Il meccanismo dell'immunizzazione si basa sulla somministrazione di una sequenza di mRNA virale che entra nel citoplasma della cellula

ospite e viene tradotto nella proteina che fungerà da antigene. Questa viene degradata in piccoli peptidi che saranno espressi sul complesso maggiore di istocompatibilità (MHCs) dove verranno riconosciuti dalle cellule presentanti l'antigene, che a loro volta attiveranno le cellule B, l'immunità umorale anticorpo mediata e le cellule T CD4+ e CD8+. (Chaudhary, N. 2021) (Fig. 2e)

In particolare, nei vaccini contro SARS-CoV-2 si ha l'iniezione intramuscolare di una nanoparticella lipidica contenente l'mRNA codificante per la proteina virale 'spike'. Dagli studi svolti finora è emerso che la nanoparticella transfetta un grande numero di cellule immunitarie, tra cui le cellule presentanti l'antigene. (Lindsay, K. 2019)

1.5. *miRNA*.

I miRNA sono piccole molecole di ncRNA che influenzano l'espressione genica via RNAi (Bartel D.P. 2004).

La biosintesi dei miRNA è un processo a più fasi che inizia nel nucleo della cellula con la trascrizione dei pri-miRNA da parte della RNA polimerasi III e il loro processamento da parte della nucleasi Drosha in pre-miRNA. Questi ultimi sono trasportati nel citoplasma dall'exportina 5 dove vengono processati da Dicer in miRNA maturi a doppio filamento. Uno dei due filamenti viene degradato e il miRNA a singolo filamento rimanente si associa a formare il *RNA induced silencing complex (RISC)* che regolerà la trascrizione genica o degradando l'mRNA bersaglio, se l'appaiamento tra i due è completo, oppure inibendone la traduzione, nel caso in cui l'appaiamento sia parziale. (Fig. 2b)

I miRNA sono impiegati sia come biomarcatori diagnostici che come potenziali agenti terapeutici.

1.5.1. *miRNA come biomarcatori*.

Un biomarcatore ideale dovrebbe essere stabile, facile da identificare, specifico, robusto, riproducibile e minimamente invasivo o non invasivo. (Jazbutyte, V. 2012)

I biomarcatori clinici permettono non solo di confermare la presenza di una patologia, ma anche la sua origine genetica. I miRNA rappresentano dei possibili biomarcatori ideali, poiché sono espressi in modo ubiquitario, possono essere facilmente isolati e quantificati in modo sensibile e specifico con biopsie del tessuto.

Esistono, tuttavia, delle limitazioni a questo loro utilizzo, tra cui una non ottimale estrazione dell'RNA (Kim, Y.K.2012) e la variabilità genetica che può portare a un'espressione dei miRNA molto diversa tra individui.

Nonostante queste limitazioni, l'identificazione di miRNA come biomarcatori diagnostici è un campo attivo che ha permesso di portare nella pratica clinica alcuni prodotti che sono usati per diagnosticare e/o dare una prognosi di differenti tipologie di cancro e di malattie legate all'età (Bonneau, E. 2019).

1.5.2. miRNA come agenti terapeutici.

In molte malattie umane si osserva la deregolazione di più ncRNA; pertanto, lo scopo della moderna scienza farmaceutica è quello di adottare un approccio su più fronti per combattere le patologie mirando a regolare molti bersagli simultaneamente.

In questa prospettiva un ruolo importante è rivestito dai miRNA, i quali possono regolare l'espressione di molti geni sia in uno specifico tessuto che in una cellula (Lim, L.P. 2005), inoltre hanno la possibilità di intervenire su un'intera via di segnalazione che può essere mal regolata in una patologia.

Singoli miRNA possono essere sovra o sotto- espressi in differenti stati patologici, quindi, le terapie a base di miRNA possono essere utilizzate in generale per ripristinare il loro corretto livello di espressione nella cellula.

Per aumentare i livelli espressione dei miRNA che risultano ridotti da una determinata patologia (Metias, S.M. 2009; Farooqi, A.A. 2016) possono essere usati i *miRNA mimics*: molecole di RNA sintetiche che hanno la stessa sequenza del miRNA endogeno sotto espresso, e che ne ripristinano i normali livelli all'interno della cellula svolgendo la medesima funzione.

Anche gli *short hairpin RNA (shRNA)* possono essere usati come strumenti terapeutici per ripristinare i livelli di miRNA, sfruttando la stessa via di maturazione dei miRNA endogeni: vengono processati da Dicer e poi si complessano con le proteine responsabili della formazione del complesso RISC.

La terapia sostitutiva con miRNA deve fornire dei livelli di farmaco che siano efficaci, ma al tempo stesso sicuri. Una sovra-espressione del farmaco può causare epatotossicità,

insufficienza multiorgano e morte. (Grimm, D. 2010) I possibili effetti avversi di questa terapia possono essere mitigati da una somministrazione locale del farmaco.

Per ridurre i livelli di espressione di miRNA che risultano aumentati nel corso di un processo patologico si sfruttano gli *antagomiRs*: molecole di RNA sintetiche che legano e sequestrano i miRNA endogeni e ne prevengono il legame con il loro mRNA bersaglio.

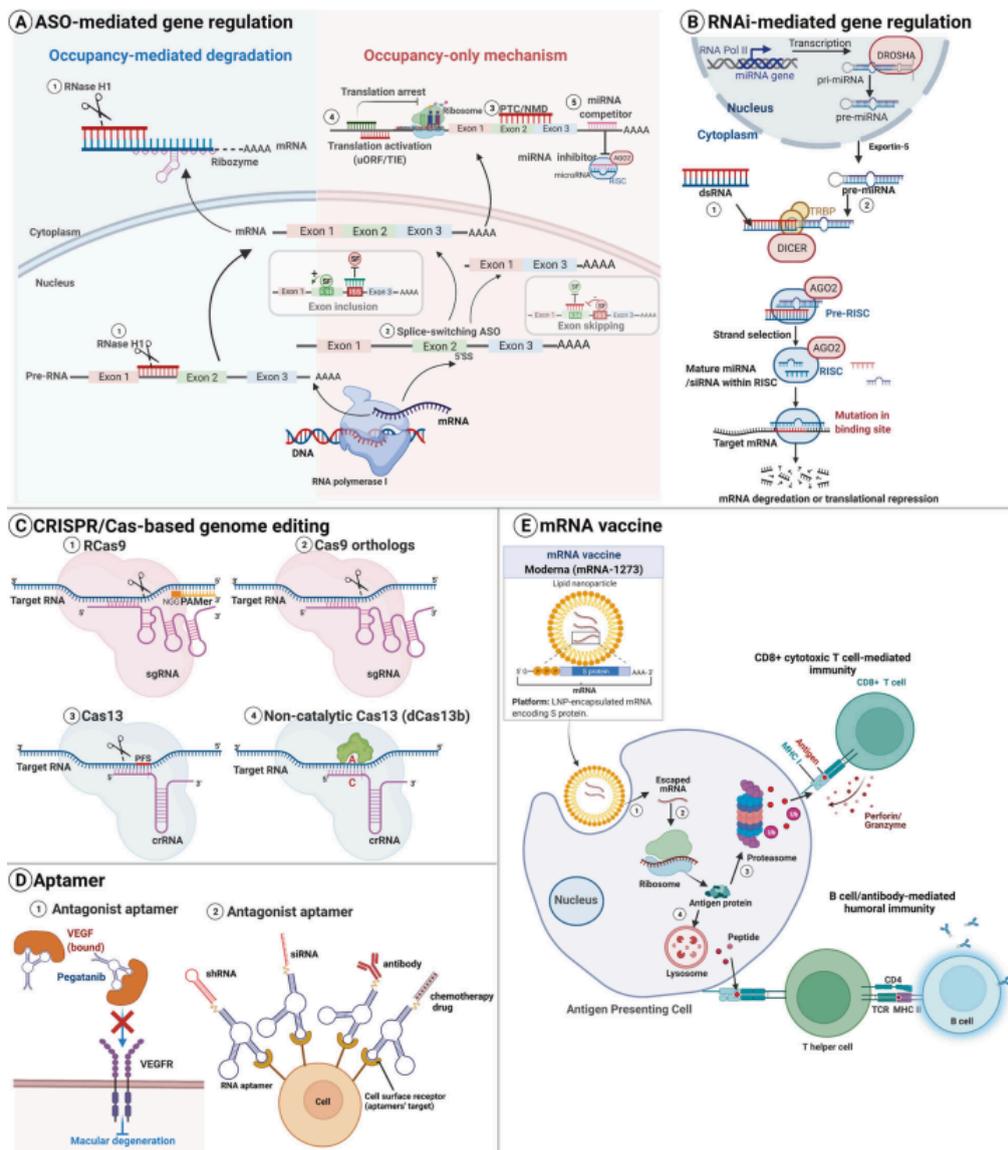


Figura 2. Meccanismi d'azione delle terapie a RNA. a. Oligonucleotidi antisense. b. Meccanismo di regolazione genica mediato dai miRNA. c. CRISPR-Cas-9. d. Aptameri. e. Vaccini a mRNA. (Yiran, Z. 2022)

1.6. CRISPR-Cas-9.

Il sistema *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)-proteina 9 associato a CRISPR (Cas-9), rappresenta un meccanismo di difesa batterico contro l'infezione da fagi e il trasferimento di plasmidi in natura, ed è stato recentemente proposto come una potente piattaforma di targeting del DNA guidata dall'RNA per l'editing del genoma, la variazione trascrizionale e la modulazione epigenetica. Questa tecnologia permette di manipolare con precisione praticamente qualsiasi sequenza genomica specificata da un breve tratto di RNA guida (Charpentier, E. 2013), consentendo di chiarire la funzione dei geni coinvolti nello sviluppo e nella progressione delle malattie, di correggere le mutazioni che le causano, ma anche di inattivare oncogeni attivati o di attivare geni oncosoppressori disattivati.

La proteina Cas-9 è costituita da due regioni chiamate REC (*Recognition*) e NUC (*Nuclease*). La regione REC è responsabile del riconoscimento dell'acido nucleico, mentre la regione NUC contiene 2 domini nucleasici: il dominio HNH e RuvC. Inoltre, all'estremità C-terminale della regione NUC troviamo il dominio di interazione con PAM (*Protospacer Adjacent Motif*).

Per riconoscere i substrati di dsDNA e tagliare ciascun filamento con un dominio nucleasico distinto (HNH o RuvC), i sistemi basati su CAS-9, necessitano di brevi molecole di RNA: il crRNA e il crRNA transattivante (tracrRNA), questi si associano a formare una struttura ibrida di RNA che costituisce il sgRNA (*single guide RNA*) per Cas-9 consentendole di tagliare qualsiasi sequenza di DNA contenente una sequenza bersaglio complementare di 20 nt e una sequenza PAM adiacente. (Fig. 3.)

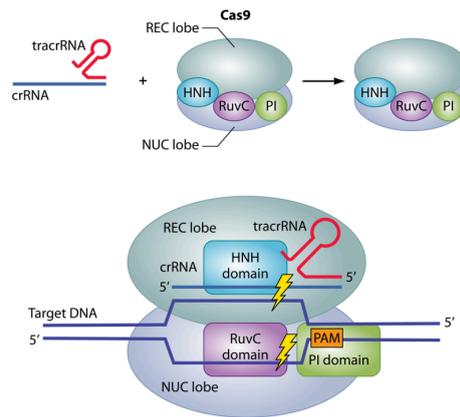


Figura 3. Struttura del complesso CRISPR-Cas-9 (Ishino, Y. 2018)

Modificando la sequenza dell'RNA guida, il sistema CRISPR-Cas-9 può essere programmato per colpire virtualmente qualsiasi sequenza di interesse di DNA nel genoma e generare una rottura sito-specifica a doppio filamento (DSB). (Jinek, M. 2012) La DSB creata da Cas-9 viene poi riparata sia mediante una giunzione non omologa delle estremità (NEEJ) (Lieber, M.R. 2010), soggetta a errori, e che può dar luogo a piccole inserzioni e/o delezioni casuali nel sito di taglio, sia mediante una riparazione diretta per omologia ad alta fedeltà (San Filippo, J. 2008), che determina una precisa modifica del genoma nel sito della DSB utilizzando un DNA donatore.

Utilizzando librerie di RNA a guida singola (sgRNA), gli screening genomici basati su CRISPR possono essere sfruttati per identificare geni bersaglio di farmaci o di resistenza alle malattie, come nuovi oncosoppressori o oncogeni, e per valutare rapidamente i bersagli dei farmaci. (Dominguez, A.A, 2016; Shalem, O. 2015)

Nonostante i vantaggi e le grandi promesse, esistono alcuni ostacoli tra CRISPR-Cas-9 e il suo pieno potenziale terapeutico. (Cox, D.B.T. 201; Doudna, J.A. 2015) Ridurre o evitare mutazioni indesiderate in siti *off-target* con omologia di sequenza con i siti *on-target* è, infatti, fondamentale per un uso efficace dell'ingegneria genomica mediata da CRISPR nelle applicazioni cliniche. (Sander, J.D. 2014; Tsai, S.Q. 2016) Pertanto, il modo in cui Cas9 individua sequenze target specifiche di 20 coppie di basi (bp) all'interno di genomi lunghi da milioni a miliardi di coppie di basi e successivamente induce una rottura del DNA a doppio filamento (dsDNA) specifico per la sequenza rimane oggi una questione critica non solo dal

punto di vista della biologia di CRISPR, ma anche negli sforzi per sviluppare strumenti terapeutici precisi ed efficienti basati su Cas-9.

1.7. circular RNA (circRNA).

I circRNA sono una classe di sequenze di RNA circolari chiuse che comprendono sia molecole endogene individuate in vari organismi, che molecole sintetiche che possono essere ingegnerizzate tramite metodi chimici e/o enzimatici. (Obi, P. 2021; Zhang, Y. 2016) Inizialmente, la loro identificazione e il loro sequenziamento è stato piuttosto complesso, in quanto mancano delle code di poliadenilazione che sono utilizzate nelle normali tecniche di sequenziamento del RNA.

Fin dalla loro prima identificazione i circRNA erano considerati prodotti di un processo di *splicing* aberrante. Solo recentemente sono stati evidenziati i meccanismi coinvolti nella loro biosintesi e le loro funzioni biologiche.

Essi sono generati da un tipo specifico di *splicing* chiamato *back-splicing*, in cui la terminazione 5' di un pre-mRNA a monte dell'esone viene legata in modo non lineare con la terminazione 3' di un esone a valle. (Fig. 4)

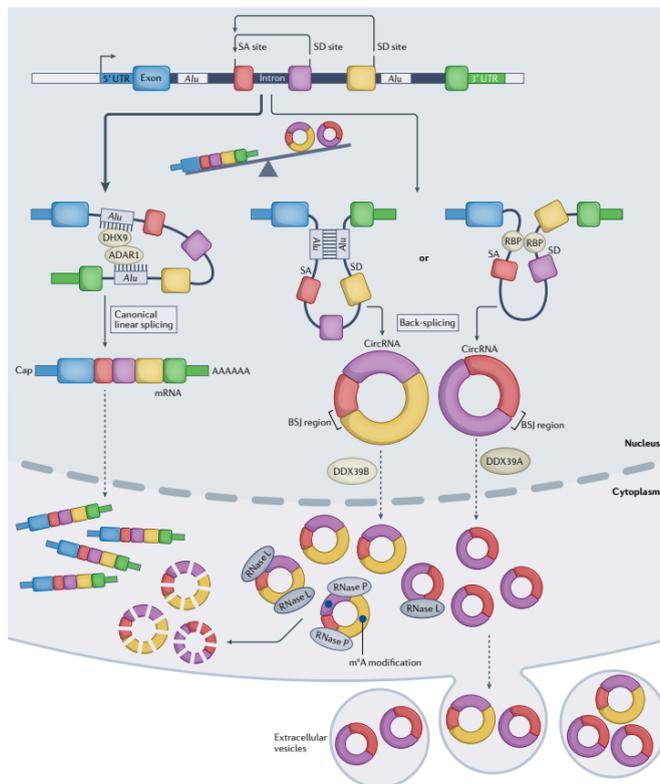


Figura 4. Meccanismo di *back-splicing* per la formazione dei circRNA.

Per quanto riguarda le loro funzioni fisiologiche, esse prevedono tre meccanismi (Fig.5.):

1. I circRNA si localizzano nel citoplasma della cellula, pertanto possono partecipare alla regolazione genica post-trascrizionale legandosi ai miRNA, e prevenendone il legame con l'mRNA bersaglio (*miRNA sponging*). Nonostante questo meccanismo sia quello più frequentemente proposto per il funzionamento dei circRNA, la maggior parte di essi non contiene siti bersaglio per i miRNA (Guo, J. U. 2014) (Fig. 5a)
2. I circRNA possono interagire con le proteine in diversi modi. Possono contenere nella loro sequenza motivi di legame per le proteine (RBP), e regolarne la funzione. Alternativamente, possono fungere da supporto per gli enzimi facilitandone l'interazione con il substrato, ad esempio circ-Foxo3, si lega sia a p53 che all'ubiquitina ligasi E3 MDM2, facilitando l'ubiquitinazione mediata da MDM2 e la successiva degradazione proteasomica di p53 mutante. (Fig. 5b)
3. A causa della mancanza del cap in 5', la maggior parte dei circRNA è stata classificata come RNA non codificante e non traducibile, fino alla recente scoperta di una traduzione indipendente dal cap. Per la prima volta, infatti, è stato riportato che i circRNA contenenti elementi IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) possono mediare l'inizio della traduzione di proteine da parte dei ribosomi in assenza di un'estremità libera di 5'. (Chen, C.Y.1995) L'IRES consente di coinvolgere i ribosomi per avviare la traduzione delle proteine. Nei sistemi procariotici ed eucariotici è stata scoperta un'ampia varietà di sequenze IRES strutturalmente diverse. (Filbin, M.E. 2009) Le proteine tradotte dai circRNA naturali sono coinvolte in varie funzioni biologiche. Ad esempio, la proteina espressa da circ-ZNF609 regola la proliferazione dei mioblasti in modo IRES-dipendente nel topo e nell'uomo. (Legnini, I. 2017) (Fig. 5c)

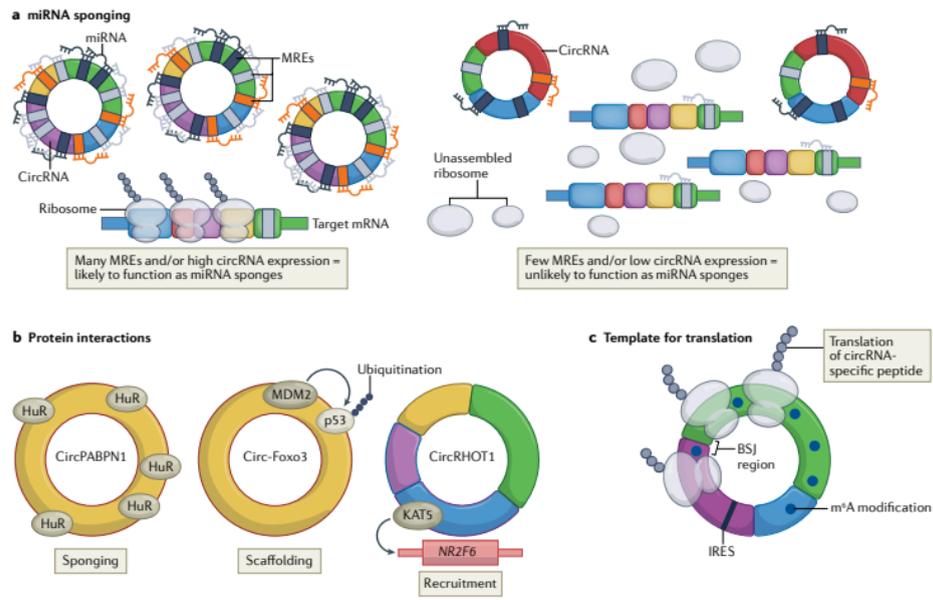


Figura 5. Meccanismi d'azione dei circRNA. **a.** miRNA sponging. **b.** Interazione con proteine. **c.** Traduzione dei circRNA. (Kristensen, L.S. 2022)

2. Modificazioni chimiche dell'RNA.

La molecola di RNA è intrinsecamente instabile, pertanto sono necessarie modificazioni chimiche a livello delle basi azotate, del ribosio o del legame fosfodiesterico per migliorarne la stabilità *in vivo*, aumentarne la resistenza alle nucleasi, l'efficacia e specificità. È importante sottolineare, tuttavia, che eccessive modificazioni nella molecola possono avere effetti tossici o rendere la molecola meno efficace. (Jackson, A.L. 2006)

2.1. Modificazioni chimiche degli ASOs e dei siRNA.

La modificazione chimica più utilizzata è la modificazione dello scheletro fosfodiesterico con un fosforotioato: uno degli atomi di ossigeno liberi nel gruppo fosfato viene sostituito con un atomo di zolfo (Eckstein, F. 2014). Questa modificazione facilita l'ingresso della molecola nella cellula e la sua biodisponibilità *in vivo*, inoltre riduce l'affinità per le fosfodiesterasi. (Fig.6)

Una seconda modificazione consiste nella sostituzione del gruppo ossidrilico in 2' nel ribosio con un atomo di fluoro (F), un gruppo metossietilico (MOE), un estere metilico (O-Me) oppure nella formazione un anello biciclico con un ponte metilenico, dando origine ai cosiddetti *Locked Nucleic Acid* (LNA). (Fig. 6) Queste modificazioni in posizione 2' portano anche ad una riduzione del loro potere immunogeno.

Tutti questi derivati hanno una maggiore affinità per l'RNA bersaglio, ma perdono l'affinità per la RNasi H; quindi, agiranno solamente mediante un meccanismo di tipo non-degradativo.

Alcune modificazioni vedono un'alterazione più profonda della struttura classica dell'RNA: nei derivati morfolino diamidati (PMO) lo zucchero è sostituito da un anello morfolinico e all'atomo di fosforo è legata una dimetil-ammina; nei Peptidic Nucleic Acid (PNA) lo scheletro costituente lo zucchero e il gruppo fosfato è sostituito da un legame ammidico che porta ad una struttura simil-peptidica. (Fig. 6) Grazie a queste nuove strutture si riesce ad eliminare la carica negativa, tipica degli acidi nucleici, evitando completamente la loro interazione con le proteine, comprese quelle responsabili dell'attivazione della risposta immunitaria.

Alcuni farmaci a base di RNA sono stati modificati con il colesterolo in posizione 3' (Soutschek, J. 2004), un efficiente trasportatore transmembrana non tossico che facilita l'associazione del farmaco con le lipoproteine, il loro recettore e con le proteine transmembrana.

Tutti i siRNA in sperimentazione hanno una modificazione in 2' nel ribosio (2'-F o 2'-O-Me) (Settem R.L. 2019), mentre i LNA e i derivati metilati sono principalmente usati come ASO.

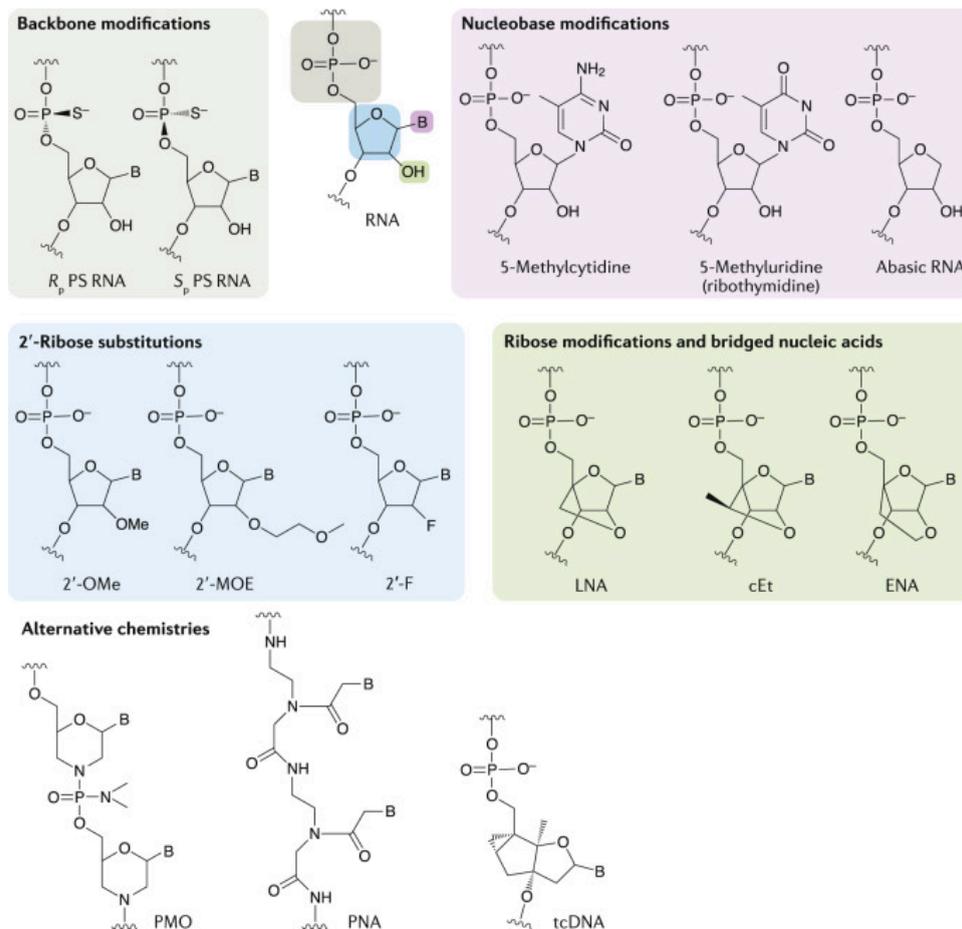


Figura 6. Modificazioni chimiche usate negli ASO e nei siRNA. (Roberts, T.C. 2020)

2.2. Modificazioni chimiche dei vaccini a mRNA.

Gli mRNA usati nei vaccini, come quelli endogeni, presentano un cap in 5', due untranslated region (UTR) in 3' ed in 5', un open reading frame (ORF) e una poliadenilazione in 3'.

Per il loro utilizzo in terapia è necessario ridurne il potere immunogenico e aumentare l'efficacia nell'espressione della proteina. Queste caratteristiche possono essere implementate andando a modificare la struttura stessa dell'mRNA. L'ottimizzazione del cap in 5' migliora la stabilità e l'efficacia della traduzione e modula la risposta infiammatoria. Anche la modificazione della sequenza può aumentare la stabilità della molecola.

In particolare, alcune sequenze nucleotidiche sono state modificate chimicamente inserendo pseudouridine (ϕ), N1-metilpseudouridine, 5-metilcitidine (m5C) e 5-metiluridine (m5U), con lo scopo di minimizzare la risposta immunitaria. (Karikò, K. 2008; Know H. 2018)

2.3. Modificazioni chimiche degli aptameri.

Anche negli aptameri si sono utilizzate diverse modificazioni chimiche per migliorare le proprietà farmacocinetiche. In molti aptameri troviamo una coda di polietilenglicole in 5' che permette di ridurre la clearance renale (Hoffman, S. 2011), un capping in 3' costituito da desossi-timidine invertite (Shi, H. 2014) e la sostituzione in 2' nel ribosio che contribuisce a prevenire la degradazione da parte delle nucleasi.

Rimane sempre anche la sostituzione del legame fosofodiesterico con il fosforotioato per aumentare l'affinità con la proteina bersaglio.

Tra le modificazioni rientrano anche gli aptameri *spiegelmers* che sono costituiti da L-nucleotidi invece che dai naturali D-nucleotidi.

L'idea si basa sul fatto che tutte le proteine sono stereospecifiche e quindi riconoscono il loro bersaglio tramite interazioni che dipendono strettamente dalle loro proprietà ottiche, ossia dalla chiralità della molecola.

Quindi, sintetizzando aptameri composti da L-nucleotidi si può evitare il loro riconoscimento da parte delle nucleasi, che essendo enzimi fisiologici riconoscono esclusivamente i nucleotidi naturali, ossia i D-nucleotidi.

La preparazione degli aptameri *spiegelmers* inizia con la sintesi della sequenza della proteina bersaglio utilizzando i D-amminoacidi. Si costruisce poi una libreria di aptameri formati da D-nucleotidi naturali e si va a saggiare la loro affinità per il bersaglio. Una volta individuato quello con maggior affinità lo si purifica e sequenzia, per poi sintetizzarlo chimicamente utilizzando gli L-nucleotidi non riconosciuti dagli enzimi fisiologici.

Si ottiene così un aptamero in grado di riconoscere la sua proteina bersaglio naturale, ma resistente all'attività degradativa delle nucleasi.

Una limitazione di questa tecnologia è la sintesi della struttura bersaglio nella giusta configurazione non-naturale (speculare). Nel caso in cui la proteina non possa essere sintetizzata devono essere definiti e sintetizzati degli epitopi o domini fisicamente stabili. Tali domini dovrebbero essere funzionali o almeno vicino ad un sito funzionale affinché vi sia effettivamente l'inibizione della proteina dopo l'interazione con l'aptamero *spiegelmers*.

Inoltre, il dominio dovrebbe essere localizzato sulla superficie della proteina in quanto il riconoscimento tra aptamero e segmento peptidico avviene nel contesto della proteina intera.

2.4. Alternative all'uso di mRNA convenzionali.

Oltre a queste tecnologie, che hanno lo scopo di aumentare le capacità terapeutiche degli mRNA, vi è stato lo sviluppo delle alternative all'uso dell'mRNA convenzionale: i self-amplifying mRNA (saRNA) ed i trans-amplifying mRNA (taRNA). (Fig. 7)

I saRNA sono sequenze nucleotidiche modificate che contengono 4 geni non strutturali nella regione ORF, che sono sfruttati per generare la RNA-polimerasi RNA dipendente (RDPR) e quindi fungono da promotori sub-genomici (Lundstorm, K. 2020; Bloom, K.2021). Si ottiene, in questo modo, una più lunga durata dell'espressione proteica.

Il taRNA è costituito da due tipi di RNA differenti: il primo che contiene un gene codificante per la replicasi, e il secondo che contiene il gene associato alla proteina di interesse. In questo sistema l'mRNA contenente il gene per la replicasi produce la RDPR, che amplifica quello contenente il gene di interesse con aumento dell'espressione proteica. (Beissert, T. 2020; Fuller, D. H. 2020)

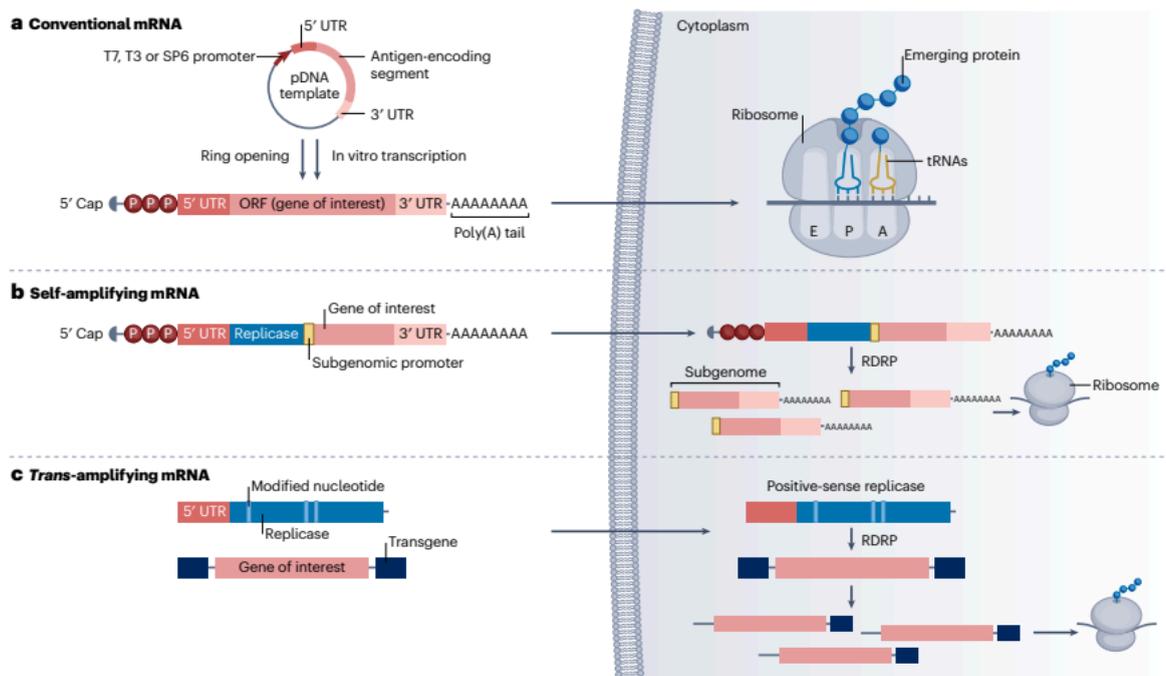


Figura 7. **a.** mRNA convenzionale. **b.** saRNA. **c.** taRNA. (Chuang, L. 2023)

2.5 Modificazioni chimiche del sgRNA del sistema CRISPR-Cas-9.

Nonostante la loro robustezza e la semplicità, l'uso terapeutico dei sistemi CRISPR presenta ancora molti ostacoli quali una somministrazione efficace, la possibilità di importanti effetti fuori bersaglio e la potenziale immunogenicità.

Le modificazioni chimiche utilizzate negli ASO e nei siRNA possono essere applicate anche all'sgRNA e all'mRNA di Cas-9. (Chen, Q. 2021) Ad esempio, le modificazioni in 2' nel ribosio e la sostituzione dello scheletro fosfodiesterico con il fosforotioato possono essere integrate nella sequenza di sgRNA per migliorare l'efficienza di editing genetico oltre che per ridurre l'attività aspecifica.

2.6. Modificazioni chimiche e sintesi dei circRNA.

L'RNA lineare è spesso soggetto alla degradazione da parte di varie RNasi. Grazie all'assenza delle estremità libere in 5' e 3', il circRNA covalentemente chiuso non subisce degradazione da parte delle esonucleasi. Di conseguenza, ha spesso una maggiore stabilità rispetto alla sua controparte lineare. (Liu, X. 2018; Abe, H. 2009) Questa maggiore stabilità dovrebbe favorire le applicazioni biomediche dei circRNA nell'ambito dello sviluppo di terapie e vaccini. Anche l'efficienza di traduzione dei circRNA è importante per una loro applicazione clinica.

Una sintesi efficiente di circRNA chimicamente definiti è fondamentale per le loro applicazioni biomediche.

Per tale sintesi sono stati sviluppati diversi approcci. In generale, i circRNA vengono ottenuti attraverso la sintesi di uno o più precursori di RNA lineare, seguita dalla circolarizzazione dell'RNA. (Petkovic, S. 2018) Le attuali tecnologie di sintesi chimica degli RNA lineari si basano sulla chimica di fosforamidati. Queste tecnologie sfruttano derivati nucleosidici trifosfati naturali, e utilizzano un gruppo protettore inattivo per sostituire i gruppi amminici e idrossilici reattivi dei trifosfati nucleotidici naturali.

L'RNA lineare precursore può essere circolarizzato chimicamente o per via enzimatica, utilizzando enzimi proteici o ribozimi. Per la circolarizzazione chimica, vengono spesso utilizzati agenti condensanti come il bromuro di cianogeno (BrCN) o l'1-Etil-3-(3-dime-thylaminopropyl)carbodiimide (EDC) che inducono la condensazione del fosfato dell'estremità 5' con l'ossidrile dell'estremità 3' sull'RNA lineare. (Fig. 8a)

La circolarizzazione dell'RNA è spesso limitata dalla competizione tra reazioni intramolecolari e intermolecolari. Basse concentrazioni di RNA lineare favoriscono la circolarizzazione intramolecolare rispetto all'oligomerizzazione intermolecolare, aumentando così la resa del circRNA. (Petkovic, S. 2018)

Comunemente utilizzata è anche la circolarizzazione enzimatica, grazie alla sua efficienza generalmente elevata e spesso le DNA e le RNA ligasi provenienti dal batteriofago T4 sono utilizzate per legare gli RNA lineari con il monofosfato terminale. La circolarizzazione dell'RNA basata sulla DNA ligasi T4 è particolarmente utile per sintetizzare con precisione circRNA a partire da precursori di RNA lineari. (Fig. 8b)

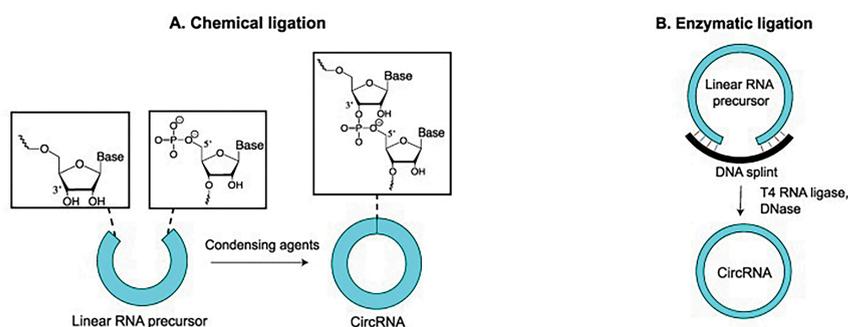


Figura 8. Metodi di circolarizzazione dei circRNA. (Xiang, L. 2022)

3. Sfide delle terapie a base di RNA e potenziali soluzioni.

Le terapie a base di RNA pur rappresentando una grande promessa nell'ambito dello sviluppo di nuovi agenti terapeutici, presentano anche criticità che è necessario affrontare. Le sfide maggiori sono l'immunogenicità della molecola di RNA, la necessità di avere un'elevata specificità di azione e un sistema di trasporto efficace.

3.1. Immunogenicità.

Il sistema immunitario, attraverso vari recettori sia di superficie che citoplasmatici, riconosce sia l'RNA a singolo filamento che quello a doppio filamento, anche se è stato osservato che l'RNA a singolo filamento è più prone a stimolare il sistema immunitario rispetto a quello a doppio filamento. (Sioud, M 2006)

Il riconoscimento extracellulare è mediato dai recettori della famiglia *Toll- like receptor (TLR)* di tipo 3, 7 e 8 negli endosomi, mentre il riconoscimento intracellulare è mediato da RIG-1 e dalla famiglia *NOD-like receptor* di tipo 1 e 2, che sono responsabili della formazione di una grande struttura infiammatoria denominata inflammosoma.

Quando un RNA esogeno viene riconosciuto dal sistema immunitario, la via di segnalazione principale che viene attivata è quella innescata dai TLR e mediata dal fattore di trascrizione mieloide (MyD88), che recluta il fattore di trascrizione nucleare NF- κ B che a sua volta induce la sintesi di citochine pro-infiammatorie.

L'attivazione dei TLR endosomiali è stimolata principalmente dalla presenza di sequenze ricche in guanosina e uridina (GU-rich), che stimolano una risposta mediata principalmente dall' INF- α .

Le modificazioni chimiche sviluppate in 2' a livello del ribosio hanno dimostrato la capacità di ridurre il potenziale immunostimolante delle molecole di RNA. In particolare, quando tali modifiche sono applicate all'uridina in sequenze ricche in GU, possono bloccare il riconoscimento con i TLR.

Anche i derivati morfolino simili (PMOs) possono ridurre l'immunogenicità neutralizzando la carica negativa del filamento e impedendo l'interazione con le proteine del sistema immunitario.

3.1.1. Screening delle reazioni avverse immuno-mediate.

Non tutte le terapie a base di RNA inducono la stessa risposta immunitaria, di conseguenza la difficoltà nel prevedere queste risposte ha spinto, nel corso degli studi preclinici, all'uso di metodi di screening più ampi.

Poiché le risposte immunitarie possono variare tra i modelli animali e l'uomo, per effettuare lo screening sono state utilizzate varie tipologie di cellule di origine umana. Inoltre, sarebbe utile anche effettuare un'analisi sulla quantità di citochine pro-infiammatorie che vengono prodotte dalla somministrazione della terapia. Questa stessa verifica è già ampiamente utilizzata nella valutazione di un'altra classe terapeutica: gli inibitori di chinasi.

3.1.2. Utilizzo di "tiny" RNA antisense.

È stato dimostrato che per avere un'attivazione efficiente dei TLRs è richiesto un filamento di RNA di almeno 21 nucleotidi (Kleinman, M.E.2008; Dalpke, A. 2012), quindi la progettazione di molecole di RNA terapeutico più corte può aggirare il problema. Tuttavia, l'utilizzo di frammenti più brevi accresce di molto la possibilità di avere effetti indipendenti dal bersaglio (*off.target*).

3.1.3. Applicazione della terapia a RNA metronomica.

In analogia con la chemioterapia (Simsek, C. 2019) una terapia a RNA metronomica si definisce quando si effettua la regolare e frequente somministrazione di una piccola dose di farmaco per un periodo prolungato, allo scopo di ottenere un intervallo di dosaggio basso, ma efficace, senza indurre un'eccessiva tossicità o immunogenicità.

Per consentire ciò in modo sicuro, sono necessari studi approfonditi di farmacodinamica e farmacocinetica che garantiscano una precisa comprensione della distribuzione del farmaco e della sua emivita plasmatica in relazione alle diverse tipologie di terapie a base di RNA.

3.1.4. Terapia di combinazione con RNA.

La terapia di combinazione può essere usata per ridurre la dose di RNA terapeutico richiesta e quindi anche il rischio di immunogenicità. La combinazione può prevedere la cosomministrazione di chemioterapici, immunosoppressori o piccole molecole. (Cortez, M. A. 2019; Smolle, M. A. 2017)

Inoltre, le terapie combinate con RNA terapeutici possono anche contribuire a superare il fenomeno della resistenza rispetto alle terapie attualmente utilizzate (De Los Santos, M. C. 2019). Questo effetto è stato dimostrato dall'uso di alcuni siRNA che hanno come bersaglio i geni coinvolti nell'assemblaggio del fuso mitotico, i quali aumenterebbero la sensibilità delle linee cellulari di cancro al polmone al paclitaxel, consentendo una riduzione, anche di 1000 volte nel dosaggio di quest'ultimo (Whitehurst, A. W. 2007).

3.1.5. *Uso di Small-Molecule Inhibitors of miRNA (SMIRs).*

L'uso di piccole molecole può presentare alcuni vantaggi rispetto all'uso di oligonucleotidi quali buona solubilità, biodisponibilità e stabilità metabolica (Zhang, S. 2010). Queste piccole molecole possono agire sugli RNA a livello trascrizionale o post-trascrizionale ed interferire con il processamento dei miRNA.

In particolare, le SMIRs possono agire sia a livello nucleare, bloccando la biosintesi dei miRNA in seguito ad una interazione con Drosha, sia a livello citoplasmatico interagendo con Dicer e quindi bloccando il processamento del pre-miRNA. (Fig. 9)

La prima molecola individuata in grado di inibire la formazione dei miRNA è stata l'azo-2-benzene, seguita dagli aza-flavanoni.

Un approccio più adeguato dal punto di vista chimico vede lo sviluppo di una SMIR legata ad un dominio effettore che può essere un piccolo oligonucleotide poli-adenilato in 2' e in 5', che recluta la RNAasi L per degradare la struttura di RNA. Tuttavia, questo approccio, per ora, ha dimostrato di funzionare esclusivamente *in vitro*.

Sebbene l'uso delle SMIRs sia un approccio terapeutico promettente, attualmente non ci sono studi clinici atti a verificarne la reale efficacia e sicurezza. Infatti rimangono numerose le sfide da affrontare, quali la specificità della molecola, il suo trasporto e la valutazione del profilo tossicologico.

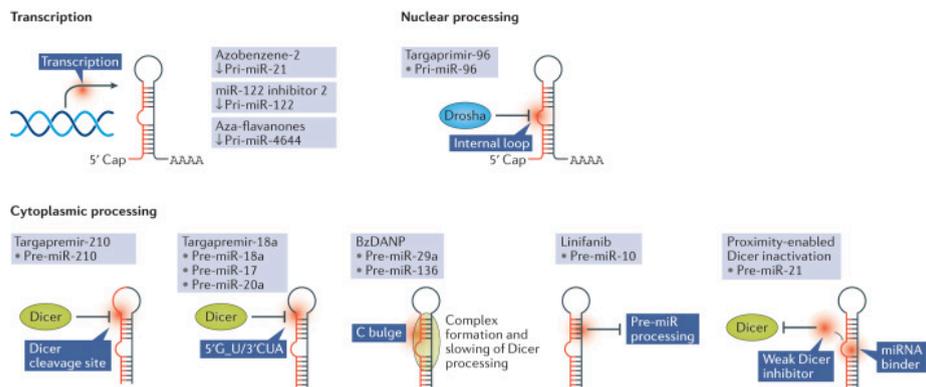


Figura 9. Siti bersaglio delle SMIRs nelle varie fasi di processamento dei miRNA. (Winkle, M. 2021)

3.1.6. Targeting dei ncRNA utilizzando inibitori degli elementi bloccanti e degli elementi strutturali.

Una nuova tipologia di terapia a RNA si basa sul blocco dei siti di interazione (IE) dell'RNA, in particolare delle regioni del filamento necessarie per il legame con altre molecole quali proteine, DNA o lipidi, oppure degli elementi strutturali (SE) che sono responsabili della conformazione del filamento di RNA.

Gli inibitori dei siti di interazione possono essere anche pensati come oligonucleotidi antisenso in grado di mascherare il sito di interazione al ligando endogeno, mentre un oligonucleotide inibitore degli elementi strutturali potrà influenzare le strutture secondarie e terziarie proprie degli RNA (Fig. 10). Le piccole molecole sono degli ovvi candidati per uno sviluppo terapeutico grazie alla loro stabilità e alle loro caratteristiche tossicologiche e farmacocinetiche.

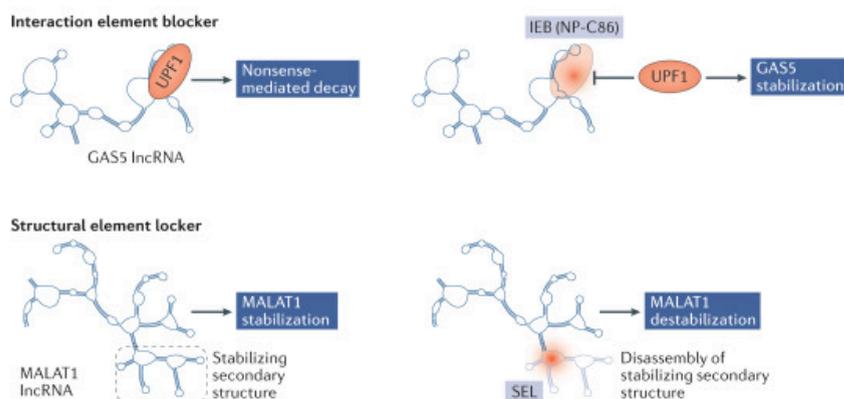


Figura 10. Blocco dei siti di interazione (IE) e degli elementi strutturali (SE), (Winkle, M. 2021)

4. Sistemi di drug-delivery per la terapia a base di RNA.

Un fattore importante da considerare nelle terapie a base di RNA è come possano essere somministrate nell'organismo per arrivare al loro bersaglio senza subire fenomeni degradativi da parte delle nucleasi, e come si possano evitare effetti *off-target*. Infatti, la qualità di una terapia a base di RNA è determinata dalla specificità con cui l'RNA si lega al suo bersaglio e da un efficiente sistema di delivery.

Questi ultimi possono essere causati da un appaiamento non corretto tra i primi 8 nucleotidi, oppure dal caricamento nel complesso RISC del filamento passeggero invece di quello guida.

In questo contesto, quindi, i sistemi di delivery svolgono un ruolo chiave. Trovare un sistema di somministrazione efficiente non significa solo far sì che il farmaco arrivi all'organo o al tipo cellulare di interesse, ma anche che sia capace di attraversare la membrana cellulare e svolgere le sue funzioni intracellulari. In generale, le sfide da affrontare nella somministrazione di oligonucleotidi sono la loro instabilità chimica, la carica negativa e la natura idrofila che riduce la capacità di diffusione attraverso le membrane (Baumann, V. 2014).

Nel targeting passivo si sfrutta la capacità di alcuni organi come il fegato, i reni, la milza e i linfonodi di accumulare il farmaco senza la necessità di modificazione del farmaco stesso, al contrario nel targeting attivo il filamento di RNA terapeutico viene coniugato con altre molecole la cui funzione è quella di riconoscere uno specifico tessuto, organo o cellula bersaglio.

I principali sistemi di delivery passivi sono: la coniugazione con lipidi, l'uso di nanoparticelle lipidiche o polimeriche e l'utilizzo dei dendrimeri, mentre per il delivery attivo si sfrutta la coniugazione con N-acetilgalattosamina, con anticorpi monoclonali o con gli aptameri.(Fig. 11a-f)

Oltre a queste tecnologie la ricerca ha sviluppato anche nuovi approcci quali l'uso degli esosomi, gli acidi nucleici sferici, nanostrutture a DNA e le *Bacterial Mini Cells*. (Fig. 11g-i)

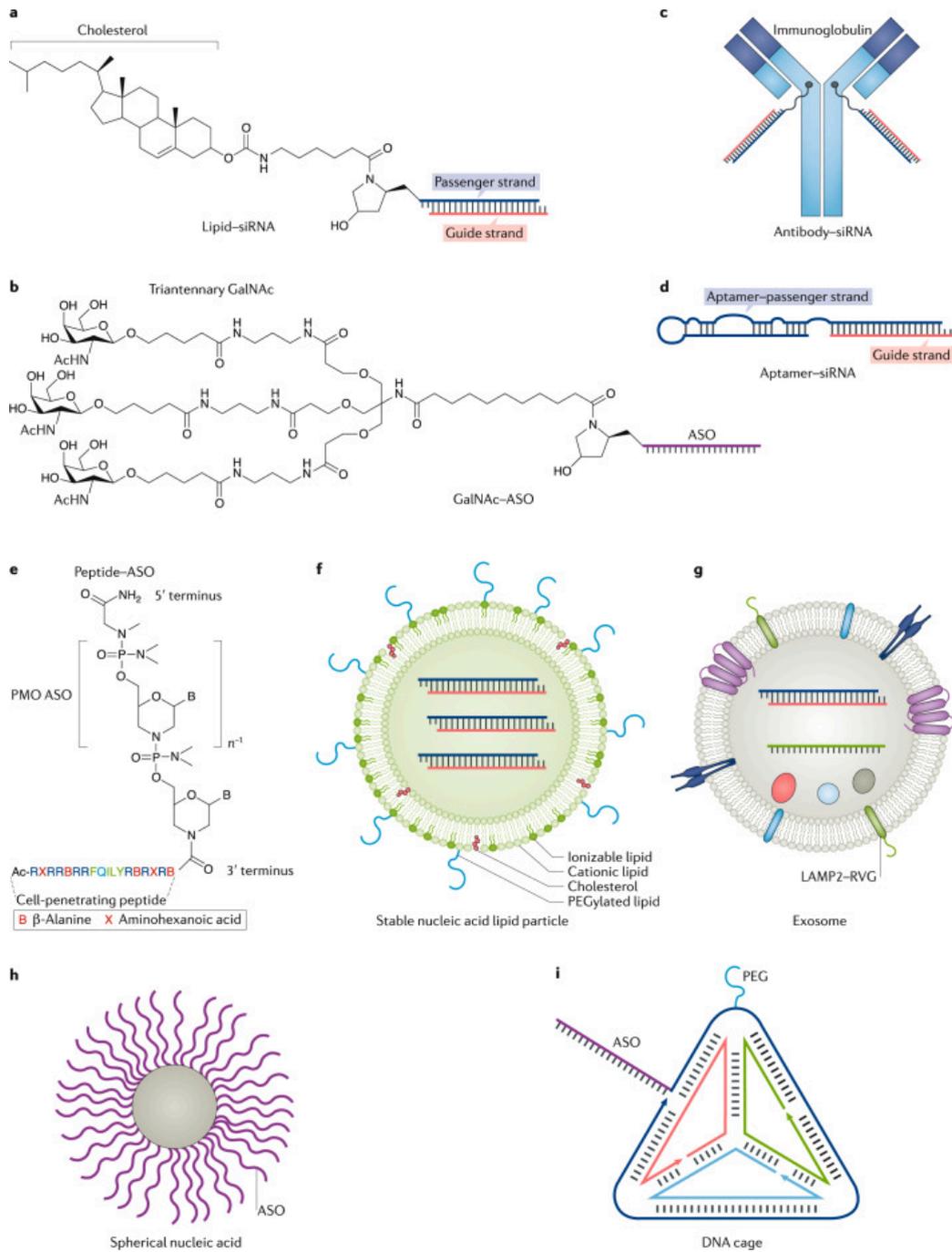


Figura 11. Meccanismi di drug delivery per le terapie a base di RNA. (Roberts, T.C. 2020)

4.1. Targeting passivo.

4.1.1. Nanoparticelle lipidiche (LNPs).

In base alle caratteristiche delle molecole che li compongono, i lipidi hanno la capacità di organizzarsi in diverse strutture: micelle, liposomi o nanoparticelle.

Le LNPs sono un sistema chiave nel delivery dei farmaci a base di RNA. Nella loro progettazione bisogna tenere in considerazione alcuni parametri fondamentali: le dimensioni della particella, la stabilità a lungo termine e un efficiente intrappolamento del RNA al suo interno. (Fig. 11f)

La prima formulazione lipidica di oligonucleotidi era formata esclusivamente da fosfatidilcolina e colesterolo, dimostrando che l'intrappolamento del RNA era possibile, ma poco efficace. (Fraley, R.T. 1979; Fraley R. 1980) Successivamente, alla formulazione sono stati aggiunti lipidi cationici che grazie alle interazioni ioniche hanno aumentato l'efficacia di intrappolamento.

Ulteriori sviluppi nella formulazione hanno permesso di concludere che un sistema efficace a base di LNP richiede 3 componenti:

1. Un lipide cationico ionizzabile.
2. Fosfolipidi (solitamente la fosfatidilcolina) e colesterolo.
3. PEG-lipidi.

4.1.1.1. Lipidi cationici ionizzabili.

È stata preparata una vasta gamma di lipidi cationici tutti accomunati da due caratteristiche: una testa cationica costituita da un'ammina terziaria che si protona a pH acido ed è tipicamente in forma neutra a pH neutro e una coda lipidica che contribuisce a rendere la natura della molecola sufficientemente idrofobica da permetterne la sua incorporazione durante la formazione della nanoparticella. (Fig. 12)

Le LNPs vengono preparate, solitamente, in una soluzione tamponata a pH acido che favorisce l'interazione ionica tra il lipide ionizzato e il filamento oligonucleotidico. Successivamente si passa ad una soluzione isotonica e tamponata a pH neutro, in questo modo si elimina la carica negativa dalla superficie delle LNPs, fondamentale per prevenire risposte immunitarie secondarie alla somministrazione endovenosa del preparato.

Per ridurre la potenziale tossicità, immunogenicità e migliorare la biodegradabilità delle LNPs, nei lipidi ionizzabili si è introdotto un legame estereo che è di più facile attacco da parte degli degradativi intracellulari quali esterasi e lipasi.

Critica è la posizione in cui nella molecola viene inserito il legame estereo, sia per la sua funzione che per la sua velocità di eliminazione. Quando tale legame è posizionato vicino alla testa cationica, influenza il valore di pKa del lipide, e di conseguenza la sua efficacia di trasporto dell'oligonucleotide. Pertanto, è preferibile collocarlo lontano dalla testa polare.

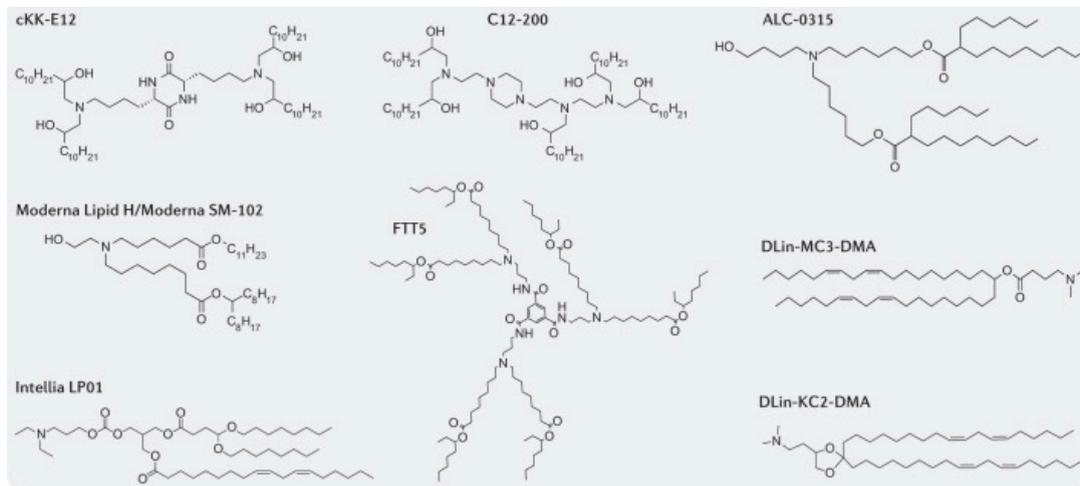


Figura 12. Esempi di lipidi cationici ionizzabili usati nella formulazione delle LNPs. (Paunovska, K. 2022)

4.1.1.2. Fosfolipidi e colesterolo.

I fosfolipidi e il colesterolo sono generalmente considerati promotori di stabilità della formulazione. (Cheng, X. 2016) Sebbene, nel contesto delle LNP, questa loro funzione sia perlopiù aneddotica, i fosfolipidi grazie alle loro proprietà di formare doppi strati lipidici e alle loro elevate temperature di transizione di fase, aiutano ad aumentare la rigidità della membrana riducendone la permeabilità.

Diverso è il ruolo del colesterolo che rimane ancora poco chiaro nel contesto del delivery di acidi nucleici. Si è osservato che le LNPs prive di colesterolo lo sequestrano durante la circolazione, portando ad un effetto di destabilizzazione della membrana (Rodrigueza, J.J 1995). Questo processo di sequestro del colesterolo avviene attraverso uno scambio con le lipoproteine circolanti. Alcuni studi suggeriscono che la quantità di colesterolo tipicamente usata nella formulazione delle LNPs sia maggiore rispetto a quella che effettivamente può essere trattenuta nelle nanoparticelle. Inoltre, è stato constatato sia richiesto circa il 30-40% di fosfolipidi e colesterolo per intrappolare efficientemente l'RNA.

4.1.1.3. PEG-lipidi.

I PEG-lipidi sono lipidi a cui viene legata una catena polimerica di polietilenglicole (PEG). I sistemi LNPs non contengono un nucleo acquoso, pertanto, questi lipidi si posizionano quasi esclusivamente sulla superficie della nanoparticella e la loro concentrazione ne controlla le dimensioni (Belliveau, N.M. 2012).

Inoltre, essi creano una barriera sterica che si estende all'esterno della particella e ne previene l'aggregazione e ne migliora la stabilità.

4.1.1.4. Meccanismo d'azione delle LNPs.

Una volta somministrate, le LNPs, vengono internalizzate dalle cellule per via endosomiale. All'interno dell'endosoma si ha un abbassamento del pH da 7 a circa 5.5 e questo fa sì che la nanoparticella si carichi positivamente e si crei una capacità tampone. Questa capacità tampone, unita alla destabilizzazione della membrana, causa un rigonfiamento osmotico e la rottura dell'endosoma. L'oligonucleotide, viene quindi liberato nel citosol e potrà svolgere la sua funzione di regolazione genica.

4.1.1.5. Limiti della tecnologia delle LNPs.

Uno dei limiti principali della tecnologia di delivery basata sulle LNPs è che la loro somministrazione endovenosa può causare reazioni di ipersensibilità quali sindromi simil-influenzali o anafilassi cardiache severe. (Szebeni, J. 2018) Alcune proprietà biochimiche, come la carica superficiale e il contenuto in colesterolo, possono influenzare le reazioni di ipersensibilità (Szebeni, J. 2018).

Le reazioni da infusione possono essere controllate somministrando, precedentemente, una combinazione di antistaminici, corticosteroidi immunosoppressori (ad es. desametasone) e paracetamolo per via orale o con una riduzione della velocità di infusione.

4.1.2. Polimeri e nanoparticelle polimeriche.

Un'altra strategia di delivery vede coinvolto l'uso di polimeri e di nanoparticelle polimeriche.

Un polimero frequentemente utilizzato è il poli- (latic-co-glycolic acid) o PLGA. Attualmente i sistemi di delivery a base di PLGA sono autorizzati esclusivamente per il trasporto di piccole molecole e non di acidi nucleici. (Zhong, H. 2018) A pH neutro il PLGA

non presenta una carica positiva che gli permetta di complessare lo scheletro fosfodiesterico dell'RNA carico negativamente. Questa problematica ha dato il via a una serie di ricerche volte a migliorare le caratteristiche chimiche dei polimeri quali la carica, la biodegradabilità e il peso molecolare.

Polimeri come la polietilenimmina (PEI) e i poli-(L-lisina) (PLL) che contengono gruppi amminici che possono caricarsi positivamente, possono complessare l'RNA tramite interazioni elettrostatiche trasportandolo all'interno della cellula. (Harada-Shilba, M. 2002; Ewe, A. 2017) Tuttavia, entrambi questi polimeri non hanno dimostrato buone caratteristiche di tollerabilità. Altri polimeri cationici considerati sono stati i poli(beta-aminoesteri), sviluppati per migliorare le caratteristiche di tollerabilità e di biodegradabilità, in quanto nella loro struttura troviamo un legame estereo di più facile attacco da parte degli enzimi intracellulari. (Fig. 13a)

Un'altra classe di polimeri usati nel trasporto di RNA sono i dendrimeri: molecole costituite da un numero definito di unità monomeriche che si sviluppano da un nucleo centrale della molecola.

I dendrimeri sono sintetizzati in modo da contenere gruppi cationici, come le poli(amidoammine) (PAMAM), che possono complessare la molecola di RNA e trasportarla. Attualmente sono stati impiegati nel trasporto di RNA a livello del sistema nervoso centrale (Xu, L. 2014). (Fig. 13b)

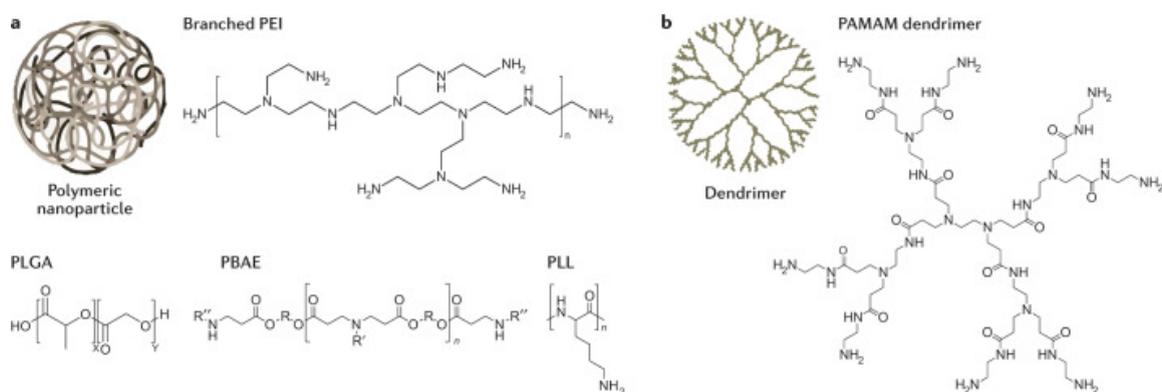


Figura 13. **a.** Struttura di alcuni polimeri sfruttati nell'allestimento di nanoparticelle polimeriche. **b.** Struttura generale dei dendrimeri. (Paunovska, K. 2022)

4.1.3. Coniugazione con lipidi.

La coniugazione con molecole lipidiche è stata utilizzata principalmente per migliorare il delivery dei siRNA. In particolare, la coniugazione con una molecola di colesterolo in 3' del filamento passeggero è stata utilizzata con successo per il silenziamento genico nel fegato. È stato ottenuto lo stesso effetto anche con la coniugazione con acidi grassi a lunga catena (> C₁₈) tramite un linker di trans-4-idrossiprolina (Wolfrum, C. 2007). (Fig. 11a)

4.1.4. Delivery con Bacterial Mini Cells.

Le Bacterial mini cells sono cellule sferiche prive di DNA cromosomiale e quindi incapaci di replicarsi, che possono essere usate come sistema di drug delivery. (MacDiarmid, J.A. 2011) Le mini cells caricate con l'oligonucleotide sono indirizzate alle cellule o al tessuto bersaglio tramite l'espressione sulla superficie di anticorpi e hanno trovato applicazione nella terapia contro il cancro.

Nonostante questo approccio si sia dimostrato sicuro negli studi tossicologici sugli animali, l'origine batterica potrebbe scatenare una reazione infiammatoria nei pazienti, mediata dai TLR, soprattutto quando sono somministrate per via sistemica. (Akira, S. 2004)

4.1.5. Coniugazione con peptidi.

La coniugazione con peptidi rappresenta un approccio attrattivo, poiché, permette un targeting cellulo/tessuto specifico, la penetrazione cellulare e i peptidi fungono da agenti di fuga endosomiale. La coniugazione prevede l'uso di piccoli frammenti peptidici (< 30 amminoacidi) con una natura anfifilica o cationica. Il loro utilizzo principale è la coniugazione diretta con ASO a struttura PMO e PNA. Questi coniugati hanno dimostrato un'ottima attività nel trattamento di varie patologie, tra cui la distrofia muscolare di Duchenne. (Fig. 11e)

4.2. Targeting attivo.

4.2.1 Coniugazione con N-acetilgalattosammina (GalNAc).

La coniugazione con GalNAc è stata utilizzata sia per i siRNA che per gli ASO e ha portato all'approvazione di alcuni farmaci sia da parte di FDA (givosiran e lumasiran) (Balwani, M. 2020) che dell'EMA (inclisiran). (Garrelfs, S.F. 2021) (Fig. 11b)

La GalNAc è un derivato glucidico trivalente che lega il recettore per le asialoglicoproteine (ASGPR). Questo recettore ha le caratteristiche ideali per un targeting attivo: è altamente espresso nelle cellule bersaglio (in questo caso gli epatociti), non è espresso in altri tipi cellulari, viene velocemente endocitato a seguito del legame con il suo ligando ed è rapidamente riciclato a livello della membrana cellulare.

La GalNAc presenta diverse caratteristiche che la rendono un ligando ideale per il delivery.

Innanzitutto, ha un peso molecolare minore di 2kDa che è molte volte inferiore rispetto al peso dell'ASO o del siRNA che trasporta. Questo basso peso molecolare garantisce che la maggior parte del farmaco somministrato sia rappresentato dall'oligonucleotide.

In secondo luogo, è possibile apportare dei miglioramenti alla sua struttura per potenziare il silenziamento genico *in vivo*. (Nair, J.K. 2014; Prakash, T.P. 2014)

Dopo la somministrazione, il complesso RNA-GalNAc entra nel circolo ematico dove viene trasportato da due tipologie di proteine: a bassa affinità e ad alta affinità. Nel caso delle proteine con alta affinità si è osservato che il complesso viene endocitato, si fonde con i lisosomi e viene completamente degradato. Al contrario, nel caso delle proteine a bassa affinità l'oligonucleotide viene liberato dal complesso proteico e può quindi riconoscere ASGPR con successiva endocitosi. L'uscita dall'endosoma verso il citoplasma avviene grazie alla presenza di specifici canali di trasporto chiamati oligoportine. In questo modo il siRNA o l'ASO può raggiungere il citosol e svolgere la sua attività di silenziamento genico (Bennett, C.F. 2010).

4.2.2. Coniugati oligonucleotide-anticorpo monoclonale (AOCs).

Gli anticorpi monoclonali (mAb) sono risultati ottimi sistemi di delivery per la loro grande specificità, la lunga emivita e la loro scarsa immunogenicità. (Beck, A. 2017) La tecnologia della coniugazione con mAb ha avuto un rapido sviluppo nell'ultimo decennio, permettendo una migliore comprensione del meccanismo di rilascio e del ruolo di ogni componente sull'attività globale del coniugato. La coniugazione di anticorpi monoclonali con piccole molecole organiche è già stata utilizzata nella terapia contro il cancro per trasportare molecole citotossiche verso la cellula bersaglio, diventando un importante strumento terapeutico.

Una successiva evoluzione ha visto la coniugazione tra anticorpi e oligonucleotidi che possiedono una grande selettività nella regolazione genica. Questi ultimi infatti se non coniugati, hanno il grande svantaggio di avere una breve stabilità ematica, una scarsa capacità di attraversare le membrane e una bassa selettività tissutale. Gli anticorpi, con la loro lunga emivita, la selettività nel riconoscimento del bersaglio e la capacità di trasportare i loro coniugati all'interno della cellula, consentono di migliorare notevolmente il trasporto degli oligonucleotidi.

Negli AOCs ritroviamo principalmente ASO e siRNA che sono stati sviluppati principalmente come dei potenti strumenti diagnostici, anche se più recentemente si stanno evolvendo come un importante approccio terapeutico per molte patologie. (Dovgan, I. 2019)

La coniugazione tra oligonucleotide e mAb può avvenire con vari metodi, che comprendono: interazioni ioniche, coniugazione per affinità o coniugazione diretta. (Fig. 14)

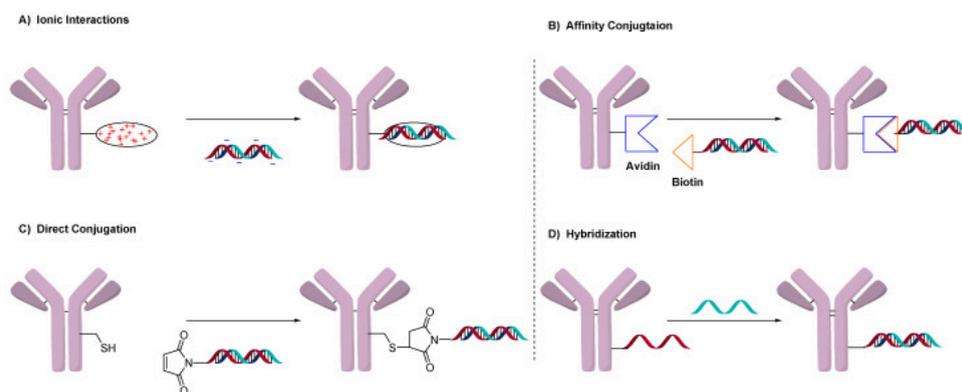


Figura 14. Metodi di coniugazione tra mAb e oligonucleotide. (Dugal-Tessier, J. 2021)

4.2.2.1 Coniugazione con interazioni ioniche.

La carica negativa dello scheletro zucchero-fosfato rappresenta un elemento attrattivo per la preparazione di coniugati. Quindi, l'iniziale fusione o modificazione del mAb con una molecola multi-cationica come la protamina o una poli-arginina ha permesso di sintetizzare i primi coniugati. (Song, E. 2005; Chandela, A. 2019) La forte interazione ionica che si instaura tra le due cariche permette, infatti, il legame tra oligonucleotide e anticorpo. Questo metodo di coniugazione è applicabile a molti oligonucleotidi e non richiede modificazioni chimiche importanti.

Il primo vantaggio di questo metodo è la sua semplicità e flessibilità nel consentire di coniugare diverse sequenze oligonucleotidiche. In secondo luogo, una volta che l'oligonucleotide è entrato nella cellula, il complesso poli-cationico agisce come agente di fuga lisosomiale.

Infatti, nel lisosoma, il complesso agisce come una “spugna protonica”, per cui gli ioni cloruro (Cl⁻) diffondono all'interno per compensare lo squilibrio di carica causando un rigonfiamento osmotico, che si traduce in un aumento della permeabilità di membrana. (Akinc, A. 2005) Vista la scarsa permeabilità di membrana nei confronti degli oligonucleotidi, questa “via di fuga” lisosomiale rappresenta un elemento particolarmente importante.

Il primo esempio di questo sistema di delivery è rappresentato da un siRNA che aveva come target il gene gag del capsid del virus HIV-1.

In questo caso sono state apportate modificazioni chimiche che hanno coinvolto la coniugazione con protamina.

Un primo approccio ha previsto la reazione tra protamina e sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) cicloesano-1-carbossilato (Sulfo-SMCC), e successivamente la coniugazione con l'anticorpo. (Fig. 15)

Una secondo approccio ha invece coinvolto l'utilizzo di un polimero di poli-arginina, al cui termine è presente un'idrossilammina che condensando con l'aminoacido non-naturale para-acetil-fenilalanina, crea un'ossima che lega il polimero al mAb a cui successivamente si legherà ionicamente l'oligonucleotide.

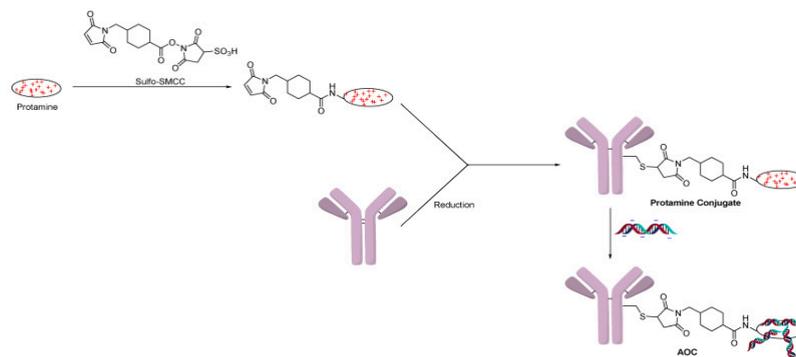


Figura 15. Coniugazione con protamina usando un linker Sulfo-SMCC. (Dugal-Tessier, J. 2021)

4.2.2.2. Coniugazione per affinità.

In questa coniugazione si sfrutta l'affinità di legame tra la biotina, legata all'oligonucleotide, e l'avidina legata all'anticorpo. Il vantaggio di questa coniugazione è la sua stabilità *in vivo*. Infatti, i complessi policationici possono aggregarsi a seguito di cambiamenti della concentrazione salina, mentre i complessi con biotina sono molto più resistenti a tale effetto. (Bolcato-Bellemin, A.L. 2007) Una diversa coniugazione per affinità vede l'utilizzo di neutravidina.

4.2.2.3 Coniugazione diretta.

Questa coniugazione prevede che all'oligonucleotide sia aggiunto un linker coniugato direttamente a una lisina, una cisteina o a un amminoacido modificato dell'anticorpo. I linker che possono essere utilizzati sono gli stessi che sono usati nella coniugazione tra molecole e anticorpo, quindi possono essere: cleavable, non-cleavable, acido-labili o prevedere ponti disolfuro. (Fig. 16)

Questo metodo ha anche il vantaggio che i linker hanno bassi pesi molecolari e, quindi, impattano meno sulle caratteristiche globali del coniugato. Il legame del linker all'oligonucleotide può avvenire sia direttamente sullo scheletro zucchero fosfato, che su un gruppo amminico che viene aggiunto all'estremità terminale dell'oligonucleotide.

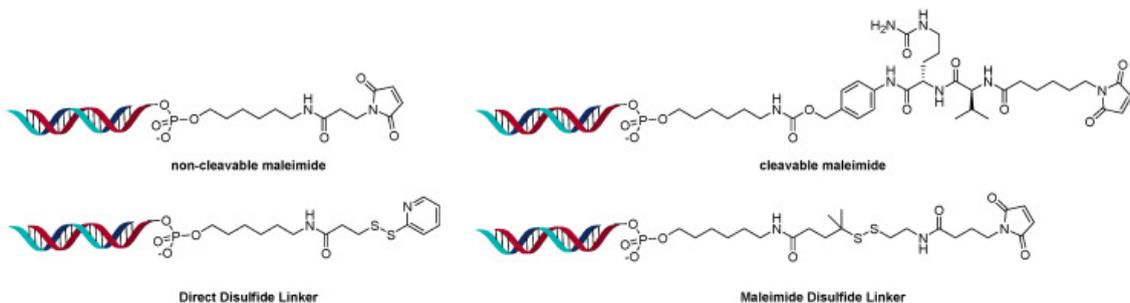


Figura 16. Coniugazione tramite linker tra mAb e oligonucleotide sfruttando il gruppo fosfato dello scheletro fosfodiesterico. (Dugal-Tessier, J. 2021)

Il linker viene legato in modo selettivo al filamento senso dell'oligonucleotide. La ragione di questo sta nel fatto che il filamento antisenso è coinvolto nell'attività del complesso RISC (nel caso dei siRNA), quindi la sola modificazione del filamento senso elimina la possibilità

che residui del linker possano interferire con l'attività di regolazione genica degli oligonucleotidi.

Un limite degli AOCs preparati per coniugazione diretta è che non presentano, nella struttura, nessun agente di fuga lisosomiale, di conseguenza possono andare incontro ad un'uscita lenta dell'oligonucleotide dal lisosoma con conseguente impatto sull'attività di regolazione genica.

4.2.3. Delivery per coniugazione con un aptamero.

Una strategia utilizzata per trasportare in maniera cellulo-specifica una molecola a base di RNA è stata quella di legare l'oligonucleotide a un aptamero. Il coniugato siRNA-aptamero viene generato come un polimero legato in modo covalente allo scopo di migliorare il riconoscimento di specifici recettori. Dopo la somministrazione il complesso viene internalizzato nella cellula, consentendo il silenziamento genico via RNAi. (McNamara, J.O. 2006) (Fig. 11d)

Inoltre, test *in vivo* hanno evidenziato che l'aggiunta di una catena di polietilenglicole di 20 kDa nel terminale in 5' del siRNA aumenta l'emivita e la biodisponibilità del coniugato. (Dassie, J.P. 2009)

4.2.4. LNPs coniugate con mAb.

Gli ASO e i siRNA sono oligonucleotidi abbastanza piccoli da poter essere coniugati e trasportati da mAb, mentre gli mRNA presentano dimensioni troppo elevate per questo approccio di delivery. Per questa ragione gli mRNA sono solitamente formulati all'interno di nanoparticelle lipidiche (LNPs) che a loro volta possono essere ancorate a mAb.

In questo caso, gli anticorpi ricoprono la LNPs tramite interazioni di tipo non covalente con una proteina ricombinante (*anchored secondary scFv enabling targeting*, detta ASSET) che viene inserita nella membrana della nanoparticella e che lega il frammento cristallizzabile (Fc) degli anticorpi. In seguito all'interazione tra anticorpo e il suo recettore bersaglio avviene l'endocitosi del complesso con liberazione dell'oligonucleotide che potrà così svolgere la sua funzione. Questa tecnologia è stata usata per facilitare il legame delle LNPs nelle cellule extraepatiche allo scopo di trattare patologie infiammatorie intestinali. (Veiga, N. 2018)

5. Nuove strategie di delivery.

5.1. Esosomi.

Una nuova area della nanotecnologia prevede l'utilizzo degli esosomi: nanoparticelle lipidiche a doppio strato con un diametro compreso in un intervallo da 40 a 160 nm. Sono nanoparticelle endogene che si ritrovano in tutti i fluidi corporei, vengono secrete dalla maggior parte delle cellule e rappresentano mediatori cruciali nella comunicazione cellulare. Essi possono trasportare molecole bioattive attraverso le membrane biologiche, e anche attraverso la barriera ematoencefalica. Gli esosomi ingegnerizzati possono trasportare diverse specie di RNA con una minima *clearance* immunitaria e ridotti effetti collaterali. (Fig. 17.)

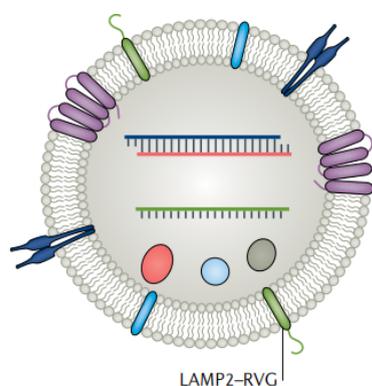


Figura 17. Struttura di un esosoma. La modificazione delle strutture superficiali può facilitare il loro trasporto in tessuti differenti. (Roberts, T.C. 2020)

La biodistribuzione degli esosomi può essere modulata variando la composizione dei ligandi di superficie: ad esempio, l'inserimento della glicoproteina del virus della rabbia (RVG) migliora la penetrazione nell'encefalo e facilita il trasporto nelle cellule nervose. (Alvarez-Erviti, L. 2011; Kamberkar, S. 2017; Yang, J. 2017)

5.2 Acidi nucleici sferici (SNAs).

Gli acidi nucleici sferici sono formati da un core idrofobico costituito da una nanoparticella di oro, silica o altri materiali, che viene rivestito da molecole di oligonucleotidi (tipicamente siRNA o ASO) che sono densamente impacchettati sulla superficie e legati ad essa tramite linker tiolici. (Fig. 18a)

Ogni oligonucleotide è costituito da una sequenza di riconoscimento (15-25 nucleotidi) che è complementare alla sequenza bersaglio, e da uno spaziatore di circa 10 nucleotidi che si lega alla nanoparticella del core. (Mokhtarzadeh, A. 2019)

Gli SNAs possono effettivamente trasportare degli acidi nucleici in quanto mostrano un rapido assorbimento cellulare. La loro struttura tridimensionale, infatti, viene riconosciuta dai recettori scavenger di classe A che ne permettono il rapido assorbimento per via endocitotica. Inoltre, inducono una trascurabile risposta immunitaria.

5.3 Nanostrutture di DNA.

Le nanostrutture di DNA sono costituite da lunghi filamenti di acido nucleico mantenuti in strutture definite grazie alla presenza di “graffette” di DNA che consentono un'ampia varietà di forme complesse, tra cui nanostrutture poligonali, dette gabbie a DNA. Tipicamente queste strutture si auto-assemblano grazie all'accoppiamento complementare tra le basi che le costituiscono. Possono essere progettate con geometrie precise tali che le loro proprietà fisiche possono essere finemente perfezionate al fine di massimizzare il loro potenziale di delivery. (Fig. 18b)

Nell'ambito delle terapie a RNA queste nanostrutture sono state utilizzate per il trasporto di ASO e di siRNA. Inoltre, possono essere legate anche ad aptameri per promuovere la specificità di assorbimento cellulare e aumentare la resistenza alle nucleasi. (Charoenphol, P. 2014)

Una particolare proprietà delle nanostrutture di DNA è che non si accumulano a livello epatico, e possono venire ingegnerizzate riducendo le dimensioni per avere un targeting extraepatico. Questa funzionalizzazione e la riduzione delle dimensioni aumenta la loro filtrazione a livello renale e ne riduce la biodisponibilità. (Lee, H. 2012; Jiang, D. 2019)

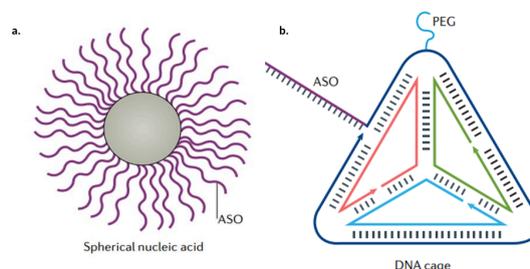


Figura 18. a. Struttura degli SNA. b. Struttura delle nanostrutture a DNA. (Roberts, T.C. 2020)

6.Terapie a base di RNA nel cancro.

L'RNA è un intermedio fondamentale nella funzione dei geni, e il suo ruolo nella modulazione genica e nel processo di carcinogenesi è stato ampiamente studiato. (Barbieri, I. 2020)

Sia gli mRNA codificanti che quelli non codificati, come lncRNA, miRNA e circRNA, influenzando i processi di trascrizione, *splicing* e traduzione possono essere coinvolti nello sviluppo di diversi tipi di cancro. (Delaunay, S. 2019; Vo, J.N. 2019)

In particolare, i circRNA riescono a modulare l'espressione genica nelle cellule cancerose grazie alla loro capacità di legare miRNA endogeni; inoltre riescono a legarsi alle proteine leganti l'RNA (RBP) per regolare l'espressione di una specifica proteina. (Conn, S.J. 2015)

Pertanto, risulta chiaro il loro possibile coinvolgimento nella traduzione delle proteine e in altre funzioni biologiche nell'insorgenza e nello sviluppo tumorale. (Yang, Q. 2017)

Ad esempio, circTP63 legando in modo competitivo il miRNA-873-3p riduce l'espressione di FOXM1 e la conseguente sovraespressione delle proteine regolanti il centromero (CENP-A/B) promuovendo in questo modo il ciclo cellulare. (Cheng, Z. 2019)

Anche i lncRNA sono coinvolti nel processo di tumorigenesi con vari meccanismi. Possono promuovere lo sviluppo tumorale regolando l'espressione dei geni oncosoppressori, oppure partecipare alle modificazioni epigenetiche dei geni modificandone l'espressione. Inoltre, promuovono i meccanismi dei circRNA.

I cambiamenti nei livelli di espressione dei vari RNA in differenti tipi di cancro si sono dimostrati utili come biomarcatori e per lo sviluppo di potenziali agenti terapeutici.

Su questi presupposti sono stati sviluppati sia vaccini anticancro a base di mRNA, che siRNA e miRNA terapeutici che attualmente sono ancora in fase sperimentazione clinica.

6.1. Vaccini antitumorali a RNA.

I vaccini antitumorali sono progettati in maniera specifica sfruttando antigeni tumorali espressi sulla superficie delle cellule cancerose, in modo tale da indurre una forte risposta immunitaria di natura antitumorale mediata dai linfociti B e T del paziente.

Generalmente, gli antigeni tumorali si classificano in due gruppi principali: gli Antigeni Associati al Tumore (TAA) e gli Antigeni Tumore Specifici (TSA). (Mitchell, D. A. 2015)

I TAA sono solitamente sovraespressi nelle cellule tumorali, ma sono presenti anche nei tessuti normali, conseguentemente hanno una scarsa specificità tumorale e presentano una bassa immunogenicità. Al contrario, i TSA sono dei neoantigeni che derivano dalle mutazioni proprie della cellula tumorale, pertanto sono altamente specifici ed immunogenici.

6.1.1. Vaccini a basa di TAA.

I vaccini a base di TAA sono quelli più sfruttati nella terapia oncologica; tuttavia, un loro limite risiede nella grande immunotolleranza propria dell'organismo umano; per questo la combinazione di multipli TAA nello stesso vaccino ha permesso di aumentare l'efficacia della terapia. (He, Q. 2022)

Il sistema di delivery più frequentemente utilizzato sono le cellule dendritiche, che hanno un ruolo essenziale nella risposta agli antigeni tumorali. Le cellule dendritiche vengono dapprima isolate dal paziente, trasfettate con l'mRNA dell'antigene e successivamente reinfuse nel paziente. Data la loro natura, questi primi vaccini sono anche chiamati vaccini a cellule dendritiche.

Il limite di questa tecnologia è che la produzione di questi vaccini è costosa, complessa e laboriosa, in quanto è necessario isolare le cellule dal paziente, mantenerle in coltura, promuoverne la differenziazione ed infine inserire l'antigene tumorale. Pertanto, sono stati sviluppati trasportatori sintetici per l'mRNA, come le nanoparticelle lipidiche, che hanno offerto un'alternativa meno onerosa rispetto alle cellule dendritiche.

Dopo la somministrazione della nanoparticella, questa viene endocitata nella cellula nella quale viene rilasciato l'mRNA che viene tradotto nel corrispettivo TAA dai ribosomi. L'antigene viene processato dal proteasoma, alcuni frammenti vengono caricati nel MHC di classe I che presenterà l'antigene alle cellule T CD8+ innescando una risposta immunitaria di tipo citotossico. In una via alternativa il TAA generato nel citoplasma viene secreto nell'ambiente extracellulare e successivamente internalizzato per via endosomiale dalle cellule presentanti l'antigene. Nell' endosoma, l'antigene, viene degradato e i suoi frammenti

caricati nell' MHC di classe II, attivando una risposta mediata dalle cellule T CD4+ e dalle cellule B, con la successiva produzione di anticorpi specifici per il TAA. (Fig. 19)

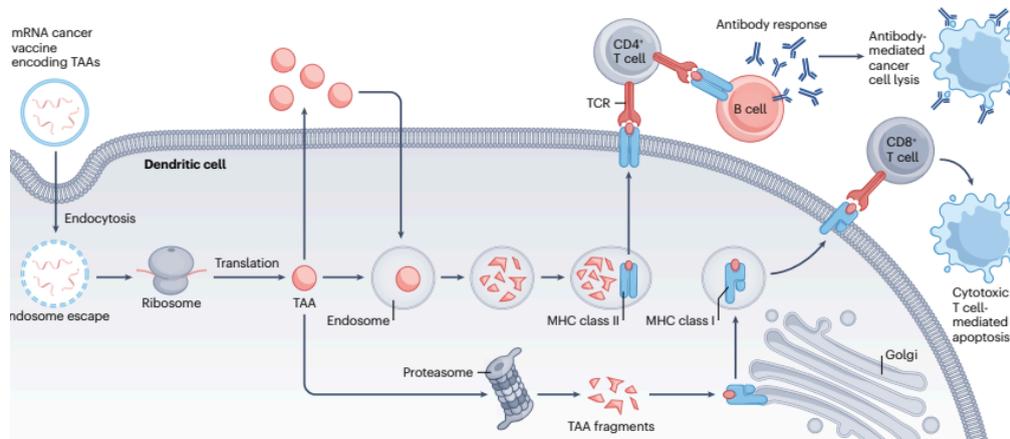


Figura 19. Meccanismo d'azione dei vaccini a base di TAA. (Chuang, L. 2023)

6.1.2. Vaccini a base di TSA.

I TSA, anche chiamati neoantigeni, si producono in risposta a mutazioni geniche nelle cellule tumorali e quindi non influenzano la tolleranza immunitaria centrale in quanto non sono espressi nei tessuti normali. (Blass, E. 2021) Di conseguenza, essi rappresentano una tecnologia particolarmente interessante nel trattamento del cancro. (Lang, F. 2022; Blass, E. 2021)

Il primo passo nello sviluppo di questi vaccini prevede lo screening dei neoantigeni per identificare le mutazioni tumore-specifiche, che viene fatto in seguito a biopsia del tessuto tumorale e del tessuto sano. Questi peptidi o antigeni, che corrispondono a geni mutati, sono analizzati per predire il loro legame con l'MHC di classe I o II. Il gene che corrisponde al peptide riconosciuto dal MHC viene integrato all'interno di un plasmide e trascritto *in vitro* in un mRNA che verrà poi caricato su una nanoparticella lipidica e somministrato al paziente.

Il meccanismo immunitario con cui l'antigene innescherà una risposta immunitaria contro le cellule tumorali del paziente è del tutto analogo a quello che si osserva con i vaccini a base di TAA.

6.2. mRNA codificanti per citochine.

Le citochine sono molecole di natura proteica con attività paracrina e autocrina, e possono essere considerate dei potenti modulatori del microambiente tumorale (TME). (Hashimoto, M. 2022; Briukhovetska, D. 2021)

La somministrazione sistemica di citochine ricombinanti è una strategia terapeutica clinicamente validata nel trattamento del cancro. (Berraondo, P. 2019) I limiti nella loro applicazione clinica sono la breve emivita plasmatica, la limitata finestra terapeutica, la necessità di somministrazioni ripetute di farmaco nell'arco giornaliero e gli eventi avversi a base immunitaria. Per superare questi ostacoli inizialmente si sono operate delle modifiche alla struttura delle citochine stesse come, ad esempio, il legame con una molecola di polietilenglicole.

La tecnologia dell'mRNA permette una rapida produzione di una grande quantità di citochine: quindi incapsulare l'mRNA che codifica per citochine in una nanoparticella permette di ottenere una maggiore emivita oltre che una maggior quantità di citochine nel TME, nel caso di somministrazione intratumorale.

Le citochine più utilizzate sono l'interleuchina-2 (IL-2), l'interleuchina 12 (IL-12) e l'interferone alfa (TNF- α).

6.3. mRNA codificanti per soppressori tumorali.

I geni oncosoppressori hanno la capacità di inibire lo sviluppo tumorale e spesso, in molti tumori, sono mancanti o inattivati (Sherr, C. J 2004).

Per indurre una rapida espressione di proteine ad attività antitumorale sono state somministrate nanoparticelle contenenti mRNA codificante per oncosoppressori. Infatti, dopo la trasfezione delle cellule tumorali con questi mRNA viene ripristinata la sensibilità delle cellule all'apoptosi e vengono attivate le cellule immunitarie in risposta al rilascio di citochine o al *damage-associated molecular patterns (DAMPs)*. Entrambe queste risposte inducono un'efficiente risposta immunitaria nei confronti del tumore. (Fig. 20)

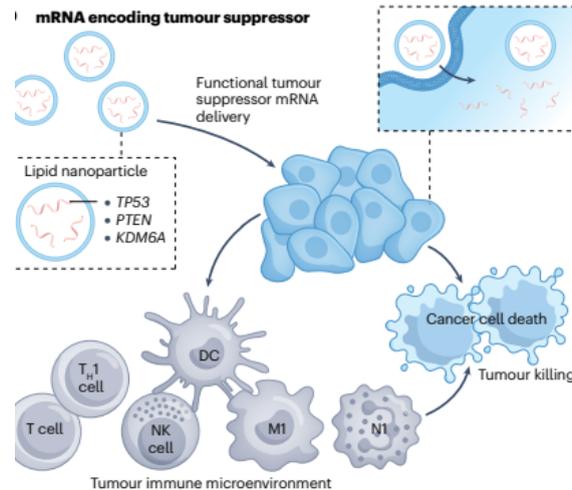


Figura 20. Meccanismo degli mRNA codificanti per oncosoppressori. (Chang, L. 2023)

L'mRNA per il gene TP53, che codifica per la proteina p53, una delle principali proteine oncosoppressive, la cui mutazione è stata ritrovata in circa il 50 % dei tumori (Soussi, T. 2006), è stato somministrato utilizzando una nanoparticella. Il risultato è stato il ripristino dei corretti livelli di p53 e delle sue funzioni fisiologiche effettrici ossia l'induzione dell'apoptosi, l'arresto del ciclo cellulare e l'avvio della riparazione del DNA.

6.4. mRNA codificanti per anticorpi.

L'uso degli mAb in oncologia ha visto un grande progresso in seguito allo sviluppo della tecnica dell'ibridoma. Tuttavia, la sintesi, il controllo di qualità e la purificazione degli anticorpi rappresenta, ancora oggi, una grande sfida nella loro produzione su scala industriale.

L'uso dell'mRNA per generare anticorpi direttamente *in vivo* è un approccio che attualmente sta avendo sviluppi importanti. Infatti, esso presenta dei vantaggi unici:

1. Somministrando una singola molecola di RNA possiamo ottenere la traduzione di anticorpi con specificità differenti.
2. Per ottenere varianti ottimizzate dell'anticorpo è sufficiente modificare la regione codificante del filamento di mRNA.
3. L'mRNA utilizza i ribosomi delle cellule per tradurre le molecole dell'anticorpo con tutte le corrette modificazioni post-traduzionali.

Attualmente, in sperimentazione clinica vi sono due mRNA codificanti per anticorpi: il primo è un mRNA codificante un mAb anti-Claudina, mentre il secondo un anti-CD3. (Sun,H. 2023) (Tab. 1)

Tabella 1. mRNA codificanti per mAB in sperimentazione clinica. (Han, S. 2023)

Period	Product	Type	Study	Phase	Sponsor	Formulation	Route	Other Therapy	Response
2020-2024	BNT141 (mRNA encoding anti-Claudin18.2 monoclonal antibody)	unresectable or metastatic CLDN18.2-positive gastric, pancreatic, ovarian, and biliary tract tumors	NCT04683939	Phase I/II	BioNTech SE	LNP	i.v.	nab-paclitaxel, gemcitabine	ongoing
2022-2026	BNT142 (mRNA encoding antibodies targeting CD3 × CLDN6)	solid tumor	NCT05262530	Phase I/II	BioNTech SE	LNP	i.v.	/	ongoing

Abbreviations: i.v., intravenous injection; LNP, lipid nanoparticle; CLDN18.2, claudin 18.2; CLDN6, the tight-junction protein claudin 6.

6.5. mRNA codificanti Cas9 per l'editing genetico.

L'editing genetico operato dal sistema CRISPR-Cas9 offre un metodo nuovo nel trattamento del cancro. (Katti, A. 2022) Questo trattamento può distruggere permanentemente i geni di sopravvivenza delle cellule tumorali e il suo successo si basa sulla capacità di trasportare Cas9 e il sgRNA all'interno delle cellule bersaglio.

Il delivery diretto della proteina Cas9 è l'approccio più semplice (Liu, J. 2015), anche se induce degli effetti avversi su base immunitaria ed è soggetto a una rapida degradazione dopo l'ingresso nella cellula.

Recentemente, la tecnologia degli mRNA è stata sfruttata per il trasporto di Cas9 nelle cellule. Questo approccio non solo riduce notevolmente la possibilità di effetti off-target, ma minimizza anche la genotossicità nel nucleo della cellula, permettendo un editing genetico più efficiente.

In dettaglio, il filamento di mRNA codificante per Cas9 e il sgRNA vengono trasportati utilizzando una nanoparticella lipidica la cui composizione può essere variata per ottenere il delivery in organi e tessuti differenti.

Le cellule tumorali vengono trasfettate con l'mRNA di Cas9 incapsulato nelle nanoparticelle lipidiche e sgRNA. L'mRNA viene tradotto nel citoplasma per produrre la proteina 9 associata a CRISPR (Cas9), che quindi si complessa con sgRNA liberato dalle nanoparticelle per formare ribonucleoproteine con affinità per specifiche sequenze di DNA. (Fig. 21)

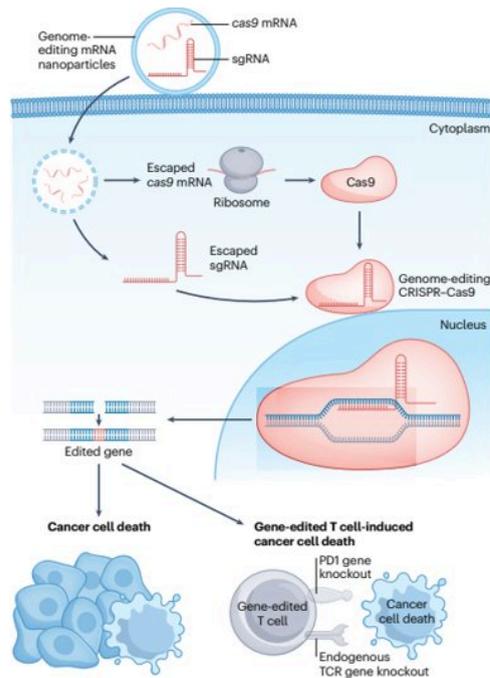


Figura.21. mRNA codificanti per Cas9 per l'editing genetico. (Chang, L. 2023)

6.6 siRNA in sperimentazione clinica per il trattamento del cancro.

Oltre all'uso degli mRNA per allestire vaccini antitumorali, si stanno sviluppando anche terapie a base di siRNA. In particolare, attualmente esistono 7 sperimentazioni cliniche che prevedono l'uso di siRNA. (Tab. 2)

Tabella 2. siRNA in sperimentazione clinica nel trattamento del cancro. (Goknur, K. 2022)

Drug name	Target	Disease	Delivery system	Administration route	Company	Current status	Clinical trials identifier
CALAA-01	RRM2	Advanced solid tumors	Cyclodextrin nanoparticles	IV	Calando Pharmaceuticals	Phase I (Terminated-2013)	NCT00689065
siG12D-LODER	KRAS G12D	Pancreatic ductal adenocarcinoma	Polymeric NPs (LODER)	EUS biopsy needle	Silenceed Ltd	Phase I (Completed-2013) Phase II (Recruiting)	NCT01188785 NCT01676259
Atu027	PKN3	Advanced or metastatic pancreatic cancer	Cationic LNPs	IV	Silence Therapeutics GmbH	Phase I (2012) Phase I/II (2016) (Completed)	NCT00938574 NCT01808638
siRNA-EphA2-DOPC	EphA2	Advanced solid tumors	Neutral LNPs-Liposomes	IV	MD Anderson Cancer Center	Phase I (Recruiting)	NCT01591356
DCR-MYC	MYC	HCC, solid tumors, lymphoma, or multiple myeloma	LNPs	IV	Dicerna Pharmaceuticals	Phase I (2017) Phase Ib/2 (2016) (Terminated)	NCT02110563 NCT02314052
ALN-VSP02	KSP and VEGF	Solid tumors	SNALPs	IV	Alnylam Pharmaceuticals	Phase I (2011) Phase I (2012) (Completed)	NCT00882180 NCT01158079
TKM-080301	PLK1	Advanced HCC	LNPs	IV	Arbutus Biopharma Corporation	Phase I/II Completed (2016)	NCT02191878

1. CALAA-01.

Il primo siRNA generato per il trattamento del cancro, CALAA-01, è stato sviluppato nel 2008 come terapia contro i tumori solidi in stadio avanzato. È costituito da quattro componenti tra cui: una nanoparticella basata su ciclodestrine lineari e cationiche, il polietilenglicole (PEG) come agente stabilizzante, la proteina transferrina umana e un siRNA specifico per inibire l'espressione di RRM2. (Davis, M.E. 2010)

La proteina RRM2 è una molecola chiave nella replicazione del DNA e nella divisione cellulare. È stato riportato che RRM2 è sovraespressa in una grande varietà di tipologie di cancro, e ha un ruolo importante nella progressione tumorale regolando il gene che codifica per Bcl-2. È stato dimostrato inoltre che, il silenziamento del gene per RRM2 riduce la proliferazione cellulare. (Heidel, J.D. 2007) Negli studi preclinici non è stata osservata alcuna tossicità anche a dosi multiple, e il farmaco si è dimostrato ben tollerato.

2. siG12D-LODER.

Il farmaco è stato sviluppato per pazienti affetti da cancro pancreatico localizzato allo stadio avanzato. La matrice polimerica biodegradabile Local Drug EluteR (LODER), costituita di copolimeri di PLGA ad alto peso molecolare (>50kDa), è stata utilizzata per rilasciare localmente in modo controllato e prolungato il siRNA mirato nei confronti di KRAS mutato in G12D all'interno del microambiente tumorale pancreatico. (Khvalevsky, R. 2013)

Il farmaco ha ridotto notevolmente la crescita dei tumori pancreatici sia in modelli murini ortotopici che xenotrapianti e sinotrapianti, senza causare alcuna tossicità. (Khvalevsky, R. 2013)

La sperimentazione clinica di fase I è stata condotta somministrando il farmaco al paziente tramite ecografia endoscopica con un ago da biopsia. Inoltre, è interessante sottolineare che la combinazione con gemcitabina ha dimostrato un potenziamento dell'effetto terapeutico.

3. Atu027.

Atu027 è un lipoplex contenente LNPs e siRNA che hanno come bersaglio le protein-chinasi N3 (PKN3), un target terapeutico che ha dimostrato di ridurre la progressione tumorale e la formazione di metastasi linfonodali nel cancro della prostata e quello pancreatico. La

somministrazione del farmaco per via intravenosa ha dimostrato una specifica inibizione di PKN3 nei topi, nei ratti e nelle scimmie. Inoltre, Atu027 è stato ben tollerato in combinazione con gemcitabina nei pazienti con adenocarcinoma pancreatico avanzato o metastatico, nell'ambito di una sperimentazione clinica di fase II.

4. siRNA-EphA2- DOPC.

Si tratta di liposomi a base di lipidi neutri (DOPC) che incapsulano un siRNA in grado di limitare l'espressione del gene del recettore 2 dell'efrina di tipo A (EphA2). Essi sono stati sviluppati sulla base dell'evidenza che la sovraespressione di questo gene, che codifica per una tirosin-chinasi, è associato ad un aggravamento del cancro ovarico (Thaker, P.H. 2004). Inoltre, è stato riportato che l'inibizione dell'espressione di EphA2 riduce la progressione anche del cancro mammario e pancreatico. (Noblitt, L.W. 2004; Duxbury, M.S. 2004) Nei topi è stata ottenuta una riduzione effettiva dell'espressione di EphA2 dopo 48 ore da una singola iniezione di siRNA-EphA2-DOPC e, al termine dei trattamenti, la crescita tumorale è risultata marcatamente inibita. È stato riportato che la crescita tumorale è significativamente ridotta anche quando il siRNA-EphA2-DOPC viene somministrato in combinazione con paclitaxel. Negli studi preclinici il farmaco è ben tollerato, e attualmente è in sperimentazione clinica di fase I dove viene somministrato per via endovenosa in pazienti con tumori solidi in stadio avanzato.

5. DCR-MYC.

DCR-MYC è una LNPs caricata con un siRNA in grado di inibire l'oncogene MYC. Tale LNP è stata sviluppata per essere utilizzata in varie tipologie di cancro incluso l'epatocarcinoma (HCC), alcuni tumori solidi, il linfoma e il mieloma multiplo. MYC è, infatti, un importante bersaglio oncogenico dato il suo ruolo nella sopravvivenza cellulare, nell'angiogenesi, nella formazione di metastasi e nello sviluppo della resistenza ai farmaci.

Per colpire MYC, nella formulazione del farmaco è stato utilizzato un siRNA substrato di Dicer (DsiRNA). I DsiRNA, RNA duplex più lunghi, sono substrati di Dicer che vengono successivamente trasformati in siRNA e sono caratterizzati da una maggiore potenza nell'elaborazione RNAi. (Dorè-Sabard, L. 2008; Ganesh, S. 2015)

I dati ottenuti dalle sperimentazioni precliniche riportano una buona risposta clinica e metabolica dei pazienti a vari livelli di dosaggio. (Tolcher, A.V. 2015)

6. ALN-VSP02.

Questo farmaco è costituito da un siRNA a doppio target: KSP e VEGF, entrambi sovraespressi in alcune tipologie di cancro e che contribuiscono alla proliferazione cellulare e all'angiogenesi. Gli studi di fase I sono stati condotti allo scopo di determinare la sicurezza, la tollerabilità, conoscere la farmacocinetica e la farmacodinamica di ALN-VSP02 in pazienti con tumori solidi avanzati con coinvolgimento epatico. I risultati ottenuti finora hanno dimostrato una buona tollerabilità del farmaco.

7. TKM-080301.

TKM-080301 è costituito da un siRNA mirato al gene per la polo-like chinasi (PLK1) caricato in una LNPs. PLK1 è una serin/treonin chinasi, altamente espressa in un'ampia gamma di tumori e svolge un ruolo chiave nella proliferazione delle cellule tumorali. (Wan, C. 2014)

Lo scopo terapeutico è il trattamento di pazienti con HCC, tumori gastrointestinali e neuroendocrini e il carcinoma adrenocorticale. (El Dika, I. 2019) Una singola somministrazione di TKM-080301 ha determinato un'inibizione di PLK1 in vivo che si è mantenuta per 7-10 giorni, non ha causato alcuna attività immunitaria e la tossicità è stata osservata solo nel fegato e nella milza senza effetti mielosoppressivi. (Semble, S.C. 2011) La sicurezza, la farmacocinetica e l'attività antitumorale di TKM-080301 sono state studiate preliminarmente in pazienti affetti da HCC nell'ambito di studi clinici di fase I/II e i risultati hanno dimostrato che la densità tumorale si è ridotta fino al 59% dopo la somministrazione del farmaco. (El Dika, I. 2019)

6.7 miRNA in sperimentazione clinica nel trattamento del cancro.

Anche i miRNA sono stati presi in considerazione come potenziali agenti terapeutici anticancro e attualmente esistono 3 sperimentazioni cliniche. (Tab. 3)

Tabella 3. miRNA in sperimentazione clinica nel trattamento del cancro. (Goknur, K. 2022)

Drug name	Therapeutic agent	Disease	Delivery system	Administration route	Company	Current status	Clinical trials identifier
MRX34	miR-34a mimic	Multiple solid tumors	LNPs-Liposomes	IV	Mirna Therapeutics, Inc.	Phase I (Terminated-2016) Phase I/II (Withdrawn-2016)	NCT01829971 NCT02862145
TargomiRs	miR-16 mimic	Malignant pleural mesothelioma and non-small cell lung cancer	EGFR-antibody targeted minicells	IV	EnGeneIC Limited	Phase I (Completed-2017)	NCT02369198
Cobomarsen	Anti-miR-155	T-cell leukemia/lymphoma	LNA-mediated	Subcutaneous injection or IV	miRagen Therapeutics, Inc.	Phase I (Completed-2020) Phase II (Terminated-2020) Phase II (Terminated-2020)	NCT02580552 NCT03713320 NCT03837457

1. MRX34 (MiR-34a mimic).

Il meccanismo di MRX34 è quello di ripristinare i livelli di miR-34 endogeni. È costituito da un liposoma di circa 120 nm la cui formulazione comprende lipidi anfoteri che hanno carica negativa a pH neutro o basico, mentre si caricano positivamente a bassi valori di pH. Questo permette al liposoma di caricarsi positivamente nei siti tumorali, visto il basso pH del microambiente tumorale, migliorando la sua capacità di adesione alle cellule tumorali. (Bader, A.G. 2012)

In seguito ad una singola somministrazione di MRX34, alcuni oncogeni vengono inibiti, mentre alcune vie di segnalazione mediate dal gene p53 sono ripristinate. (Daige, C.L. 2014)

Purtroppo, nonostante le elevatissime prestazioni terapeutiche dimostrate negli studi preclinici, gli studi di fase I sono stati interrotti a causa di gravi effetti avversi immunocorrelati. Tuttavia, uno studio recente ha riportato che il trattamento con MRX34 con premedicazione di desametasone dimostra attività clinica e un profilo di tossicità gestibile nella maggior parte dei pazienti. (Hong, D.S. 2020)

2. TargomiRs (miR-16-mimic).

TargomiRs è un farmaco *miRNA mimic* costituito da: (1) miR-16 mimic che agisce come soppressore tumorale in vari tipi di cancro, (2) EnGeneIC Delivery Vehicle (EDV) e (3) un ligando di targeting anticorpo bispecifico anti-EGFR. Gli EDV sono minicellule batteriche non viventi con un diametro di 400 nm che hanno la capacità di trasportare molecole

chemioterapiche, acidi nucleici e proteine. I geni Bcl-2 e CCND1, che promuovono la progressione del cancro, rappresentano possibili importanti bersagli di miR-16.

TargomiRs è stato utilizzato in uno studio di fase I, condotto su pazienti affetti da mesotelioma pleurico maligno. I risultati hanno dimostrato che esso è ben tollerato, si è evidenziata una certa efficacia antitumorale e un incoraggiante aumento della sopravvivenza.

3. Cobomarsen (anti-miR-155).

Cobomarsen o MRG-106 (miRagen Therapeutics, Inc.) è un locked nucleic acid (LNA) modificato che inibisce miR-155, un miRNA che si trova espresso a livelli elevati ed è correlato a una prognosi peggiore nei linfomi e nelle leucemie. Inoltre, svolge un ruolo importante nella progressione della micosi fungoide (MF), il tipo più comune di linfoma cutaneo a cellule T. (Seto, A.G. 2018) Negli studi preclinici l'iniezione endovenosa ha dimostrato che il volume del tumore si è ridotto, l'apoptosi è indotta e l'espressione dei bersagli diretti del miR-155 è stata *downregolata*. Inoltre, il farmaco non ha mostrato effetti tossici. (Anastasiadou, E. 2021) Gli studi clinici di fase I ne hanno valutato la sicurezza, la tollerabilità, la farmacocinetica e la potenziale efficacia in pazienti affetti da un sottogruppo di linfomi e leucemie, dimostrando che i trattamenti hanno consentito una riduzione della lesione tumorale accompagnata da un'inibizione del livello di miR-155, senza gravi effetti avversi. (Querfeld, C. 2018; Witten, L. 2020)

6.8. *circRNA come potenziali target e agenti terapeutici nel cancro.*

Visto il ruolo dei circRNA nel processo di sviluppo tumorale, essi si identificano come ovvi bersagli per la terapia antitumorale; in particolare i circRNA oncogenici possono essere selettivamente inibiti o degradati utilizzando la tecnologia antisense o la RNAi.

Un'opzione è quella di modificare i siti regolatori nel DNA che sono importanti per il back-splicing utilizzando i sistemi CRISPR-Cas-9. (Zheng, Q. 2016) Tuttavia, questo approccio porta spesso a eventi di splicing alternativo imprevedibili e soprattutto l'irreversibilità delle manipolazioni genetiche solleva problemi etici. Un approccio più accettato è quello di indirizzare il circRNA alla degradazione, e questo può essere facilmente realizzato con tecnologie antisense già utilizzate nel trattamento di malattie anche al di fuori dell'oncologia. (Crooke, S.T. 2021) Ad esempio, è possibile progettare degli ASO a singolo

filamento complementari a una sequenza unica nel circRNA bersaglio causandone la degradazione, in modo sito-specifico, da parte delle RNaseH intracellulari. (Ottesen, E.W. 2019) Un'altra possibilità è quella di indurre la degradazione del circRNA utilizzando un approccio basato sull' RNAi, che prevede la somministrazione citoplasmatica di piccoli RNA interferenti.

Tuttavia, ad oggi, la maggior parte degli studi sull'inibizione/degradazione dei circRNA sfruttando l'RNAi in modelli animali non ha avuto sviluppi clinici. Il principale ostacolo incontrato è l'inefficiente ingresso di RNA e/o proteine terapeutiche nel citosol delle cellule interessate e i potenziali effetti avversi derivanti dall'ingresso in cellule sane non maligne.

Anche i peptidi oncogeni generati dalla traduzione dei circRNA potrebbero essere un possibile bersaglio terapeutico, ad esempio utilizzando mAb, ma questa potenzialità deve ancora essere oggetto di studio.

Nuove terapie antitumorali potrebbero anche essere basate sull'aumento della funzione dei circRNA, attraverso la sovraespressione di circRNA naturali con attività di oncosoppressore o l'espressione di circRNA artificiali che contengono elementi soppressivi del tumore. Negli studi preclinici, l'approccio più comune è stato quello di somministrare circRNA contenenti siti ripetuti di legame con i miRNA, che possono quindi legarli bloccandone l'attività. (He, A.T. 2021) Come nel caso degli ASO, le sfide legate alla distribuzione dei circRNA nelle cellule rappresentano ancora oggi il principale ostacolo a una loro applicazione clinica.

Conclusioni.

L'avvento delle terapie a base di RNA ha rivoluzionato la terapia di molte malattie genetiche, come la distrofia muscolare di Duchenne o l'atrofia muscolare spinale per le quali lo sviluppo di nusinersen ed eteplirsen, entrambi ASO che agiscono rispettivamente mediante un meccanismo di *exon inclusion* ed *exon skipping* ha rappresentato un importante passo avanti. Anche alcune patologie derivanti da accumuli proteici come l'amiloidosi mediata dalla trans-tiretina, hanno trovato una possibilità di trattamento in queste tipologie di approccio. Queste terapie hanno avuto un impatto importante anche nel trattamento di patologie cardiovascolari come l'ipercolesterolemia familiare omozigote con l'approvazione di inclisiran: un siRNA che ha come bersaglio la proteina PCSK-9 responsabile della degradazione dei recettori per le LDL negli epatociti. Inoltre, le terapie a RNA si sono dimostrate estremamente importanti anche nella lotta di alcune malattie infettive, ad esempio, per lo sviluppo di vaccini a base di mRNA contro l'infezione da SARS-CoV-2.

L'uso dell'RNA si è dimostrato di enorme importanza anche nella lotta contro il cancro. Infatti, all'interno della cellula esistono diversi tipi di RNA e una loro disregolazione può avere effetti importanti sullo sviluppo della patologia.

I vaccini anticancro a RNA hanno la potenzialità di essere delle vere e proprie terapie "*ad personam*". Infatti, è possibile ad oggi isolare un antigene coinvolto nello sviluppo del cancro direttamente con una biopsia e formulare pertanto un vaccino altamente specifico per la tipologia di cancro di cui il paziente è affetto.

Un limite attuale di questa tecnologia sta nella difficoltà di ottenere preparati a livello industriale che permetterebbero una rapida diffusione oltre che un contenimento dei costi. Sarà obiettivo futuro della ricerca in questo campo individuare delle nuove strategie per la produzione di vaccini a mRNA a livello industriale.

I farmaci basati sugli RNA non codificanti hanno dimostrato anch'essi un grande potenziale per lo sviluppo di terapie anticancro mirate. La scoperta delle funzioni dei miRNA ha generato un grande entusiasmo nello sviluppo di terapie basate sugli stessi. La loro disregolazione contribuisce infatti alla patogenesi di diverse malattie e di tumori, modulando geni coinvolti in processi cellulari critici, tra cui la proliferazione cellulare, la

differenziazione, l'apoptosi, l'angiogenesi, le metastasi, la resistenza ai farmaci e la tumorigenesi. I miRNA (miRNA mimic, anti-miRNA/ antagomir) e i siRNA possono inibire l'espressione di qualsiasi gene/mRNA correlato al cancro con un'elevata specificità attraverso il meccanismo RNAi rappresentando così un notevole strumento terapeutico per le terapie mirate e la medicina di precisione. Le terapie a base di siRNA e miRNA sono entrate nella fase di sperimentazione clinica e recentemente la FDA ha approvato tre nuovi farmaci, indicando così l'inizio di una nuova era di terapie mirate.

Il successo delle applicazioni cliniche dei miRNA e dei siRNA dipende anche dall'adozione di strategie di nano-delivery sicure ed efficaci in grado di colpire in modo preferenziale le cellule tumorali o il microambiente tumorale. A questo scopo, sono stati sviluppati approcci promettenti basati su nano-delivery/nanoparticelle che utilizzano una grande varietà di molecole per la somministrazione sistemica e per una somministrazione mirata al tumore con effetti collaterali ridotti.

L'ultima frontiera delle terapie a RNA è l'utilizzo del sistema CRISPR-Cas-9 per l'editing genetico, il quale ha suscitato un grande interesse per le sue possibili applicazioni. È importante sottolineare, tuttavia, come le modificazioni genetiche attuate da questa tecnologia siano permanenti. Pertanto, su un possibile utilizzo in clinica di questo approccio si apre un ampio dibattito anche di tipo etico che riguarda la tipologia cellulare alla quale può essere applicato.

Infatti, l'applicazione dell'editing genetico è considerata etica nelle cellule somatiche in quanto la modificazione interessa solo il singolo individuo, mentre nelle cellule germinali diventa ereditabile e i suoi effetti si manifesterebbero, quindi, non solo sul singolo individuo ma anche alle future generazioni.

Bibliografia.

1. A.G. Bader, miR-34—a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front. Genet.* **3**, 120 (2012).
2. A.G. Seto, X. Beatty, J.M. Lynch, M. Hermreck, M. Tetzlaff, M. Duvic, A.L. Jackson, Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **183**, 428–444 (2018).
3. A.W. Tolcher, K.P. Papadopoulos, A. Patnaik, D.W. Rasco, D. Martinez, D.L. Wood, B. Fielman, M. Sharma, L.A. Janisch, B.D. Brown, Safety and activity of DCR-MYC, a first-in-class Dicer-substrate small interfering RNA (DsiRNA) targeting MYC, in a phase I study in patients with advanced solid tumors. *Am. Soc. Clin. Oncol.* (2015).
4. Adachi T, Nakamura Y. Aptamers: a review of their chemical properties and modifications for therapeutic application. *Molecules.* **24**, 4229 (2019).
5. Akinc, A.; Thomas, M.; Klibanov, A.M.; Langer, R. Exploring Polyethylenimine-Mediated DNA Transfection and the Proton Sponge Hypothesis. *J. Gene Med.* **7**, 657–663 (2005).
6. Akira, S.; Takeda, K. Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
7. Alvarez-Erviti, L. et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* **29**, 341–345 (2011).
8. Bajan S, Hutvagner G. RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells.* **9**, (1):137 (2020).
9. Bajan, S., & Hutvagner, G. RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells*, **9**(1), 137 (2020).
10. Balwani, M. et al. Phase 3 trial of RNAi therapeutic givosiran for acute intermittent porphyria. *N. Engl. J. Med.* **382**, 2289–2301 (2020).
11. Barbieri, I., & Kouzarides, T. Role of RNA modifications in cancer. *Nature Reviews. Cancer.* **20**, 303–322 (2020).
12. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* **116**, 281–297 (2004).
13. Baumann, V. & Winkler, J. miRNA-based therapies: strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents. *Future Med. Chem.* **6**, 1967–1984 (2014).
14. Beck, A.; Goetsch, L.; Dumontet, C.; Corvaia, N. Strategies and Challenges for the next Generation of Antibody-Drug Conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 315–337 (2017).
15. Beissert, T. et al. A trans-amplifying RNA vaccine strategy for induction of potent protective immunity. *Mol. Ther.* **28**, 119–128 (2020).

16. Bennett CF, Swayze EE. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **50**, 259-293 (2010).
17. Berraondo, P. et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *Br. J. Cancer.* **120**, 6–15 (2019).
18. Blass, E. & Ott, P. A. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **18**, 215–229 (2021).
19. Bloom, K., van den Berg, F. & Arbuthnot, P. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene Ther.* **28**, 117–129 (2021).
20. Bolcato-Bellemin, A.-L.; Bonnet, M.-E.; Creusat, G.; Erbacher, P.; Behr, J.-P. Sticky Overhangs Enhance siRNA-Mediated Gene Silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 16050–16055 (2007)
21. Bonneau, E.; Neveu, B.; Kostantin, E.; Tsongalis, G.J.; De Guire, V. How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *Ejifcc.* **30**, 114–127 (2019).
22. Briukhovetska, D. et al. Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **21**, 481–499 (2021).
23. C. Querfeld, F.M. Foss, Y.H. Kim, L. Pinter-Brown, B.M. William, P. Porcu, T. Pacheco, B.M. Haverkos, J. DeSimone, J. Guitart, Phase 1 trial of cobomarsen, an inhibitor of Mir-155, in cutaneous T cell lymphoma. *Blood.* **132**, 2903 (2018).
24. C. Wan, T. Allen, P. Cullis, Lipid nanoparticle delivery systems for siRNA based therapeutics. *Drug Delivery and Translational Res.* **4**, 74–83 (2014).
25. C.L. Daige, J.F. Wiggins, L. Priddy, T. Nelligan-Davis, J. Zhao, D. Brown, Systemic delivery of a miR34a mimic as a potential therapeutic for liver cancer. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 2352–2360 (2014).
26. C.Y. Chen, P. Sarnow, Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science.* **268**, 415–417 (1995).
27. Chandela, A.; Ueno, Y. Systemic Delivery of Small Interfering RNA Therapeutics: Obstacles and Advances. *Rev. Agric. Sci.* **7**, 10–28 (2019)
28. Charpentier E, Doudna JA. Biotechnology: rewriting a genome. *Nature.* **495**, 50–51. (2013).
29. Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov.* **20**, 817–838 (2021).
30. Chen Q, Zhang Y, Yin H. Recent advances in chemical modifications of guide RNA, mRNA and donor template for CRISPR-mediated genome editing. *Adv Drug Deliv Rev.* **168**, 246–258 (2021).
31. Cheng, Z., Yu, C., Cui, S., Wang, H., Jin, H., Wang, C., ... Qin, W. circTP63 functions as a ceRNA to promote lung squamous cell carcinoma progression by upregulating FOXM1. *Nature Communications.* **10**, 3200 (2019).

32. Conn, S. J., Pillman, K. A., Toubia, J., Conn, V. M., Salmanidis, M., Phillips, C. A., ... Goodall, G. J. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell*. **160**, 1125–1134 (2015).
33. Cortez, M. A. et al. Role of miRNAs in immune responses and immunotherapy in cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. **58**, 244–253 (2019).
34. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat. Med.* **21**, 121–131 (2015).
35. Crooke ST, Baker BF, Crooke RM, Liang XH. Antisense technology: an overview and prospectus. *Nat Rev Drug Discov*. **20**, 427–453 (2021).
36. Crooke ST, Witztum JL, Bennett CF, Baker BF. RNA-targeted therapeutics. *Cell Metab*. **27**, 714–739 (2018).
37. Crooke, S. T., Baker, B. F., Crooke, R. M. & Liang, X. H. Antisense technology: an overview and prospectus. *Nat. Rev. Drug Discov*. **20**, 427–453 (2021).
38. D.S. Hong, Y.-K. Kang, M. Borad, J. Sachdev, S. Ejadi, H.Y. Lim, A.J. Brenner, K. Park, J.-L. Lee, T.-Y. Kim, Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours, *Br. J. Cancer*. **122**, 1630–1637 (2020).
39. Dalpke, A. & Helm, M. RNA mediated Toll-like receptor stimulation in health and disease. *RNA Biol*. **9**, 828–842 (2012).
40. Dassie, J.P.; Liu, X.Y.; Thomas, G.S.; Whitaker, R.M.; Thiel, K.W.; Stockdale, K.R.; Meyerholz, D.K.; McCaffrey, A.P.; McNamara, J.O.; Giangrande, P.H. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat. Biotechnol*. **27**, 839–846 (2009).
41. De Los Santos, M. C., Dragomir, M. P. & Calin, G. A. The role of exosomal long non-coding RNAs in cancer drug resistance. *Cancer Drug Resist*. **2**, 1178–1192 (2019).
42. Delaunay, S., & Frye, M. RNA modifications regulating cell fate in cancer. *Nature Cell Biology*. **21**, 552–559 (2019).
43. Dominguez AA, Lim WA, Qi LS. Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **17**, 5–15 (2016).
44. Doudna JA, Gersbach CA. Genome editing: the end of the beginning. *Genome Biol*. **16**, 292 (2015).
45. Dovgan, I.; Koniev, O.; Kolodych, S.; Wagner, A. Antibody–Oligonucleotide Conjugates as Therapeutic, Imaging, and Detection Agents. *Bioconj. Chem*. **30**, 2483–2501 (2019).
46. Dugal-Tessier J, Thirumalairajan S, Jain N. Antibody-Oligonucleotide Conjugates: A Twist to Antibody-Drug Conjugates. *J Clin Med*. **10**(4):838, (2021).
47. E. Anastasiadou, A.G. Seto, X. Beatty, M. Hermreck, M.-E. Gilles, D. Stroopinsky, L.C. Pinter-Brown, L. Pestano, C. Marchese, D. Avigan. Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, slows DLBCL tumor cell growth in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res*. **27**, 1139–1149 (2021).

48. E.Z. Khvalevsky, R. Gabai, I.H. Rachmut, E. Horwitz, Z. Brunschwig, A. Orbach, A. Shemi, T. Golan, A.J. Domb, E. Yavin, Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 20723–20728 (2013).
49. Eckstein F. Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* **24**, 374–87 (2014).
50. Eulberg D, Klussmann S. Spiegelmers: biostable aptamers. *Chembiochem.* **4**, 979-983 (2003).
51. Eulberg, D., & Klussmann, S. Spiegelmers: biostable aptamers. *Chembiochem: a European journal of chemical biology.* **4**, 979–983 (2003).
52. Ewe, A. et al. Optimized polyethylenimine (PEI)-based nanoparticles for siRNA delivery, analyzed in vitro and in an ex vivo tumor tissue slice culture model. *Drug Deliv. Transl. Res.* **7**, 206–216 (2017).
53. Falese J, Donlic A, Hargrove A. Targeting RNA with small molecules: from fundamental principles towards the clinic. *Chem Soc Rev.* **50**, 2224–2243 (2021).
54. Farooqi, A.A.; Fayyaz, S.; Shatynska-Mytsyk, I.; Javed, Z.; Jabeen, S.; Yaylim, I.; Gasparri, M.L.; Panici, P.B. Is miR-34a a Well-equipped Swordsman to Conquer Temple of Molecular Oncology? *Chem. Biol. Drug Des.* **87**, 321–334 (2016).
55. Fuller, D. H. & Berglund, P. Amplifying RNA vaccine development. *N. Engl. J. Med.* **382**, 2469–2471 (2020).
56. Grimm, D.; Wang, L.; Lee, J.S.; Schürmann, N.; Gu, S.; Börner, K.; Storm, T.A.; Kay, M.A. Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver. *J. Clin. Investig.* **120**, 3106–3119 (2010),
57. Guo, J. U., Agarwal, V., Guo, H. & Bartel, D. P. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biol.* **15**, 409 (2014).
58. H. Abe, et al., Synthetic nanocircular RNA for controlling of gene expression. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)* **53**, 65–66 (2009).
59. Harada-Shiba, M. et al. Polyion complex micelles as vectors in gene therapy — pharmacokinetics and in vivo gene transfer. *Gene Ther.* **9**, 407–414 (2002).
60. Harries, L.W. RNA biology provides new therapeutic targets for human disease. *Front. Genet.* **10**, 1–12 (2019).
61. Hashimoto, M. et al. PD-1 combination therapy with IL-2 modifies CD8+ T cell exhaustion program. *Nature.* **610**, 173–181 (2022).
62. He, A. T., Liu, J., Li, F. & Yang, B. B. Targeting circular RNAs as a therapeutic approach: current strategies and challenges. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **6**, 185 (2021).
63. He, Q., Gao, H., Tan, D., Zhang, H. & Wang, J. Z. mRNA cancer vaccines: advances, trends and challenges. *Acta Pharm. Sin.* **12**, 2969–2989 (2022).
64. Hoffmann S, Hoos J, Klussmann S, Vonhoff S. RNA aptamers and spiegelmers: synthesis, purification, and post-synthetic PEG conjugation. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.* 2011; Chapter 4: Unit 4.46.1–30.

65. I. El Dika, H.Y. Lim, W.P. Yong, C.C. Lin, J.H. Yoon, M. Modiano, B. Freilich, H.J. Choi, T.Y. Chao, R.K. Kelley, An open-label, multicenter, phase I, dose escalation study with phase II expansion cohort to determine the safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of intravenous TKM080301 in subjects with advanced hepatocellular carcinoma. *Oncologist*. **24**, 747 (2019).
66. I. Legnini, et al., Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in Myogenesis. *Mol. Cell*. **66**, 22–37 (2017).
67. Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *J Bacteriol*. **200**, e00580-17 (2018).
68. J. Szebeni, F. Muggia, A. Gabizon, Y. Barenholz, Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention, *Adv. Drug Deliv*. **63**, 1020–1030 (2011).
69. J. Szebeni, Mechanism of nanoparticle-induced hypersensitivity in pigs: complement or not complement? *Drug Discov. Today*. **23**, 487–492 (2018).
70. J.D. Heidel, J.-Y.-C. Liu, Y. Yen, B. Zhou, B.S. Heale, J.J. Rossi, D.W. Bartlett, M.E. Davis, Potent siRNA inhibitors of ribonucleotide reductase subunit RRM2 reduce cell proliferation in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res*. **13**, 2207–2215 (2007).
71. Jackson, A.L.; Burchard, J.; Schelter, J.; Chau, B.N.; Cleary, M.; Lim, L.; Linsley, P.S. Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA*. **12**, 1179–1187(2006).
72. Jazbutyte, V. Specific, Robust, Reproducible: The Hunt for the Ideal Biomarker. *J. Clin. Exp. Cardiol*. **01**, 9880 (2012).
73. Jiang, D. et al. Efficient renal clearance of DNA tetrahedron nanoparticles enables quantitative evaluation of kidney function. *Nano Res*. **12**, 637–642 (2019).
74. Jiang, Fuguo, and Jennifer A Doudna. “CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms.” *Ann. Rev. Biophys*. **46**,505-529 (2017).
75. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dualRNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. **337**, 816–821 (2012).
76. Kamerkar, S. et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*. **546**, 498–503 (2017).
77. Kara, Goknur et al. “RNAi-based therapeutics and tumor targeted delivery in cancer.” *Adv. Drug Deliv. Rev*. **182**, 114113 (2022).
78. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol. Ther*. **16**, 1833–1840 (2018).
79. Katti, A., Diaz, B. J., Caragine, C. M., Sanjana, N. E. & Dow, L. E. CRISPR in cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer*. **22**, 259–279 (2022).
80. Kedmi, R. et al. A modular platform for targeted RNAi therapeutics. *Nat. Nanotechnol*. **13**, 214–219 (2018).

81. Kim, Y.K.; Yeo, J.; Kim, B.; Ha, M.; Kim, V.N. Short Structured RNAs with Low GC Content Are Selectively Lost during Extraction from a Small Number of Cells. *Mol. Cell.* **46**, 893–895 (2012).
82. Kleinman, M. E. et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature.* **452**, 591–597 (2008).
83. Kristensen LS, Jakobsen T, Hager H, Kjems J. The emerging roles of circRNAs in cancer and oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* **19**, 188-206 (2022).
84. Kwon H, Kim M, Seo Y, Moon YS, Lee HJ, Lee K, et al. Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. *Biomaterials.* **156**,172–193 (2018).
85. Kwon, S., Kwon, M., Im, S., Lee, K. & Lee, H. mRNA vaccines: the most recent clinical applications of synthetic mRNA. *Arch. Pharm. Res.* **45**, 245–262 (2022).
86. L. Doré-Savard, G. Roussy, M.-A. Dansereau, M.A. Collingwood, K.A. Lennox, S. D. Rose, N. Beaudet, M.A. Behlke, P. Sarret, Central delivery of Dicer-substrate siRNA: a direct application for pain research. *Mol. Ther.* **16**, 1331– 1339 (2008).
87. L. Witten, F.J. Slack, miR-155 as a novel clinical target for hematological malignancies. *Carcinogenesis.* **41**, 2–7 (2020).
88. Lang, F., Schrors, B., Lower, M., Tureci, O. & Sahin, U. Identification of neoantigens for individualized therapeutic cancer vaccines. *Nat. Rev. Drug Discov.* **21**, 261–282 (2022).
89. Lee, H. et al. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 389–393 (2012).
90. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 181–211 (2010).
91. Lim, L.P.; Lau, N.C.; Garrett-engele, P.; Grimson, A. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* **292**, 288–292 (2005).
92. Lindsay, K. E. et al. Visualization of early events in mRNA vaccine delivery in non-human primates via PET-CT and near-infrared imaging. *Nat. Biomed. Eng.* **3**, 371–380 (2019).
93. Liu, C., Shi, Q., Huang, X., Koo, S., Kong, N., & Tao, W. mRNA-based cancer therapeutics. *Nature reviews. Cancer.* **23**, 526–543 (2023).
94. Liu, J. et al. Efficient delivery of nuclease proteins for genome editing in human stem cells and primary cells. *Nat. Protoc.* **10**, 1842–1859 (2015).
95. Liu, X., Zhang, Y., Zhou, S., Dain, L., Mei, L., & Zhu, G. Circular RNA: An emerging frontier in RNA therapeutic targets, RNA therapeutics, and mRNA vaccines. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, **348**, 84–94 (2022).
96. Lundstrom, K. Self-amplifying RNA viruses as RNA vaccines. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 5130 (2020).

97. M.E. Davis, J.E. Zuckerman, C.H.J. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C.A. Alabi, Y. Yen, J.D. Heidel, A. Ribas, Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*. **464**, 1067– 1070 (2010).
98. M.E. Filbin, J.S. Kieft, Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 267–276 (2009).
99. M.S. Duxbury, H. Ito, M.J. Zinner, S.W. Ashley, E.E. Whang, EphA2: a determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene*. **23**, 1448–1456 (2004).
100. MacDiarmid, J.A.; Brahmabhatt, H. Minicells: Versatile vectors for targeted drug or si/shRNA cancer therapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 909–916 (2011).
101. McNamara, J.O.; Andrechek, E.R.; Wang, Y.; Viles, K.D.; Rempel, R.E.; Gilboa, E.; Sullenger, B.A.; Giangrande, P.H. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1005–1015 (2006).
102. Memi F, Ntokou A, Papangeli I. CRISPR/Cas9 gene-editing: Research technologies, clinical applications and ethical considerations. *Semin Perinatol.* **42**, 487-500 (2018).
103. Metias, S.M.; Lianidou, E.; Yousef, G.M. MicroRNAs in clinical oncology: At the crossroads between promises and problems. *J. Clin. Pathol.* **62**, 771–776 (2009).
104. Mitchell, D. A. et al. Tetanus toxoid and CCL3 improve dendritic cell vaccines in mice and glioblastoma patients. *Nature*. **519**, 366–369 (2015).
105. Mokhtarzadeh A, Vahidnezhad H, Youssefian L, Mosafer J, Baradaran B, Uitto J. Applications of spherical nucleic acid nanoparticles as delivery systems. *Trends Mol Med.* **25**, 1066–10079 (2019).
106. Mulhbachter J, St-Pierre P, Lafontaine DA. Therapeutic applications of ribozymes and riboswitches. *Curr Opin Pharm.* **10**, 551–556 (2010).
107. N.M. Belliveau, J. Huft, P.J. Lin, S. Chen, A.K. Leung, T.J. Leaver, A.W. Wild, J.B. Lee, R.J. Taylor, Y.K. Tam, C.L. Hansen, P.R. Cullis. Microfluidic synthesis of highly potent limit-size lipid nanoparticles for in vivo delivery of siRNA. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* **1**, e37 (2012).
108. Nair, J. K. et al. Multivalent N-acetylgalactosamineconjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 16958–16961 (2014).
109. Ottesen, E. W., Luo, D., Seo, J., Singh, N. N. & Singh, R. N. Human survival motor neuron genes generate a vast repertoire of circular RNAs. *Nucleic Acids Res.* **47**, 2884–2905 (2019).
110. P. Obi, Y.G. Chen, The design and synthesis of circular RNAs. *Methods.* **196**, 85–103 (2021).
111. P.H. Thaker, M. Deavers, J. Celestino, A. Thornton, M.S. Fletcher, C.N. Landen, M.S. Kinch, P.A. Kiener, A.K. Sood, EphA2 expression is associated with aggressive features in ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 5145– 5150 (2004).

112. Paunovska, K., Loughrey, D., & Dahlman, J. E. . Drug delivery systems for RNA therapeutics. *Nature reviews. Genetics.* **23**, 265–280 (2022).
113. Prakash, T. P. et al. Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice. *Nucleic Acids Res.* **42**, 8796–8807 (2014).
114. R. Fraley, S. Subramani, P. Berg, D. Papahadjopoulos, Introduction of liposomeencapsulated SV40 DNA into cells. *J. Biol. Chem.* **255**, 10431–10435 (1980).
115. R.T. Fraley, C.S. Fornari, S. Kaplan, Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: potential for gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 3348-3352 (1979).
116. Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* **19**, 673-694 (2020).
117. S. Ganesh, B. Ying, M. Koser, W. Cyr, G. Chopda, H. Dudek, C. Lai, W. Wang, B. Brown, M.T. Abrams, Systemic delivery of CTNNB1 dicer-substrate siRNAs (DsiRNAs) leads to efficient oncogene silencing in diverse tumor types of extra hepatic origin, *American Association for Cancer Research (AACR)* (2015).
118. S. Petkovic, S. Muller, Synthesis and engineering of circular RNAs. *Methods Mol. Biol.* **1724**, 167–180 (2018).
119. S.C. Semple, A.D. Judge, M. Robbins, S. Klimuk, M. Eisenhardt, E. Crosley, A. Leung, R. Kwok, E. Ambegia, K. McClintock. Preclinical characterization of TKM-080301, a lipid nanoparticle formulation of a small interfering RNA directed against polo-like kinase 1, *American Association for Cancer Research (AACR)* (2011).
120. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 229–257(2008).
121. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* **32**, 347–355 (2014).
122. Saraswar, P. *et al.* DNA as therapeutics; an update. *Indian J. Pharm. Sci.* **71**, 488-498 (2009).
123. Setten RL, Rossi JJ, Han SP. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* **18**,421–46 (2019).
124. Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR–Cas9. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 299–311 (2015).
125. Sherr, C. J. Principles of tumor suppression. *Cell.* **116**, 235–246 (2004).
126. Shi H, He X, Cui W, Wang K, Deng K, Li D, et al. Locked nucleic acid/DNA chimeric aptamer probe for tumor diagnosis with improved serum stability and extended imaging window in vivo. *Anal Chim Acta.* **812**,138–144. (2014).
127. Simsek, C., Esin, E. & Yalcin, S. Metronomic chemotherapy: a systematic review of the literature and clinical experience. *J. Oncol.* **2019**, 5483791 (2019).

128. Sioud, M. Single-stranded small interfering RNA are more immunostimulatory than their double-stranded counterparts: a central role for 2'-hydroxyl uridines in immune responses. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1222–1230 (2006).
129. Smolle, M. A., Calin, H. N., Pichler, M. & Calin, G. A. Noncoding RNAs and immune checkpoints-clinical implications as cancer therapeutics. *FEBS J.* **284**, 1952–1966 (2017).
130. Song, E.; Zhu, P.; Lee, S.-K.; Chowdhury, D.; Kussman, S.; Dykxhoorn, D.M.; Feng, Y.; Palliser, D.; Weiner, D.B.; Shankar, P.; et al. Antibody Mediated *in Vivo* Delivery of Small Interfering RNAs via Cell-Surface Receptors. *Nat. Biotechnol.* **23**, 709–717 (2005).
131. Soussi, T., Ishioka, C., Claustres, M. & Beroud, C. Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience. *Nat. Rev. Cancer.* **6**, 83–90 (2006).
132. Sun, H.; Zhang, Y.; Wang, G.; Yang, W.; Xu, Y. mRNA-Based Therapeutics in Cancer Treatment. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 622.
133. Tsai SQ, Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR–Cas9 nucleases. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 300–312 (2016).
134. Veiga, N. et al. Cell specific delivery of modified mRNA expressing therapeutic proteins to leukocytes. *Nat. Commun.* **9**, 4493 (2018).
135. Vo, J. N. *et al.* The landscape of circular RNA in cancer. *Cell.* **176**, 869–881 (2019).
136. W.V. Rodriguez, J.J. Wheeler, S.K. Klimuk, C.N. Kitson, M.J. Hope, Transbilayer movement and net flux of cholesterol and cholesterol sulfate between liposomal membranes. *Biochemistry.* **34**, 6208–6217 (1995).
137. Wang H, Meng Q, Qian J, Li M, Gu C, Yang Y. Review: RNA-based diagnostic markers discovery and therapeutic targets development in cancer. *Pharmacol Ther.* **234**,108123 (2022).
138. Winkle, M., El-Daly, S. M., Fabbri, M., & Calin, G. A. Noncoding RNA therapeutics - challenges and potential solutions. *Nature Rev. Drug Discov.* **20**, 629–651 (2021).
139. Witzigmann D, Kulkarni JA, Leung J, Chen S, Cullis PR, van der Meel R. Lipid nanoparticle technology for therapeutic gene regulation in the liver. *Adv Drug Deliv Rev.* **159**, 344-363 (2020).
140. X. Cheng, R.J. Lee, The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery, *Adv. Drug Deliv.* **99**, 129–137 (2016).
141. X. Liu, et al., Synthetic circular RNA functions as a miR-21 sponge to suppress gastric carcinoma cell proliferation. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* **13**, 312–321 (2018).
142. Xu, L., Zhang, H. & Wu, Y. Dendrimer advances for the central nervous system delivery of therapeutics. *ACS Chem. Neurosci.* **5**, 2–13 (2014).
143. Y. Zhang, et al., The biogenesis of nascent circular RNAs. *Cell Rep.* **15**, 611–624 (2016).

144. Yang, J., Zhang, X., Chen, X., Wang, L. & Yang, G. Exosome mediated delivery of miR-124 promotes neurogenesis after ischemia. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. **7**, 278–287 (2017).
145. Yang, Q., Du, W. W., Wu, N., Yang, W., Awan, F. M., Fang, L., ... Yang, B. B. A circular RNA promotes tumorigenesis by inducing c-myc nuclear translocation. *Cell Death and Differentiation* **24**, 1609–1620 (2017).
146. Yu, C.Y., Kuo, H.C. The emerging roles and functions of circular RNAs and their generation. *J. Biomed. Sci.* **26**, 29 (2019).
147. Zheng, Q. et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. *Nat. Commun.* **7**, 11215 (2016).
148. Zhong, H., Chan, G., Hu, Y., Hu, H. & Ouyang, D. A comprehensive map of FDA-approved pharmaceutical products. *Pharmaceutics* **10**, 263 (2018).