



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Laurea Triennale

Scienze Biologiche L-13

siRNA: UN NUOVO APPROCCIO PER LA TERAPIA DEL CANCRO

siRNA: AN INNOVATIVE APPROACH FOR CANCER THERAPY

Tesi di laurea di:

Coscia Elisabetta Pia

Matricola 1098982

Docente referente:

Chiar.ma Prof.ssa

Ortore Maria Grazia

Sessione: ottobre 2024

Anno accademico: 2023/2024



Introduzione

Il **cancro** continua ad essere una grande sfida per la medicina e la ricerca contemporanea ed è una delle principali cause di mortalità nel mondo.

L'oncogenesi è lo sviluppo di un tessuto tumorale che si verifica attraverso una mutazione su una prima cellula sana e che darà vita ad un tessuto la cui crescita si propaga in modo indefinito

Cause principali: circa **400 sostanze cancerogene** o possibilmente cancerogene (es. l'amianto, il fumo di sigaretta); fattori genetici (mutazioni ereditarie)

Possibili rimedi: prevenzione

Si è reso necessario lo sviluppo di **terapie** più mirate, capaci di agire solamente sulle cellule cancerogene, rendendo così minimi i danni alle cellule sane e di conseguenza migliorando l'esito clinico dei pazienti.

Terapie a base di siRNA

RNAi: meccanismo biologico regolatorio post-trascrizionale rinvenuto nelle cellule eucariotiche che utilizzano dsRNA come una via diretta per il controllo dell'espressione genica.

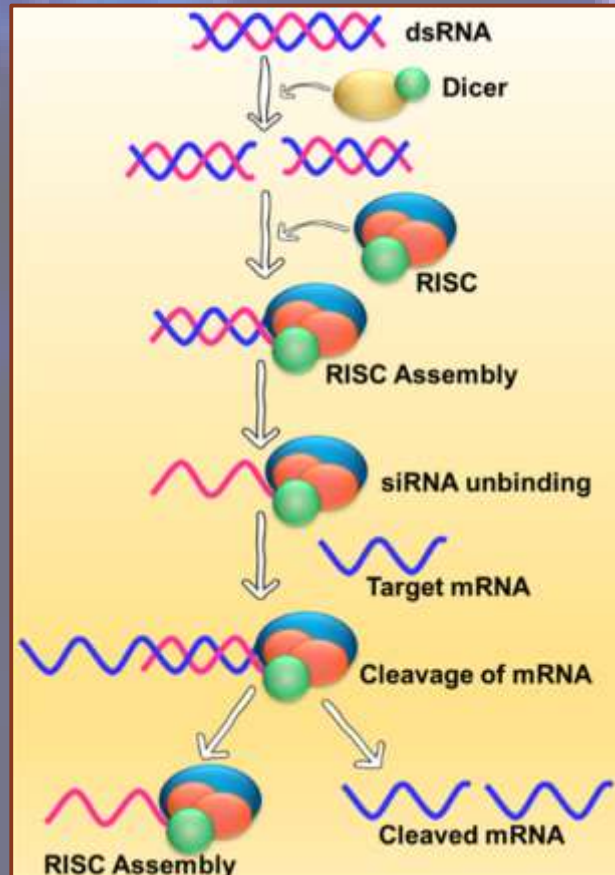
trascrizione → mRNA → traduzione

proteine

target delle
terapie a base di siRNA

4 fasi:

1. Dicer taglia RNA a doppio filamento in piccoli siRNA (20-25 nt);
2. siRNA introdotto nel citoplasma, caricato nel RISC;
3. siRNA dissociato in due filamenti, secondo filamento guida il complesso verso mRNA complementare;
4. Degradazione mRNA complementare al siRNA



siRNA nudo non riesce ad entrare tramite la via di diffusione passiva a causa della carica negativa e del peso molecolare (13kDa)

via alternativa: trasporto endovenoso

Aspetti importanti:

- Stabilità del farmaco in ambiente ematico;
- rilascio molecole terapeutiche nel tessuto tumorale;
- siRNA rilasciato nel citoplasma per indurre silenziamento genico

siRNA trasportati da nanoparticelle entrano per endocitosi, processo che tende a limitarne l'efficacia. Una volta nella cellula, deve superare la barriera dell'endosoma per raggiungere il citoplasma, ma solo una piccola parte della molecola riesce a penetrare, la maggior parte viene degradata.

OSTACOLI:

Clearance renale e sistema reticoloendoteliale (RES).

siRNA penetra nel tessuto target dopo aver attraversato il RES, percorso bloccato da barriere nella matrice extracellulare e nello strato delle cellule endoteliali.

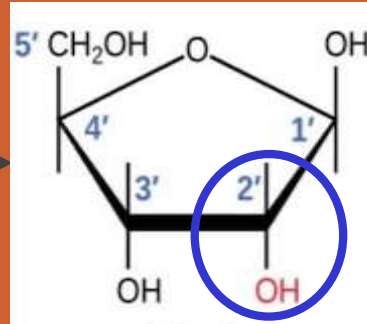
La stabilità in vivo dei siRNA

siRNA trasfettati sono sensibili all'idrolisi in ambiente cellulare a causa di enzimi presenti nel siero

matrice endoteliale contiene pori (4,5 e 25 nm), quelli più piccoli permettono passaggio di particelle ~4nm.

Solo molecole nude di siRNA attraverseranno cellule endoteliali

Il RES degrada i siRNA



→ acquisizione di PEG = riduzione interazioni con fagociti

Effetti off-target

interpretazione sbagliata degli impatti fenotipici nel silenziamento genico

- nella cellula, il processo di RNAi causa sovraregolazione dei geni controllati dai miRNA

→ uso di siRNA chimicamente modificati e più potenti

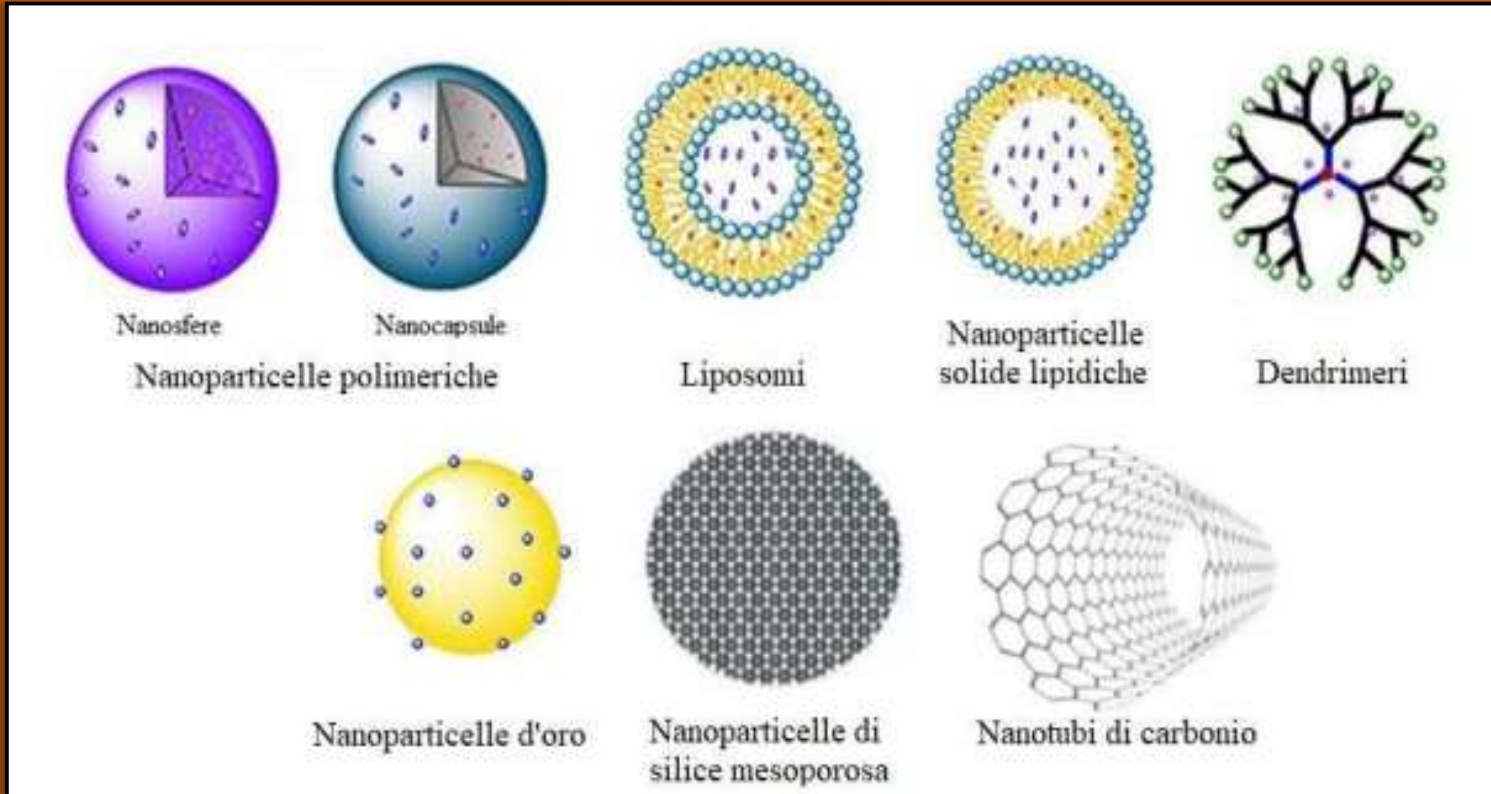
- silenziamento mediato dal filamento passeggero causa la sottoregolazione dei geni bersaglio omologhi al filamento passeggero

→ utilizzare estremità smussate: asi-RNA, si-siRNA, ai-RNA o ss-siRNA

- il silenziamento innescato dalla regione seed causa la sottoregolazione di geni parzialmente complementari

→ uso di regioni seed arricchite di basi AU

La stabilità delle molecole di siRNA nel siero può essere migliorata somministrando **siRNA con nanoparticelle**



↓
mirano a **colpire il tessuto tumorale** senza compromettere gli organi circostanti

↓
Ruolo principale:
proteggere dalla degradazione da parte delle RNAsi, accelerare l'assorbimento cellulare, promuovere il silenziamento genico ed emivita del siRNA più lunga nel sangue

Le nanoparticelle utilizzate:

- nanoparticelle lipidiche: **liposomi**, nanoparticelle solide lipidiche e nanoparticelle magnetiche
- nanotubi di carbonio
- nanoparticelle polimeriche
- dendrimeri
- nanoparticelle a base di metallo
- nanoparticelle di silice mesoporosa

→ sono le più utilizzate

LIPOSOMI

- ❖ vescicole fosfolipidiche (25nm-1 μ di diametro), un doppio strato fosfolipidico chiuso
- ❖ nucleo acquoso che permette di utilizzarlo per il trasporto dei farmaci
- ❖ funzioni: proteggere farmaco dalla degradazione, consegna del siRNA con ligandi ed accumulo nei tessuti tumorali

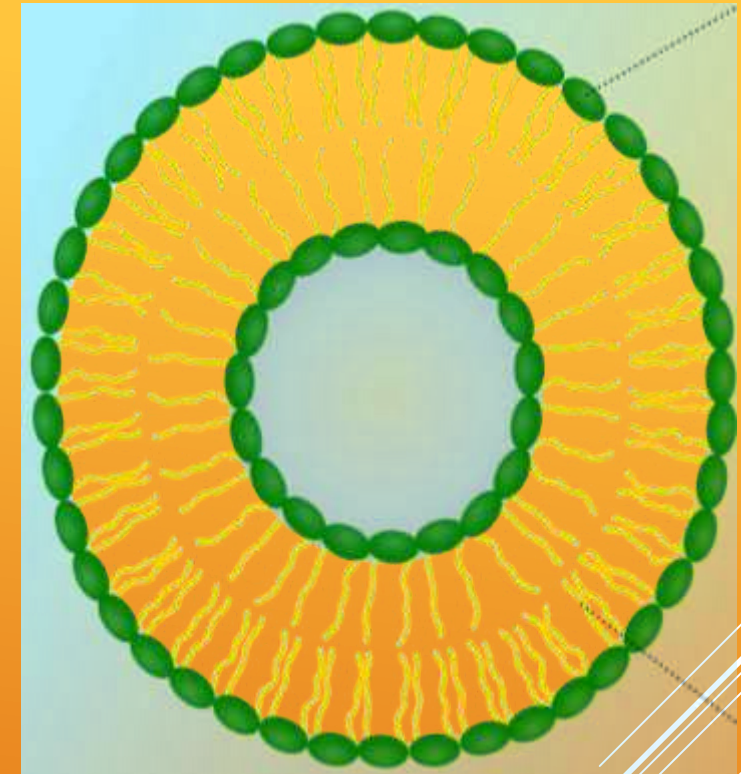
La formazione di nanoparticelle tramite interazione elettrostatica tra lipidi cationici e siRNA porta a proficua trasfezione in vitro, la consegna all'interno delle cellule è più immediata

I lipidi cationici possono facilitare il rilascio del siRNA nel citoplasma attraverso la **rottura degli endosomi**

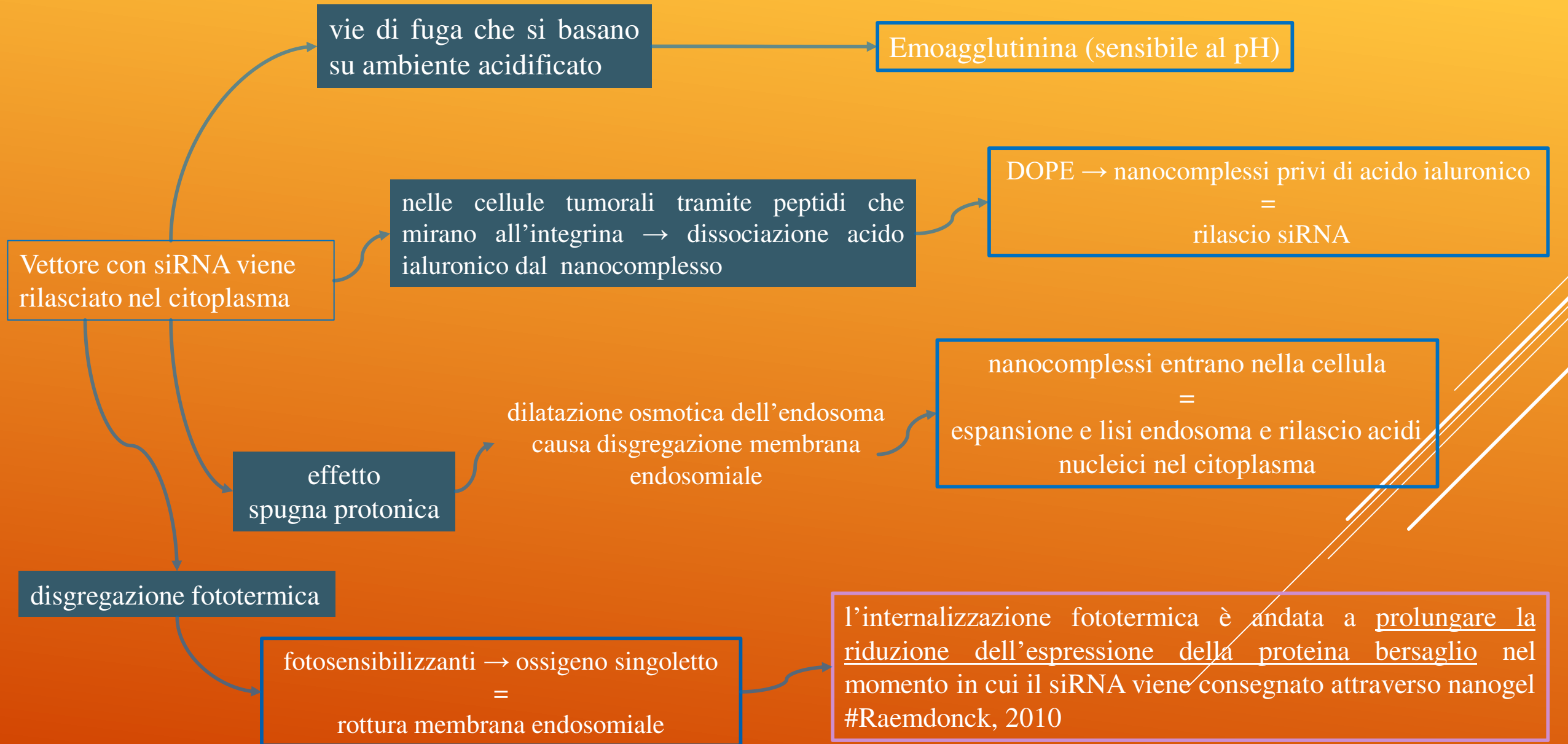
2 studi:

delivery del siRNA anti-STAT3 in cellule di melanoma attraverso liposomi cationici ingegnerizzati con peptide RGD
#Khabazian, 2022

utilizzo dei lipoplex siMDR/F aumenta l'efficacia della polichemioterapia e di conseguenza l'inibizione della crescita tumorale
#Gladkik, 2022



Come avviene il rilascio del siRNA dai nanocarrier?



VANTAGGI

- protezione contro la degradazione
- migliorare la somministrazione mirata e portando alla riduzione dei danni ai tessuti sani
- mirano a migliorare l'assorbimento delle cellule tumorali grazie alla carica
- alcuni nanocarrier possono essere funzionalizzati per migliorare il targeting



VS

SVANTAGGI

- tossicità di alcune nanoparticelle che possono portare ad apoptosi cellulare
 - nanoparticelle metalliche non sono facilmente biodegradabili
 - costi di produzione molto alti e processi di produzione complessi



Prospettive future

Il campo della terapia genica come metodologia per curare il cancro è in rapida evoluzione ed offre prospettive promettenti per il trattamento di molte forme di tumori

Si mira a modificare il materiale genetico per correggere le mutazioni e per rendere le cellule tumorali più sensibili alle terapie esistenti

cellule CAR-T

cellule T del paziente geneticamente modificate per esprimere recettore che attacchi le cellule tumorali

tecnologia CRISPR

es. CRISPR-Cas9, correzione di mutazioni oncogeniche (geni TP53 e KRAS)

virus oncolitici

virus geneticamente modificati per distruggere cellule tumorali in modo da stimolare la risposta immunitaria

geni «suicidi»

stimolano il sistema immunitario per rendere le cellule tumorali più sensibili ai trattamenti convenzionali

Nonostante sia ancora in fase di sviluppo, la terapia con siRNA ha un futuro ricco di opportunità ed ha il potenziale di rivoluzionare il modo in cui affrontiamo il cancro, aprendo nuove possibilità nel campo della biomedicina.

**Grazie per
l'attenzione!**

► Bibliografia

1. Jain, D., Prajapati, S. K., Jain, A., & Singhal, R. (2023). **Nano-formulated siRNA-based therapeutic approaches for cancer therapy.** *Nano Trends*, 1, 100006.
2. Kim, D. H., & Rossi, J. J. (2008). **RNAi mechanisms and applications.** *Biotechniques*, 44(5), 613-616.
3. Martinez-Lage, M., Puig-Serra, P., Menendez, P., Torres-Ruiz, R., & Rodriguez-Perales, S. (2018). **CRISPR/Cas9 for cancer therapy: hopes and challenges.** *Biomedicines*, 6(4), 105.
4. E. Khabazian, et al., **Cationic liposome decorated with cyclic RGD peptide for targeted delivery of anti-STAT3 siRNA to melanoma cancer cells,** *J. Drug Target* 30 (5) (2022) 522–533 . [105]
5. D.V. Gladkikh, et al., **Folate-equipped cationic liposomes deliver anti-mdr1-sirna to the tumor and increase the efficiency of chemotherapy,** *Pharmaceutics* 13 (8) (2021) 1252
6. Sato, et al. (2012), **A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity on vitro and in vivo,** *J. Control Release*, 163(3), 267-276
7. Seth, S., Johns, R., & Templin, M. V. (2012). **Delivery and biodistribution of siRNA for cancer therapy: challenges and prospects.** *Therapeutic Delivery*, 3(2), 245-261.
8. Wan, P. K. T., Ryan, A. J., & Seymour, L. W. (2021). **Beyond cancer cells: Targeting the tumor microenvironment with gene therapy and armed oncolytic virus.** *Molecular Therapy*, 29(5), 1668-1682.

► Sitografia

1. <https://www.youtube.com/watch?v=JE1DclGuyR0>
2. <https://www.humanitas.it/news/cose-un-tumore-si-forma/>
3. <https://www.grupposandonato.it/news/2021/agosto/cancerogenesi-come-origina-tumore>