



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL' AMBIENTE

**Abbatere le barriere:  
Passi avanti nella somministrazione dei siRNA**

**Knocking down barriers: advances in siRNA delivery**

Tesi di laurea di:

Sara Sacco

Docente referente:

Prof. Paolo Mariani

Sessione estiva  
Anno accademico 2018/2019

# Knocking down barriers: advances in siRNA delivery

**Kathryn A. Whitehead, Robert Langer and Daniel G. Anderson**

Article in *Nature Reviews Drug Discovery* · March 2009

DOI: 10.1038/nrd2742 · Source: PubMed

## RIASSUNTO :

L'argomento trattato si basa sulla capacità dei siRNA di silenziare specifiche sequenze geniche, tramite il meccanismo dell'RNAi, quindi di poter essere usato come metodo farmacologico nella cura di diverse patologie.

Con particolare attenzione verranno analizzati :

- Meccanismo d'azione dal punto di vista molecolare
- Metodi di somministrazione
- Trasporto: Modifiche chimiche e nanocarrier
- Analisi dei materiali sintetici legati al trasporto

Verranno inoltre elencati esempi di impiego dei siRNA e problematiche legate al trasporto sistemico e alla tossicità di alcuni materiali

# MECCANISMO D'AZIONE

1998 : FIRE, MELLOW AND CO. → dsRNA in C.elegans induce un meccanismo di silenziamento genico

2001: TUSCHL E CO. → siRNA sintetici portano al silenziamento in cellule di mammifero

siRNA = SMALL INTERFERING RNA



INCORPORAMENTO CON IL COMPLESSO RISC

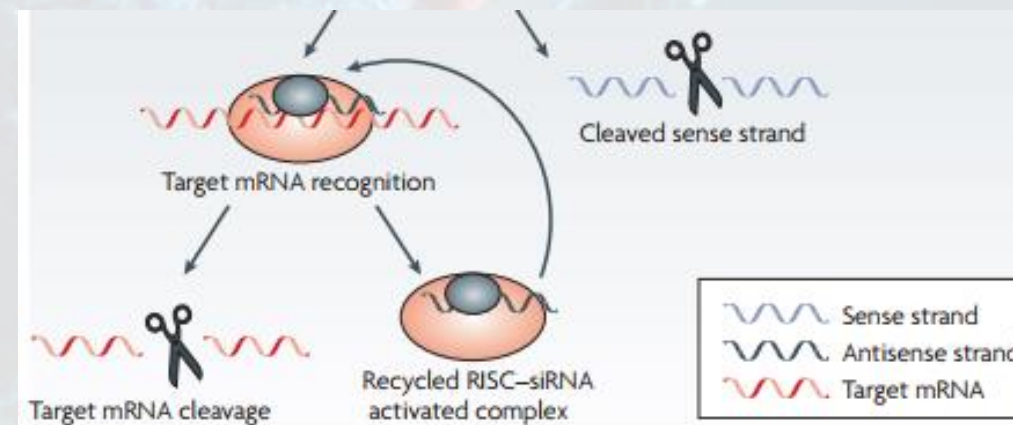
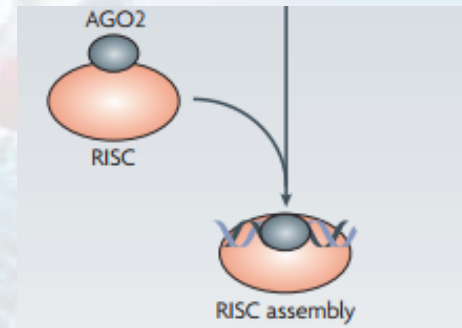
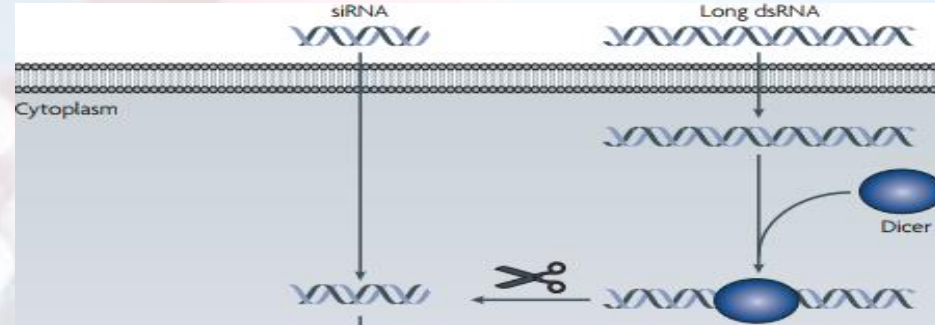


ATTIVAZIONE DEL MECCANISMO DELL'RNAi (interference)

- Classe di molecole di RNA a doppio filamento, lunghe tra 19-21 nucleotidi originate per azione dell'enzima DICER

- Ne risulta il clivaggio del filamento senso

- Il filamento non senso degrada selettivamente l'mRNA ad esso complementare



# METODI DI SOMMINISTRAZIONE

➤ Il trasporto dei siRNA è particolarmente dipendente dall'accessibilità dell'organo o tessuto target

Metodo di somministrazione	Organo target	Patologia target
<b>TOPICA</b> (applicazione locale diretta del siRNA di solito su cute e mucose)	OCCHIO PELLE VAGINA RETTO	DEGENERAZIONE MACULARE DERMATITI ATOPICHE HERPES SIMPLEX VIRUS DISTURBI DEL COLON INFIAMMATO
<b>LOCALE/DIERTTA</b> (applicazione locale in tutte le altre sedi)	<b>POLMONI</b> CERVELLO COLONNA VERT. TUMORI ISOLATI	<b>SARS (SINDROME RESPIRATORIA ACUTA GRAVE)</b> MALATTIA DI HUNTINGTON DOLORE CRONICO GLIOBLASTOMA MULTIFORME
<b>SISTEMICA</b> (iniezione intravenosa e trasporto attraverso il circolo sanguigno)	FEGATO CUORE RENI METASTASI TUMORALI	IPERCOLESTEROLEMIA INFRAZIONE MIOCARDICA MALATTIE DEI RENI SARCOMA DI EWING

siRNA installati nei polmoni per via 
  

- Fibrosi cistica
- Asma
- Influenza e raffreddore comune

Inibizione del virus RSV (respiratory syncyzial virus) da parte di siRNA somministrati per via nasale

# TRASPORTO SISTEMICO

Naked-siRNA

## VANTAGGI

- Permette di raggiungere la maggior parte dei tessuti
- È molto efficiente
- È in via di sviluppo poiché più ampio e versatile

## SVANTAGGI

- Abbastanza complesso
- siRNA in vivo affronta diverse difficoltà prima di poter svolgere il suo compito primario

siRNA → AGENTE ESTERNO  
riconosciuto e attaccato dal corpo e dal sistema immunitario

## Post-iniezione

Evitare la  
filtrazione  
renale

• Evitare cellule fagocitiche  
(macrofagi e monociti) per  
non attivare il sistema  
immunitario

Evitare aggregazione  
con proteine del siero

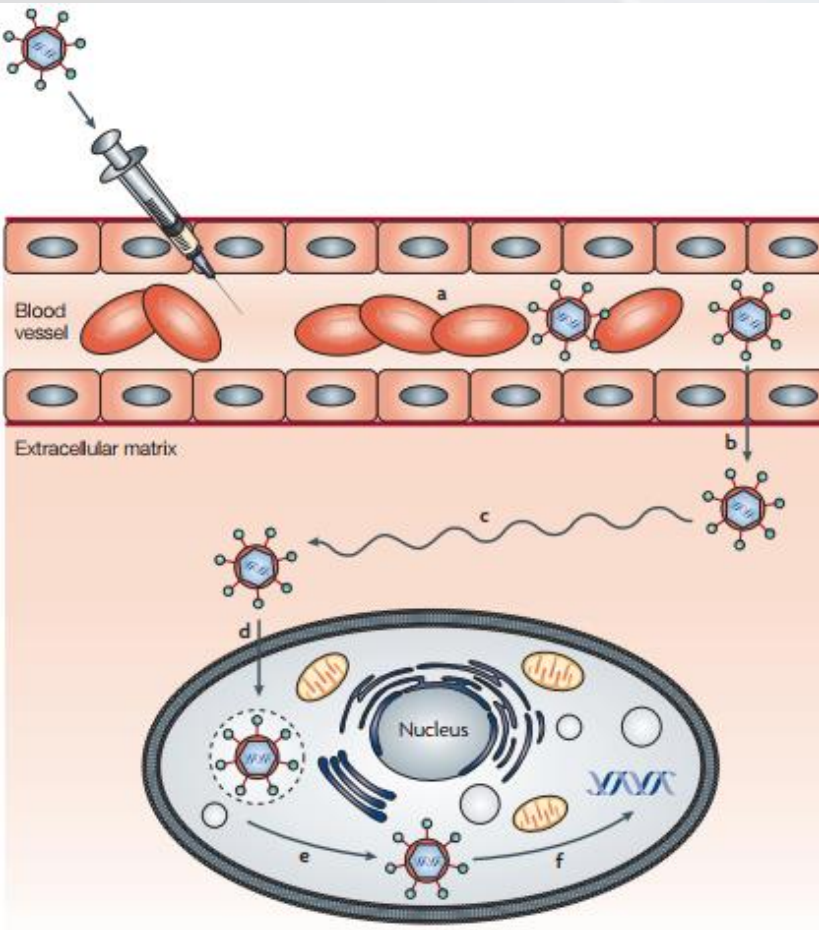
Evitare la  
degradazione  
enzimatica delle  
nucleasi

Uscita dal circolo  
sanguigno +  
matrice  
extracellulare

➤ Per evadere a queste difficoltà è necessaria l'azione di un secondo agente che trasporti il siRNA attraverso il circolo sanguigno

# siRNA MODIFICATI PER MIGLIORARE IL TRASPORTO

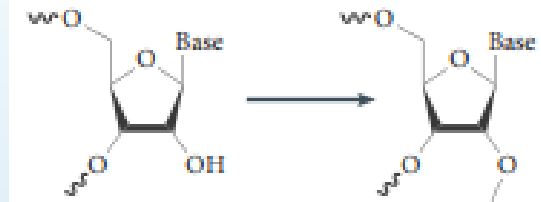
Modifiche chimiche per migliorare il trasporto ed evadere problemi legati ad esso



## 1. Modifica 2'-O-metile

- Sullo zucchero di alcuni nucleotidi selezionati in entrambi i filamenti
- Conferisce resistenza all'attività endonucleasica
- Previene l'attivazione del Toll-like receptor 7 (attiva immunità innata)

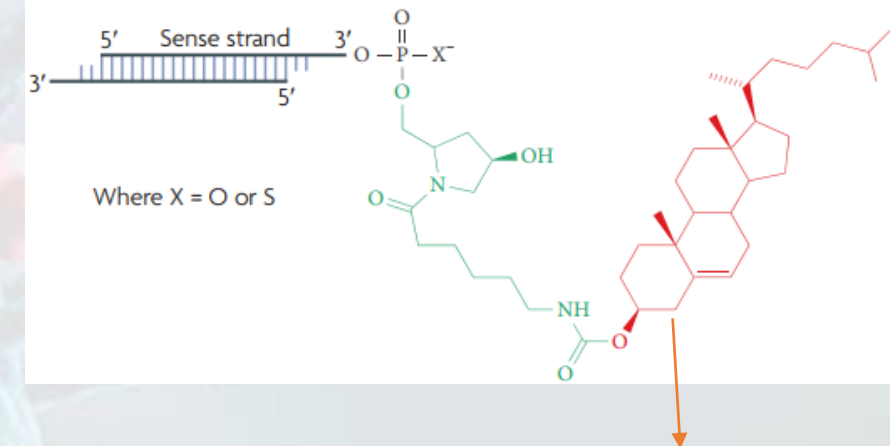
## a 2'-O-methyl modification



## 2. Uso di linker come PEG (glicole polietilenico) per ottenere es. siRNA COLESTEROLO MODIFICATI

- Incrementa il legame con la siero albumina
- Capaci di silenziare Apolipoproteina B nel fegato di topo → riducono il colesterolo totale

## b Cholesterol conjugation



Il legame con il colesterolo nell'elica senso Migliora il trasporto di naked siRNA in alcune cellule target come epatociti

- a. Trasporto attraverso la barriera endoteliale vascolare
- b. Attraversare la matrice extracellulare
- c. Essere portato nella cellula
- d. Evitare gli endosomi
- e. Liberarsi dall'involucro del carrier per attivare il meccanismo dell'RNAi

# Nanoparticelle sintetiche

Quando una modifica chimica non basta sono necessarie «nanoparticelle» o «nanocarrier» sintetici che incorporano il siRNA

Coadiuvano il trasporto

Inibisce il trasporto non-specifico

## Caratteristiche e proprietà

Proprietà di superficie  
- CARICA -

- **CARICA POSITIVA IN VITRO:**
  - facilita il trasporto associandosi alle membrane cellulari cariche negativamente
  - promuove la formazione del complesso siRNA-carrier e la sua stabilità
- **CARICA POSITIVA IN VIVO:**
  - associazione con le proteine del siero cariche negativamente → rende inefficiente il siRNA

L'aggiunta di PEG sembra mitigare questo problema

- regola la misura del siRNA prevenendo l'aggregazione
- Forma una barriera protettiva contro gli attacchi del sistema immunitario

BIODISTRIBUZIONE

- Un siRNA complessato con un materiale sintetico aumenta le sue dimensioni (>50 kDa) evitando la filtrazione renale e l'accumulo nel sistema reticolo endoteliale ( RES )

Naked siRNA o con misura <50kDa vengono usati per curare patologie nel RES

TOSSICITÀ

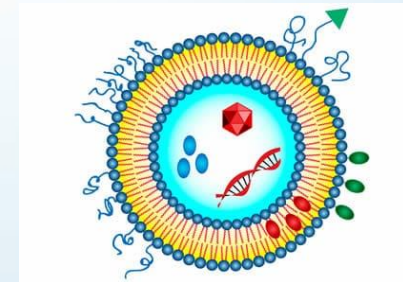
- un carrier ottimale deve stimolare al minimo il sistema immunitario
    - lipidi sintetici
    - polimeri
- } Materiali biocompatibili e con scarsa tossicità

# ANALISI DEI MATERIALI SINTETICI PER IL TRASPORTO

## 1. LIPOSOMI E LIPIDI

IN AMBIENTE ACQUOSO ALCUNI MATERIALI FORMANO LIPOSOMI :

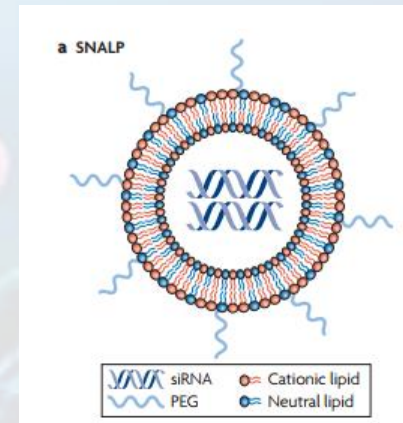
- Vescicola fosfolipidica dalle dimensioni variabili
- All'interno racchiudono una soluzione per il trasporto di sostanze idrofiliche
- Usati per trasportare sostanze - es: farmaci - all'interno delle membrane cellulari ( selettive ed idrofobiche)



### ➤ **SNALPs** (Particelle stabili acido nucleico-lipide)

Usati efficacemente contro :

- REPLICAZIONE HBV nel topo (con effetto dose-dipendente)
- KNOCKDOWN di ApoB nel fegato di scimmia
- EBOLA virus nel maiale



### ➤ **LIPOTRUST** → reagente a ridotta tossicità usato per il trasporto di acidi nucleici

Liposomi vitamina A-accoppiata in associazione con lipotruster

- Usati per trasportare anti-gp46 siRNA contro la cirrosi epatica nel topo

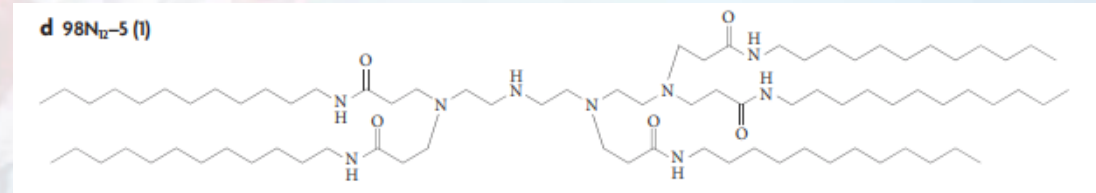


ALTRI MATERIALI INVECE HANNO LA CARATTERISTICA DI ESSERE SIMILI A LIPIDI

➤ **LIPIDOIDI** : - carrier molto efficienti che hanno come i lipidi le caratteristiche per formare liposomi  
- richiedono lunghi processi per essere sintetizzati e purificati



ES: LIPIDOIDE **98N<sub>12</sub>-5(1)** complessato con siRNA è stato recentemente usato per degradare l'mRNA legato alla proteina PCSK9



Regola i livelli e le funzioni dei recettori delle LDL

siRNA fegato specifico riduce i livelli degli mRNA del 50-70%  
- RIDUZIONE IPERCOLESTEROLEMIA -

## 2. POLIMERI CATIONICI

- A catena lineare o ramificata
- Usati come agenti veicolanti → abilità di legare e condensare grandi acidi nucleici in una nanoparticella stabile

CLASSE DI POLIMERI CATIONICI :

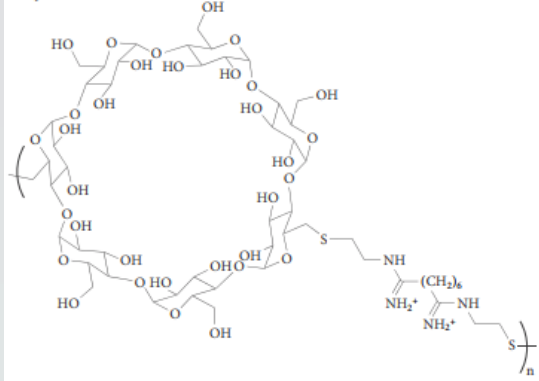
➤ **PEI (POLIETERIMMIDE)**

b Polyethyleneimine monomer



- Somministrazione intratracheale di pei-siRNA porta al knockdown selettivo dei recettori del dolore nel topo
- Somministrazione intraperitoneale per inibire la crescita di tumori subcutanei nel topo → inibizione del fattore di crescita HER2 (implicato nella crescita e differenziamento cellulare) nella sua forma patologica modificata

c Cyclodextrin monomer



➤ **CICLODESTRINE** → oligosaccaridi ciclici naturali formati da monomeri di D-glucopiranosio uniti tra loro e chiusi ad anello.

- Usati come agenti di trasporto dei siRNA
- È stato visto che siRNA legati a questo carrier specifici per il gene EWS-FL11 riescono a inibire la crescita del Sarcoma di Edwing

- ↓
- Tumore maligno dell'osso, a cellule piccole rotonde, con forte potenziale metastatico
  - traslocazione caratteristica che interessa il gene EWSR1

# Conclusioni

L'uso del meccanismo dell'RNAi come terapeutico ha fatto significativi progressi del primo utilizzo. La formulazione base dei siRNA rappresenta un importante agente farmacologico che induce il potente, persistente e specifico silenziamento di un grande range di target genici

Il trasporto rimane uno dei campi che richiede maggiore attenzione e sperimentazione poiché rappresenta una barriera nell'uso dei siRNA in campo clinico.

Le nanoparticelle sintetiche composte da polimeri, lipidi, lipoidi o altri coniugati svolgono un ruolo chiave per l'applicazione dei siRNA

Gli studi futuri puntano a lavorare sulle modifiche chimiche e sui materiali sintetici per il trasporto in modo da migliorare sia quest'ultimo che l'attivazione non-specifica del sistema immunitario, importante per evitare la selettiva neutralizzazione del siRNA utilizzato.