



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

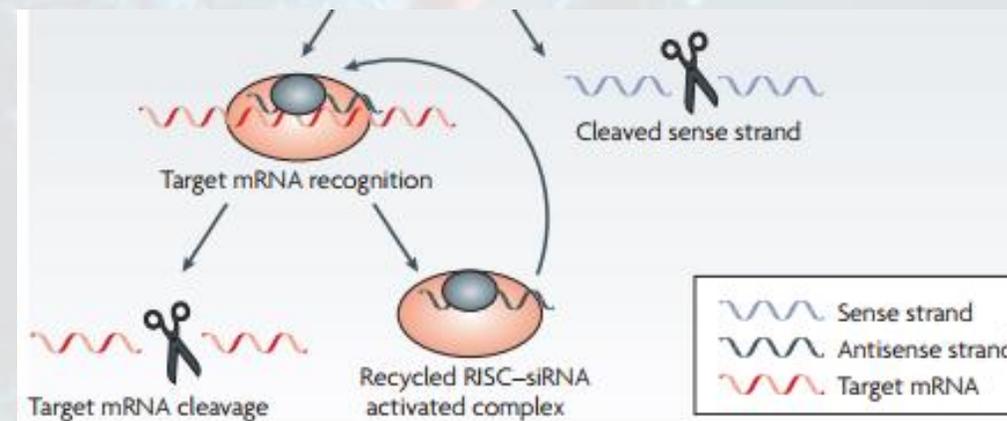
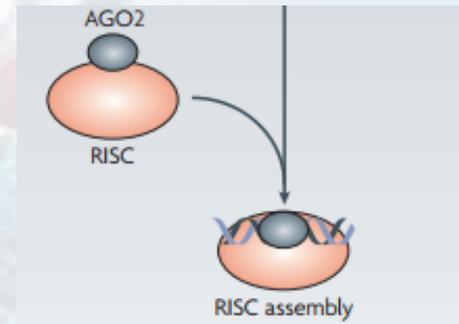
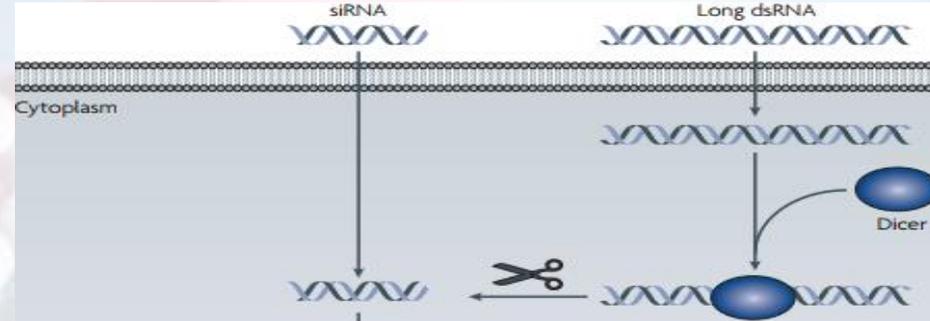


ATTIVAZIONE DEL MECCANISMO DELL'RNAi (interference)

- 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
TOPICA (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
LOCALE/DIRECTA (applicazione locale in tutte le altre sedi)	POLMONI CERVELLO COLONNA VERT. TUMORI ISOLATI	SARS (SINDROME RESPIRATORIA ACUTA GRAVE) MALATTIA DI HUNTINGTON DOLORE CRONICO GLIOBLASTOMA MULTIFORME
SISTEMICA (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

- Intranasale
- Intratracheale

- Fibrosi cistica
- Asma
- Influenza e raffreddore comune

Inibizione del virus RSV (respiratory syncyrial 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

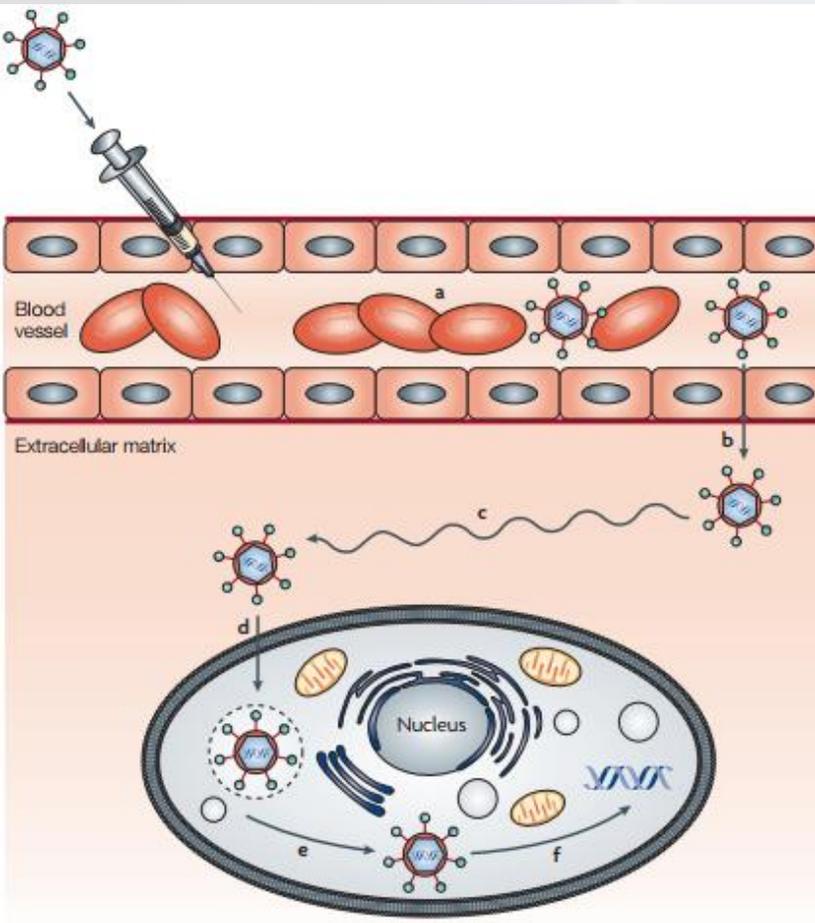
Evitare la degradazione enzimatica delle nucleasi

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

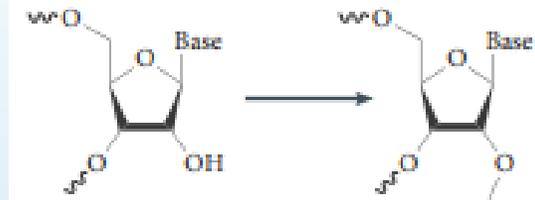
Modifiche chimiche per migliorare il trasporto ed evadere problemi legati ad esso



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)

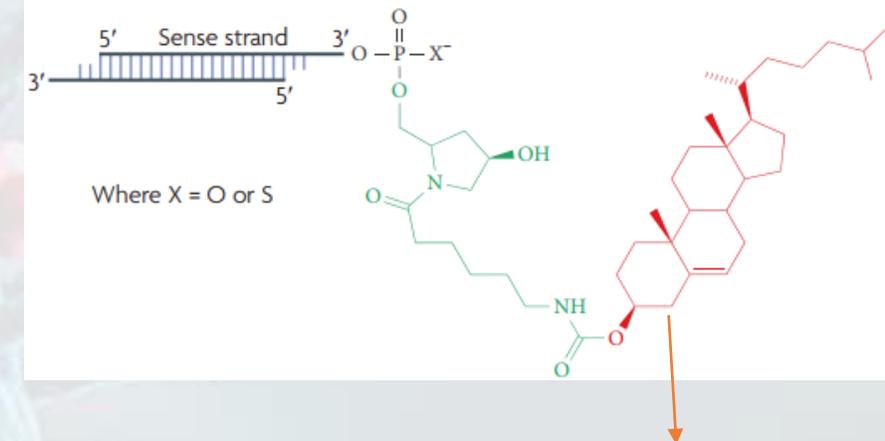
a 2'-O-methyl modification



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

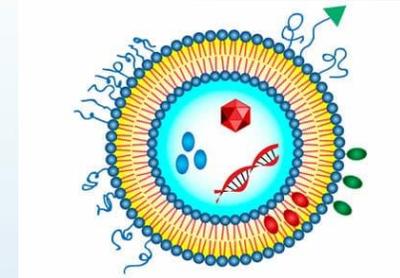
- un carrier ottimale deve stimolare al minimo il sistema immunitario
 - lipidi sintetici
 - polimeri
- } Materiali biocompatibili e con scarsa tossicità

ANALISI DEI MATERIALI SINTETICI PER IL TRASPORTO

1. LIPOSOMI E LIPIDI

IN AMBIENTE ACQUOSO ALCUNI MATERIALI FORMANO LIPOSOMI :

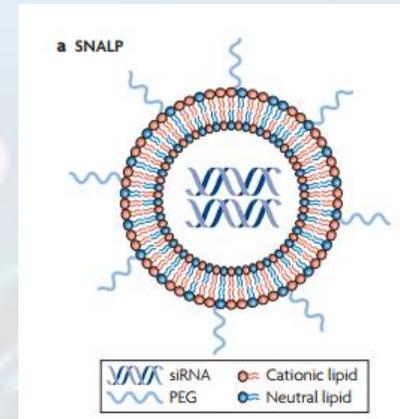
- Vescicola fosfolipidica dalle dimensioni variabili
- All'interno racchiudono una soluzione per il trasporto di sostanze idrofiliche
- Usati per trasportare sostanze - es: farmaci - all'interno delle membrane cellulari (selettive ed idrofobiche)



➤ **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

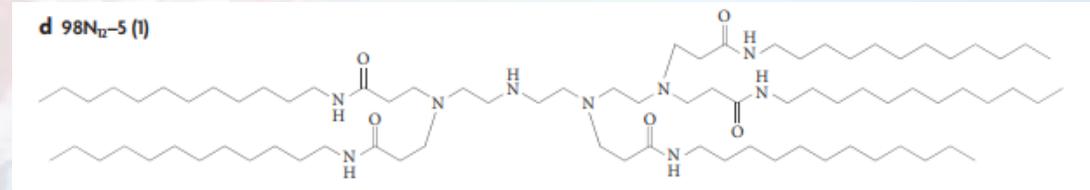
- Usati per trasportare anti-gp46 siRNA contro la cirrosi epatica nel topo

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 **98N₁₂-5(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

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.