

Universita' degli Studi di Napoli "Federico II"
Scuola di Medicina e Chirurgia



Dipartimento di Farmacia
Master di II Livello
in
Pharmaforward: Gli Orizzonti della Farmacia dei Servizi

OVERVIEW SUI FARMACI
BIOLOGICI

AN OVERVIEW ON BIOLOGICAL
DRUGS

RELATORE

Ch.ma Prof. ssa

AGNESE MIRO

CANDIDATO

GAIA MORRA

MATRICOLA: KD000011

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Sommario

INTRODUZIONE.....	1
1.0: STORIA ED EVOLUZIONE DELLE TECNOLOGIE A BASE DI ACIDI NUCLEICI	7
1.0: Storia ed evoluzione delle tecnologie a base di acidi nucleici	8
1.1 Dalle Origini alla Biologia Molecolare	8
1.1: Prime Applicazioni e Farmaci Approvati	10
2.0: FARMACI A BASE DI ACIDI NUCLEICI: MECCANISMI E APPLICAZIONI CLINICHE ...	14
2.0: Farmaci a base di acidi nucleici: meccanismi e applicazioni cliniche	15
2.1 Oligonucleotidi Antisense (ASOs)	16
2.2 (siRNA)	17
2.3. mRNA Terapeutico e Vaccinale	19
2.4 Terapie di Editing Genomico (CRISPR/Cas9)	20
2.5 Altre Classi	21
2.6. Tecnologie di rilascio.	21
3.0: STRATEGIE DI VEICOLAZIONE DEI FARMACI A BASE DI ACIDI NUCLEICI.....	25
3.0 Strategie di veicolazione dei Farmaci a Base di Acidi Nucleici.	26
CONCLUSIONI	34
Conclusioni	35
BIBLIOGRAFIA	36

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, i farmaci biologici hanno rivoluzionato l'approccio terapeutico a molte patologie complesse, aprendo nuove prospettive nella medicina moderna. Secondo l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), si definisce biologico “un medicinale il cui principio attivo è una sostanza prodotta o estratta da un organismo vivente”. Questi farmaci comprendono anticorpi monoclonali, proteine ricombinanti, vaccini e ormoni, e proprio per la loro natura, sono caratterizzati da una struttura molto complessa e da una produzione altamente specializzata, che richiede rigorosi controlli di qualità. Svolgono un ruolo essenziale nel trattamento di patologie complesse come le malattie autoimmuni, tumori e disordini genetici.

Parallelamente, la Farmacopea Ufficiale Italiana introduce il concetto di prodotti tecnologici, riferendosi a quelle preparazioni farmaceutiche in cui la componente tecnologica è fondamentale per l'efficacia terapeutica. Si tratta di sistemi in cui non è solo il principio attivo a determinare l'effetto clinico, ma anche il modo in cui esso viene rilasciato, assorbito o mantenuto stabile all'interno dell'organismo. Integrare l'innovazione biotecnologica con il progresso tecnologico nella formulazione di questi farmaci rappresenta ad oggi una svolta cruciale per la medicina.

Difatti, per poter introdurre l'innovazione di queste nuove terapie, bisogna partire dalle informazioni genetiche: queste definiscono chi siamo e come funziona il nostro organismo, ed è importante ricordare che esse sono tutte contenute negli acidi nucleici, in particolare nel DNA e nell'RNA. Oltre a custodire il nostro patrimonio genetico, queste molecole svolgono un ruolo cruciale nei processi biologici di crescita, sviluppo e riproduzione (Sun, Setrerrahmane, Chencheng, Jialiang & Hanmei). Normalmente, l'informazione genetica segue un percorso ben definito: il DNA viene trascritto in RNA messaggero (mRNA), che a sua volta viene tradotto dai ribosomi per produrre proteine; sono proprio le proteine ad essere responsabili della maggior parte delle funzioni vitali all'interno delle cellule e dei tessuti.

Le terapie basate sugli acidi nucleici, anche dette farmaci a base di acidi nucleici (NADs), si basano sull'idea di sfruttare queste stesse molecole, che vengono opportunamente modificate, per intervenire sui processi genetici con l'obiettivo di prevenire o curare determinate malattie (2). Questi farmaci agiscono direttamente sul materiale genetico, modificandolo oppure regolando il funzionamento naturale di DNA e RNA. Si tratta di un approccio particolarmente promettente: invece di limitarsi a gestire i sintomi, consente di intervenire alla radice di molte patologie. Le potenzialità terapeutiche sono ampie ed includono la possibilità di “silenziare” geni difettosi (repressione genica), sostituire informazioni genetiche mancanti o errate (sostituzione genica) o addirittura correggere direttamente la sequenza del DNA (editing genico) (1)(2). Negli ultimi anni, è doveroso evidenziare gli enormi progressi nel campo della

proteomica (lo studio delle proteine) e della genomica (lo studio dei genomi), lo sviluppo dei NADs ha fatto passi da gigante.

Esistono diversi tipi di NADs, ognuno con un meccanismo d'azione specifico. Ad esempio:

Oligonucleotidiantisenso(ASOs): Sono piccole sequenze di acidi nucleici a singolo filamento che si legano all'RNA bersaglio attraverso un meccanismo chiamato "complementarità di sequenza", cioè un meccanismo basato sull'appaiamento preciso tra basi nucleotidiche, simile all'incastro di pezzi di un puzzle. A seconda della loro struttura e del meccanismo d'azione previsto, gli ASO possono indurre effetti differenti. Una delle strategie più comuni prevede l'impiego dei cosiddetti gapmer: ASO che si legano all'RNA bersaglio formando un ibrido RNA/DNA. Questo doppio filamento viene poi riconosciuto da un enzima cellulare, la RNasi H1, che ne provoca la degradazione selettiva tagliando l'RNA bersaglio.

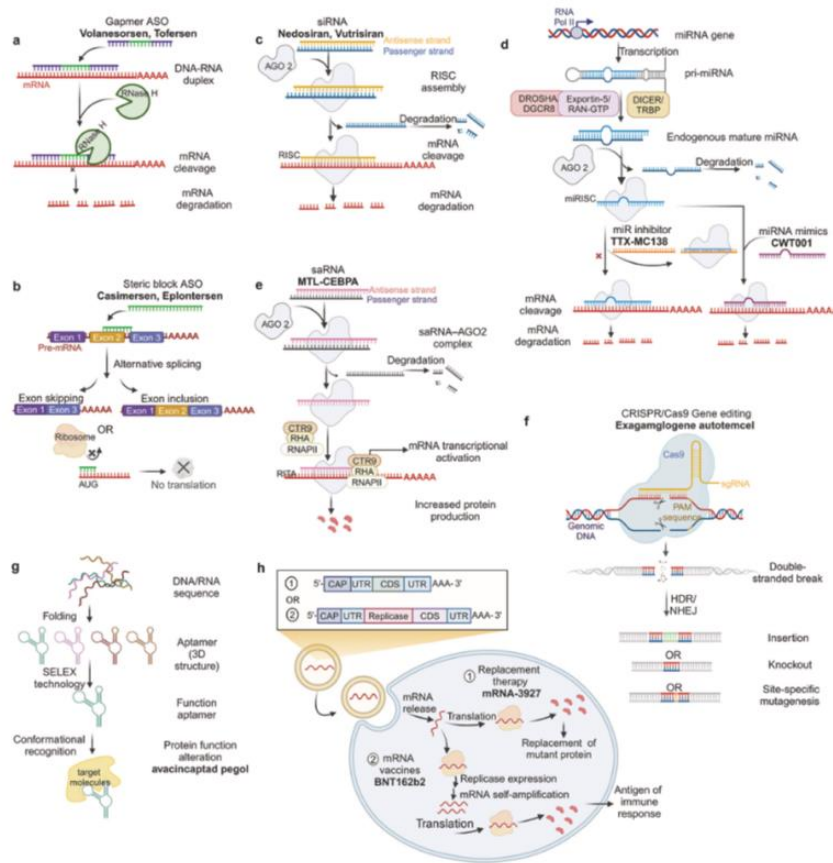
Altri ASO, invece, non innescano la degradazione dell'RNA, ma bloccano l'accesso alle strutture cellulari, interferendo così con funzioni fondamentali come, ad esempio, l'inibizione dello splicing: il processo durante il quale l'RNA precursore (pre-mRNA) viene modificato attraverso la rimozione degli introni (sequenze non codificanti) e l'unione degli esoni (regioni codificanti). Alterando questo processo, gli ASO possono correggere errori di splicing associati a diverse patologie. In altri casi, l'ASO può semplicemente impedire la traduzione dell'RNA in proteina, bloccandone la funzione a monte.

L'efficacia degli ASO dipende fortemente dalla complementarità tra la loro sequenza e quella dell'RNA bersaglio: maggiore è la corrispondenza, più stabile e selettivo sarà il legame. Di norma, un ASO è costituito da una sequenza di circa 13–30 nucleotidi, una lunghezza che consente di ottenere un'elevata specificità d'azione, riducendo al minimo gli effetti indesiderati.

- **Small Interfering RNAs (siRNAs):** Sono molecole di RNA a doppio filamento, solitamente lunghe 19-23 paia di basi, che rappresentano una forma classica di silenziamento genico naturale mediato da RNA (RNA interference o RNAi), cioè servono per inibire l'espressione di alcuni geni. (2) (3) (4) (5) Quando un siRNA maturo entra in una cellula, si associa a un complesso proteico chiamato RISC. All'interno del RISC, un filamento del siRNA (il "filamento guida") viene mantenuto, mentre l'altro (il "filamento passeggero") viene degradato. Il filamento guida rimanente aiuta il complesso RISC a trovare l'mRNA bersaglio e cioè l'RNA messaggero. Quest'ultimo contiene le istruzioni per costruire una determinata proteina; una volta legato all'mRNA, il RISC, tramite la proteina AGO2 (Argonaute-

2), taglia l'mRNA bersaglio. Questa degradazione dell'mRNA impedisce la sua traduzione in proteina, inibendo la trascrizione del gene corrispondente.

- **Terapie a base di mRNA:** Consistono nell'introdurre all'interno delle cellule una molecola di mRNA sintetico, cioè una molecola che fornisce le istruzioni per la produzione di una proteina specifica. Questo metodo può essere usato per sostituire proteine mancanti a causa di malattie genetiche o, come visto con i vaccini per il COVID-19, l'mRNA contenuto nel vaccino fa produrre alle cellule una proteina estranea (la proteina Spike del virus SARS-CoV-2). Il sistema immunitario la riconosce come estranea e stimola una risposta immunitaria protettiva nel caso in cui dovesse incontrarla una seconda volta.
- **Editing Genomico** (es. CRISPR/Cas9): Queste tecnologie permettono di modificare con precisione il DNA nel genoma di una cellula. Il sistema CRISPR/Cas9 utilizza una proteina (Cas9) che agisce come una specie di “forbice molecolare” e viene guidata all'interno del DNA da una molecola di RNA (sgRNA) per creare una rottura specifica nella doppia elica del DNA in un punto preciso. La cellula a questo punto tenta di riparare il danno utilizzando meccanismi naturali. Ed è proprio durante questa fase di riparazione che possiamo intervenire per inserire, rimuovere o correggere sequenze di DNA, modificando così permanentemente il gene.
- **Aptameri:** Sono molecole di acido nucleico a singolo filamento (DNA o RNA) che si ripiegano su sé stesse in strutture ben precise. Questa struttura tridimensionale permette loro di legarsi in modo selettivo a specifici bersagli molecolari; spesso i bersagli sono le proteine, e si legano in modo simile agli anticorpi. Una volta legati al bersaglio possono bloccarne l'attività, o essere utilizzati per direzionare farmaci ad altre molecole o cellule
- **Small Activating RNAs (saRNAs):** Sono molecole di RNA a doppio filamento che, al contrario dei siRNAs (che ricordiamo servono a reprimere l'espressione dei geni), questi possono aumentare l'espressione genica legandosi a specifiche regioni del DNA (solitamente proprio vicino all'inizio dei geni; denominati i promotori genici) e reclutando complessi proteici (come il RITA complex) che stimolano l'inizio e l'estensione della trascrizione, cioè la produzione dell'RNA messaggero. Quindi, i saRNA promuovono l'espressione genica invece di reprimerla, sfruttando i meccanismi naturali della cellula.



(Fig.1)

Questi diversi studi hanno dimostrato la fattibilità dell'utilizzo dei NADs nella prevenzione e nel trattamento delle malattie. Oggi, numerosi farmaci a base di acidi nucleici hanno ricevuto l'approvazione e sono disponibili per i pazienti per poter prevenire o curare alcune malattie.

Questi includono:

- ASO (oligonucleotidiantisense) usati per malattie come l'amiloidosi mediata da transtiretina (TTR) o l'atrofia muscolare spinale (SMA).
- siRNA usati anche loro per l'amiloidosi mediata da transtiretina TTR o l'ipercolesterolemia.
- Infine, le terapie basate su mRNA: esempio sono i vaccini contro il COVID-19 e persino la prima terapia di editing genico CRISPR/Cas9 approvata.

Tuttavia, lo sviluppo dei NADs presenta ancora sfide che richiedono tempo per essere affrontate. Uno degli ostacoli principali è garantire che il farmaco raggiunga in modo efficace le cellule e i tessuti bersaglio, superando varie barriere come la degradazione da parte di

enzimi chiamati nucleasi o il riconoscimento da parte del sistema immunitario, e arrivando al sito d'azione intracellulare (nel citoplasma o nel nucleo) senza essere degradato prima. La stabilità della molecola di acido nucleico e la sua capacità di penetrare la membrana cellulare sono vitali. Per superare questi problemi, la ricerca si concentra sullo sviluppo di opportune modifiche chimiche alla struttura degli acidi nucleici (come le modifiche al 2'-O-metile) e sull'utilizzo di sistemi di rilascio (delivery systems) avanzati. Esempi di questi sistemi includono nanoparticelle lipidiche (LNPs), come quelle usate per i vaccini a mRNA, o coniugati a piccole molecole, come i coniugati GalNAc (N-acetilgalattosamina) che si legano a un recettore specifico (l'ASGPR) abbondante sulla superficie delle cellule epatiche, permettendo un rilascio mirato nel fegato.

Nonostante le sfide, è evidente che lo sviluppo delle terapie con acidi nucleici è in rapida evoluzione, offrendo così nuove speranze per il trattamento di malattie che in precedenza erano difficili o impossibili da affrontare.

1.0: STORIA ED EVOLUZIONE DELLE TECNOLOGIE A BASE DI ACIDI NUCLEICI

1.0: Storia ed evoluzione delle tecnologie a base di acidi nucleici

Negli ultimi anni, si è sviluppata l'idea più concreta di presentare terapie farmacologiche basate sulle molecole che costituiscono il nostro patrimonio genetico: gli acidi nucleici. Le terapie a base di acidi nucleici (NADs, NucleicAcidDrugs) rappresentano un approccio terapeutico innovativo che mira a trattare le malattie agendo direttamente sulla genetica delle cellule, anziché limitarsi a intervenire sulle proteine da cui deriva. A differenza dei farmaci convenzionali, le terapie a base di acidi nucleici intervengono direttamente sul codice genetico, facendo in modo tale da modulare e quindi modificare l'espressione genica; Questo approccio offre la possibilità di affrontare malattie causate da difetti genetici o da una produzione anomala di proteine dando effetti terapeutici altamente specifici, duraturi e, in alcuni casi, potenzialmente curativi, soprattutto per disturbi ereditari e acquisiti di cui non si era mai pensato prima d'ora di trovare una cura definitiva. La loro efficacia può essere raggiunta attraverso meccanismi come la repressione, la sostituzione o l'editing genico.

Per capire come si è arrivati a usare gli acidi nucleici come strumenti terapeutici, bisogna fare un passo indietro e guardare alla storia della biologia molecolare.

1.1 Dalle Origini alla Biologia Molecolare

L'idea di utilizzare la genetica per curare le malattie non è nuova. Quasi mezzo secolo fa, Friedmann e Roblin ipotizzarono che fosse possibile trattare alcune malattie genetiche ereditarie introducendo una copia funzionante del gene difettoso. Questa intuizione è considerata una delle basi delle terapie moderne a base di acidi nucleici. Fin dall'inizio, però, è stato chiaro che per andare avanti serviva capire meglio il legame tra mutazioni e malattie, studiare gli effetti a lungo termine di queste terapie e assicurarsi che fossero sicure per l'uomo.

Nel 1869, il medico svizzero Friedrich Miescher, si trovò a studiare i globuli bianchi isolati dal pus delle bende chirurgiche, e scoprì una nuova sostanza all'interno del nucleo cellulare, ricca di fosforo, che chiamò "nucleina". Sebbene Miescher non avesse pienamente compreso la natura o la funzione di questa molecola, la sua scoperta rappresentò la prima identificazione di quello che oggi conosciamo come DNA. Il vero significato biologico della nucleina non venne a galla per decenni. La svolta arrivò nel XX secolo con una serie di scoperte cruciali. La più celebre fu, nel 1953, con la determinazione della struttura a doppia elica del DNA da

parte di James Watson e Francis Crick. Questa struttura, costituita da due filamenti avvolti a spirale e tenuti insieme da legami tra specifiche basi complementari (Adenina con Timina, Citosina con Guanina), suggerì immediatamente come l'informazione genetica potesse essere immagazzinata e copiata fedelmente.

Poco dopo, la formulazione da parte di Crick del Dogma Centrale della Biologia Molecolare, si stabilì la vera e propria informazione biologica: dal DNA all'RNA, e dall'RNA alle proteine. Più precisamente:

- Il DNA (Acido Desossiribonucleico) contiene il "materiale" genetico completo.
- Attraverso un processo definito trascrizione l'informazione di specifici geni nel DNA viene copiata in molecole di RNA messaggero (mRNA).
- L'mRNA funziona come una sorta di “copia” che porta le istruzioni fuori dal nucleo della cellula, dove si trova quasi tutto il DNA. Una volta fuori, i ribosomi leggono queste istruzioni (in un processo chiamato traduzione) e costruiscono le proteine, che svolgono la maggior parte delle funzioni nel nostro corpo.

Capire questo meccanismo ha fatto emergere un concetto importante: le proteine, che di solito sono il bersaglio dei farmaci, sono in realtà il risultato finale di una serie di passaggi controllati dagli acidi nucleici. Questo ha fatto nascere l'idea che si potesse intervenire prima, quindi a monte, modificando direttamente per cercare di curare alcune malattie.

Diverse scoperte di fenomeni biologici hanno presentato nuove possibilità terapeutiche: tra questi, la scoperta della struttura a doppio filamento dell'RNA e il fenomeno dell'ibridazione degli acidi nucleici.

- Sebbene inizialmente si pensasse che l'RNA a singolo filamento non potesse formare strutture a doppio filamento, nel 1956, Rich e Davies dimostrarono che l'RNA poteva formare strutture a doppio filamento. Questo risultato è basato sul principio dell'appaiamento complementare delle basi, simile a quello del DNA, e fu fondamentale per lo sviluppo di farmaci basati sull'RNA a doppio filamento, come i microRNA (miRNAs) e gli small interfering RNA (siRNAs).
- Successivamente, nel 1960, Rich descrisse il fenomeno dell'ibridazione DNA/RNA. Sfruttando questa scoperta, nel 1978, Zamecnik e Stephenson utilizzarono specifiche sequenze di oligodeossinucleotidi (brevi filamenti di DNA modificato) dirette contro l'RNA di un virus (il virus del sarcoma di Rous) per bloccarne la replicazione, cioè dimostrarono che brevi sequenze sintetiche di DNA (oligodeossinucleotidi) potevano legarsi a specifici RNA virali e bloccare la replicazione. Questo esperimento ha portato un

importante passo avanti verso l'applicazione terapeutica degli oligonucleotidi antisenso (ASO).

- Man mano che la ricerca sulla trascrizione (copia del DNA in RNA) e sulla traduzione (sintesi di proteine dall'RNA) portava risultati abbastanza soddisfacenti, è stato scoperto che i trascritti iniziali di RNA necessitano di una modificazione chiamata "splicing", che rimuove alcune parti (introni) e unisce altre (esoni) per formare l'RNA messaggero (mRNA) maturo. Questo processo di splicing si è rivelato un bersaglio importante per alcune terapie a base di acidi nucleici.
- Un'altra scoperta cruciale è stata il fenomeno dell'interferenza dell'RNA (RNAi). L'RNAi è un processo naturale che le cellule utilizzano per inibire specifici geni. Questo meccanismo naturale, scoperto inizialmente nelle piante e nei vermi *C. elegans* alla fine degli anni '90, e poi confermato nelle cellule del mammifero, è un potente sistema di silenziamento genico post-trascrizionale: si è scoperto che piccole molecole di RNA a doppio filamento (come gli small interfering RNAs, siRNAs) potevano legarsi a specifici mRNA bersaglio e indurne la degradazione, impedendo così la produzione della proteina corrispondente.
- Ancora, da non sottovalutare è lo sviluppo degli aptameri e gli oligonucleotidi a singolo filamento capaci di legarsi in modo specifico a determinate molecole. Originariamente era un meccanismo di difesa batterica contro i virus, CRISPR/Cas9 permette di modificare direttamente il DNA in punti specifici del genoma con elevata precisione. Questo significa poter potenzialmente correggere mutazioni genetiche, disattivare geni dannosi o inserire nuove sequenze genetiche, affrontando la causa primaria di molte malattie genetiche a monte. Queste scoperte hanno gettato le basi scientifiche per lo sviluppo delle terapie a base di acidi nucleici.

1.1: Prime Applicazioni e Farmaci Approvati

L'idea di trasformare il materiale genetico ed utilizzarlo come farmaco risale almeno a mezzo secolo fa, quando Friedmann e Roblin teorizzarono la possibilità di trattare disordini genetici ereditari introducendo una copia funzionale di un gene.

Oligonucleotidi Antisenso (ASOs): Nel 1998, Fomivirsen (Vitravene) divenne il primo farmaco ASO approvato dalla FDA, utilizzato per trattare la retinite da citomegalovirus (patologia oculare grave) in pazienti immunocompromessi. Fomivirsen funziona attaccandosi all'RNA del virus e impedendogli di compiere un passaggio fondamentale per potersi replicare, cioè la circularizzazione. Inoltre, richiama un enzima chiamato RNase H1 che distrugge l'RNA virale, bloccando così la produzione delle proteine di cui il virus ha bisogno per sopravvivere. Anche se il farmaco (chiamato Vitravene) è stato poi ritirato dal mercato, ha comunque mostrato che gli ASO (oligonucleotidi antisenso) possono funzionare davvero nella pratica clinica.

Un esempio significativo di un farmaco attualmente in commercio è Nusinersen (Spinraza®), approvato per l'atrofia muscolare spinale (SMA). La SMA è causata da mutazioni nel gene SMN1. Però esiste nell'uomo un altro gene molto simile, chiamato SMN2, che può produrre una proteina simile, anche se di solito non funziona bene perché c'è un errore nello splicing (un processo che avviene prima che il gene venga tradotto in proteina).

Spinraza è un ASO modificato che si lega al pre-mRNA di SMN2 e corregge questo errore, aiutando a includere l'esone 7, una parte importante del gene. In questo modo, il gene SMN2 riesce a produrre una proteina SMN funzionante. Gli studi clinici hanno mostrato che i pazienti trattati con Spinraza hanno avuto miglioramenti nella funzione motoria. Il farmaco viene somministrato tramite iniezione nel liquido cerebrospinale (cioè direttamente nel sistema nervoso centrale).

Small Interfering RNAs (siRNAs): Il primo farmaco basato su siRNA approvato è stato Patisiran (Onpattro®) nel 2018. Viene usato per trattare una malattia rara chiamata amiloidosi ereditaria da transtiretina (nota come prealbumina), che colpisce i nervi e vari organi. Patisiran agisce facendo in modo da inibire il gene che produce la transtiretina (TTR) difettosa, grazie a un meccanismo chiamato RNA interference (RNAi). Un aspetto interessante di questa terapia è che il farmaco viene inserito in nanoparticelle lipidiche (LNP), che lo aiutano a raggiungere il fegato, cioè il luogo in cui viene prodotta la proteina TTR. Quindi abbiamo anche efficienza nella veicolazione diretta nel sito d'azione (50).

Negli anni successivi, sono stati approvati anche altri farmaci basati su siRNA, tra cui:

- Inclisiran (Leqvio®): usato per abbassare i livelli di colesterolo LDL;
- Nedosiran (Rivfloza®): usato per trattare una malattia rara chiamata iperossaluria primaria.

Aptameri: rappresentano un'altra classe di NADs che interagiscono con proteine. Pegaptanib (Macugen®), approvato nel 2004, è stato uno dei primi farmaci basati su aptameri, utilizzato per trattare la degenerazione maculare (patologia oculare che causa perdita della vista); si lega specificamente a una proteina coinvolta nella crescita anomala dei vasi sanguigni nell'occhio (VEGF-165), bloccandone l'azione.

mRNA Terapeutico (Vaccini a mRNA): La svolta epocale c'è stata con la tecnologia basata sull'mRNA e il conseguente sviluppo ed approvazione dei vaccini contro il COVID-19 durante la pandemia. I vaccini come BNT162b2 (Comirnaty®) (BioNTech/Pfizer) e mRNA-1273 (Spikevax®) (Moderna) utilizzano mRNA incapsulato in nanoparticelle lipidiche (LNPs) con la finalità di istruire le cellule a produrre la proteina Spike del virus SARS-CoV-2, stimolando così una risposta immunitaria protettiva.

Tecnologia CRISPR/Cas (Editing Genetico): La più recente e forse una delle più rivoluzionarie approvazioni è quella di Exa-cel (Casgevy®) nel 2023, il primo farmaco basato sulla tecnologia di editing genetico CRISPR/Cas9. Viene usato per trattare due gravi malattie del sangue: anemia falciforme e beta-talassemia. Il trattamento funziona così: si prelevano dal paziente le cellule staminali del sangue, si modificano in laboratorio con CRISPR/Cas9 per attivare la produzione di emoglobina fetale (una versione dell'emoglobina che non causa i problemi tipici di queste malattie), e poi si introduce nuovamente nel paziente. Questo tipo di approccio rappresenta bene il potenziale delle terapie basate su acidi nucleici: una singola cura che può avere effetti a lungo termine.

La storia delle terapie a base di acidi nucleici è un susseguirsi di scoperte scientifiche fondamentali e innovazioni tecnologiche:

- 1869: Friedrich Miescher scopre la nucleina (iniziale identificazione degli acidi nucleici).
- 1953: la determinazione della struttura a doppia elica del DNA da parte di James Watson e Francis Crick.
- 1956: Rich e Davies dimostrano che l'RNA può formare strutture a doppio filamento.

- 1972: Friedmann e Roblin propongono l'idea della terapia genica per le malattie ereditarie
- 1978: Zamecnik e Stephenson utilizzano un oligodeossinucleotide antisense per inibire la replicazione virale (prototipo degli ASO)
- Primi anni '90: Sviluppo della metodologia SELEX per la selezione di aptameri.
- 1998: Approvazione di Fomivirsen (Vitravene®), il primo farmaco ASO.
- 2000: una nucleasi RNA-diretta media il silenziamento genico post-trascrizionale, gettando le basi per la comprensione dell'RNAi e dei siRNA.
- 2004: Approvazione di Pegaptanib (Macugen®), il primo farmaco aptamero
- 2016/2017: Approvazione di Nusinersen, un ASO per la SMA.
- 2018: Approvazione del primo farmaco siRNA, Patisiran.
- 2020: Approvazione di vaccini a mRNA per il COVID-19, basati su tecnologia LNP-mRNA.
- 2023: Approvazione della prima terapia basata su CRISPR/Cas9, Exa-cel.

Questo filo temporale di eventi evidenzia la rapida evoluzione della medicina, partendo da concetti teorici e scoperte biologiche fondamentali per arrivare alle terapie innovative che stanno già ampiamente cambiando la pratica clinica.

2.0: FARMACI A BASE DI ACIDI NUCLEICI: MECCANISMI E APPLICAZIONI CLINICHE

2.0: Farmaci a base di acidi nucleici: meccanismi e applicazioni cliniche

Per quasi mezzo secolo, la comunità scientifica ha ipotizzato la possibilità di trattare le malattie genetiche ereditarie, che causano prodotti genici disfunzionali, introducendo una copia genica funzionale. Oggi, le tecnologie che consentono la somministrazione di acidi nucleici sono in prima linea negli sforzi globali, come dimostrato dalla lotta alla pandemia di COVID-19.

A differenza dei farmaci convenzionali, che generalmente agiscono attaccando direttamente le proteine, i farmaci genetici modulano l'espressione genica per indurre effetti terapeutici. Agiscono inserendo gli acidi nucleici “dall'esterno” nelle cellule per correggere geni difettosi. Questo nuovo processo è un approccio molto interessante, perché può portare ad effetti mirati, duraturi e in alcuni casi anche curativi, sia per malattie ereditarie che per quelle acquisite. I NADs (acidi nucleici di nuova generazione) rappresentano una nuova forma di editing genetico che si distingue per garantire un'alta efficienza ed elevata velocità con cui possono essere sviluppati. Proprio per questo motivo, oggi sono uno dei temi più studiati nella ricerca di nuovi farmaci.

Possono funzionare in modi diversi: ad esempio, bloccando l'espressione di un gene (repressione), sostituendolo o modificandolo direttamente (editing genetico).

Nonostante il loro potenziale, l'impiego di acidi nucleici come farmaci presenta diverse criticità di ordine biologico e biochimico. Gli acidi nucleici sono suscettibili alla degradazione da parte delle nucleasi (enzimi endogeni), inoltre possono contribuire all'attivazione immunitaria e possiedono caratteristiche fisico-chimiche sfavorevoli che ostacolano il loro facile ingresso nelle cellule.

Per superare questi ostacoli, è fondamentale usare sistemi di delivery avanzati, cioè tecnologie in grado di trasportare gli acidi nucleici in modo sicuro ed efficace fino alle cellule bersaglio.

L'efficacia di queste terapie è facilitata se si verificano:

- modifiche chimiche che proteggano gli acidi nucleici dalla degradazione,
- stabilità nella circolazione sanguigna,
- capacità di arrivare al tessuto giusto,
- e infine dalla capacità di entrare nelle cellule e rilasciare il contenuto nel citoplasma.

Non esiste una soluzione unica valida per tutto: non basta una sola modifica o un “vettore universale” per risolvere tutti i problemi legati al trasporto. I NADs devono:

- resistere agli attacchi del sistema immunitario,
- non essere eliminati troppo velocemente dal corpo,

- arrivare nei tessuti corretti,
- e essere ben tollerati (biocompatibili).

In breve, il successo dei NADs dipende in gran parte da quanto bene riusciamo a trasportarli dove devono agire senza che vengano distrutti o causino reazioni indesiderate.

Quando parliamo di farmaci a base di acidi nucleici, ci riferiamo a tutti quei farmaci che sono sviluppati in modo da usare il DNA o RNA per modificare l'espressione dei geni. Questi farmaci possono funzionare in modi diversi: possono bloccare un gene, aggiungerne uno nuovo, sostituirlo, oppure modificandolo direttamente (editing). I NADs (acidi nucleici di nuova generazione) rientrano in questa categoria e, in base al meccanismo con cui agiscono, si possono dividere in diversi tipi: oligonucleotidi antisenso (ASOs), small interfering RNA (siRNA), farmaci a base di mRNA, editing genetico.

2.1 Oligonucleotidi Antisenso (ASOs)

Gli oligonucleotidi antisenso (ASOs) sono brevi filamenti di acidi nucleici a singolo filamento, progettati per legarsi con elevata affinità e specificità a sequenze complementari di RNA bersaglio. Questo legame può inibire l'espressione genica attraverso diversi meccanismi d'azione. Il più comune è la degradazione dell'mRNA bersaglio mediata dall'enzima RNasi H1, che riconosce il doppio filamento ibrido formato tra l'ASO e l'RNA e ne promuove la scissione.

Altri meccanismi includono la modifica dello splicing, l'inibizione della traduzione e il blocco dell'interazione RA-proteina. Le scoperte sul modo in cui gli ASOs possono influenzare lo splicing e la traduzione hanno ampliato le loro applicazioni terapeutiche.

Le modifiche chimiche sono fondamentali per migliorare le caratteristiche degli ASO approvati per uso terapeutico, hanno significativamente ampliato le loro applicazioni terapeutiche rendendoli strumenti poliedrici nel trattamento di diverse patologie.

Le modifiche precedentemente menzionate possono essere fatte in vari punti della molecola per renderla più efficace:

- Allo scheletro fosfodiesterico, ad esempio con legami fosforotioati (PS), che aumentano la stabilità dell'ASO nel corpo e fanno in modo tale da legarsi a specifiche sequenze di mRNA inibendo così la sintesi delle proteine.
- Allo zucchero, con gruppi come 2'-O-metile (2'-OMe), 2'-fluoro (2'-F) o locked nucleic acids (LNA), cioè l'acido nucleico a catena bloccata, che migliorano il legame con l'RNA bersaglio e la resistenza alla degradazione;

- Alle basi azotate, ad esempio con modifiche come il constrained ethyl (cEt), che aumentano l'affinità per l'RNA target e possono ridurre l'attivazione del sistema immunitario.

Un vantaggio importante degli ASO è che spesso non hanno bisogno di vettori complessi per entrare nelle cellule, anche se le modifiche sono essenziali per renderli stabili ed efficaci. Tuttavia, in alcuni casi specifici, come quando devono agire nel sistema nervoso centrale (SNC), è necessario iniettarli direttamente nel liquido cerebrospinale (iniezione intratecale), perché non riescono a passare la barriera emato-encefalica se somministrati per via sistemica.

Esempi clinici di ASOs includono:

- (Spinraza): Approvato per il trattamento dell'atrofia muscolare spinale (SMA) in pazienti pediatrici e adulti. Viene somministrato tramite iniezione intratecale per raggiungere il SNC. Studi clinici di Fase 3 hanno dimostrato una riduzione del rischio di morte o ventilazione permanente e miglioramenti significativi nelle capacità motorie.
- Inotersen (Tegsedi): Approvato per l'amiloidosi ereditaria da transtiretina (hATTR).
- Volanesorsen (Waylivra): Approvato per la sindrome da chilomicronemia familiare (FCS).
- Tominersen e Tofersen (BIIB067) sono altri ASOs in fase avanzata di valutazione clinica per la malattia di Huntington e la sclerosi laterale amiotrofica (ALS) rispettivamente, somministrati anch'essi intratecalmente.

2.2 (siRNA)

Il siRNA (small interfering RNA) è una molecola di RNA a doppio filamento lunga tipicamente 19-23 paia di basi, che rappresenta una forma classica di silenziamento genico naturale mediato a RNAi.

L'RNA interference (RNAi) è un meccanismo naturale di difesa delle cellule che serve ad inibire selettivamente l'espressione di determinati geni. Si tratta di una forma di difesa cellulare che agisce degradando l'RNA messaggero prima che venga tradotto in proteina, bloccando così la sintesi di proteine specifiche.

Tra gli strumenti chiave di questo processo vi è lo small interfering RNA (siRNA), una molecola a doppio filamento in grado di mediare il silenziamento genico in modo preciso. In pratica, il siRNA riesce a bloccare la produzione di proteine impedendo che l'mRNA venga tradotto. A differenza degli ASO, che funzionano attivando un enzima chiamato RNasi H, il siRNA agisce formando un complesso con alcune proteine della cellula, in particolare con Argonaute-2 (AGO2). Questo complesso si chiama RISC (RNA-induced silencing complex), ed è quello che “taglia” l'mRNA.

Quando il siRNA entra nella cellula:

1. Si lega alla proteina AGO2.
2. Uno dei due filamenti del siRNA (quello chiamato “passeggero”) viene eliminato.
3. L'altro filamento (quello guida) resta legato alla proteina e si aggancia all'mRNA bersaglio.
4. Una volta agganciato, il complesso RISC taglia l'mRNA, impedendo che venga trasformato in proteina.

In questo modo, il siRNA riduce la produzione di proteine specifiche, ottenendo un effetto terapeutico utile in varie malattie.

Come gli ASOs, il siRNA richiede modificazioni chimiche (come 2'-OMe, 2'F e legami fosforotioati) e strategie di veicolazione per superare sfide quali stabilità, specificità e ostacoli nel trasporto. I siRNA utilizzano coniugazioni di acidi nucleici per il rilascio, mentre gli mRNA spesso si affidano ai nanovettori lipidici (LNPs) per compressione e incapsulamento.

(2)

Una delle tecnologie più importanti per far arrivare i siRNA alle cellule giuste è quella dei coniugati GalNAc (che sta per N-acetilgalattosamina). In pratica, si tratta di molecole particolari attaccate al siRNA che aiutano a guidarlo verso il fegato, cioè verso gli epatociti. Queste molecole GalNAc vengono legate in modo stabile e formano una struttura trivalente – cioè con tre biforcazioni che permettono un aggancio molto efficace a un recettore presente sugli epatociti. Insieme a queste molecole guida, si usano anche delle modifiche chimiche sul siRNA stesso, che servono a migliorarne la stabilità, la durata nel corpo e l'efficacia terapeutica.

Ci sono diversi esempi di farmaci siRNA già approvati o in fase avanzata di sviluppo clinico; alcuni di questi usano la tecnologia delle nanoparticelle lipidiche (LNP), altri invece sfruttano i coniugati GalNAc per arrivare in modo mirato al fegato. Ecco i principali:

- Patisiran (Onpattro®): È stato il primo farmaco siRNA approvato. Serve per trattare una malattia genetica rara chiamata amiloidosi da transtiretina. Funziona bloccando l'mRNA che produce la proteina transtiretina (TTR), che in questi pazienti è difettosa. Viene incapsulato in nanoparticelle lipidiche per essere trasportato alle cellule. Gli studi clinici hanno mostrato una riduzione dell'80% della TTR nel sangue e un miglioramento dei sintomi, tanto che in alcuni casi sembra fermare o invertire la progressione della malattia.
- Inclisiran (Leqvio®): È un siRNA coniugato con GalNAc, approvato per abbassare il colesterolo LDL. Agisce bloccando un gene chiamato PCSK9, che regola i livelli di colesterolo.
- Nedosiran (Rokadyn®): agisce per trattare varie forme di iperossaluria primitiva (PH).

2.3. mRNA Terapeutico e Vaccinale

Nel campo delle terapie basate su RNA, sono state esplorate diverse strategie. Una di queste è la terapia di sostituzione proteica mediata da mRNA, che prevede l'introduzione di un mRNA esogeno nelle cellule, così che queste possano produrre una proteina che manca o che non funziona bene. Questa tecnica è utile, ad esempio, per i pazienti che hanno carenze di enzimi essenziali, cioè proteine fondamentali che il loro corpo non riesce a produrre da solo. L'mRNA veicola l'informazione genetica necessaria fornendo alle cellule le istruzioni temporanee per sintetizzare la proteina terapeutica esogena compensando così il malfunzionamento o l'assenza della proteina endogena. Il secondo approccio, è quello che ha visto il successo più eclatante di recente, riguarda i vaccini a mRNA. Questi vaccini introducono mRNA che codifica per un antigene specifico (ad esempio, la proteina Spike del SARS-CoV-2) nelle cellule, dove viene tradotto per indurre una risposta immunitaria protettiva.

Gli mRNA spesso richiedono l'aiuto di vettori di trasporto, con le nanoparticelle lipidiche (LNPs) che giocano un ruolo cruciale per la loro incapsulazione e veicolazione.

Esempi clinici di farmaci a base di mRNA includono:

- BNT162b2 (Comirnaty) e Elasmolan (Spikevax): Vaccini a mRNA approvati per la prevenzione di COVID-19. Questi vaccini utilizzano LNPs per la veicolazione dell'mRNA.

2.4 Terapie di Editing Genomico (CRISPR/Cas9)

Il gene editing o anche denominato editing genomico, è una tecnica che permette di modificare in modo molto preciso il DNA, cambiando o correggendo specifici geni. Si può usare per inserire, cancellare o modificare parti del DNA. Una delle tecnologie più famose per farlo è il sistema CRISPR/Cas9, molto efficiente e preciso.

In natura, CRISPR/Cas9 è un sistema di difesa dei batteri contro virus o materiale genetico estraneo. I ricercatori però hanno imparato a usarlo per modificare il DNA anche nelle cellule umane.

Il sistema usa due componenti principali:

- una proteina chiamata Cas9, che taglia il DNA,
- e un piccolo pezzo di RNA guida (sgRNA), che dice a Cas9 dove tagliare.

Una volta tagliato il DNA (si parla di rottura a doppio filamento), la cellula prova a ripararlo. Durante questa riparazione, possiamo ottenere:

- mutazioni (se la riparazione è imprecisa),
- oppure inserire un nuovo gene (se forniamo un “modello” da copiare durante la riparazione)

Questa tecnologia è promettente per trattare molte malattie, come quelle genetiche, alcuni tipi di tumori e malattie del sangue. Ma ci sono anche dei problemi da risolvere, come:

- la difficoltà nel far arrivare CRISPR nelle cellule giuste (problema di veicolazione),
- possibili errori (modifiche in punti sbagliati del DNA) ed effetti collaterali.

Come viene introdotto CRISPR nelle cellule:

Ci sono tre modi principali:

1. Come complesso già formato (Cas9 + RNA guida),
2. Come mRNA che farà produrre Cas9 nella cellula,
3. Come plasmide di DNA che contiene le istruzioni per fare sia Cas9 che l'RNA guida.

Exa-cel (Casgevy) è stato approvato nel 2023 ed è il primo farmaco basato su CRISPR/Cas9.

Si usa per trattare:

- Anemia falciforme (SCD),
- Beta-talassemia dipendente da trasfusioni (TDT).

In pratica, vengono prese le cellule staminali del sangue del paziente, modificate in laboratorio con CRISPR per produrre emoglobina fetale (una forma sana di emoglobina), e

poi reintrodotte nel paziente. Questo approccio ha aperto la strada a tanti altri studi di terapia genica.

2.5 Altre Classi

Ci sono anche altre categorie di acidi nucleici terapeutici che stanno ricevendo attenzione:

- **Aptameri:** sono brevi filamenti di DNA o RNA che si ripiegano permettendo di legarsi in modo molto preciso a specifiche proteine, un po' come fanno gli anticorpi. Possono essere usati per bloccare l'attività di queste proteine.
- **microRNA (miRNA):** sono piccoli RNA non codificanti che regolano naturalmente l'espressione genica nel nostro corpo. Fanno in modo tale da ridurre la produzione di proteine da specifici mRNA. In terapia si possono usare in due modi: o imitandoli, se vogliamo aumentare il loro effetto, oppure bloccandoli (inibitori), se sono coinvolti in processi patologici.
- **Small Activating RNA (saRNA):** a differenza degli altri, questi piccoli RNA attivano invece che bloccare l'espressione di certi geni, legandosi a regioni chiamate promotori.

2.6. Tecnologie di rilascio.

La vittoria per poter usare questi tipi di farmaci dipende molto da come riusciamo a portarli nelle cellule in modo sicuro ed efficace. Per questo, sono state sviluppate delle tecnologie di rilascio che servono a proteggerli dalla degradazione, a farli entrare meglio nelle cellule e a guidarli verso il loro bersaglio.

Ad oggi, sono quattro le principali vie che hanno permesso di portare questi farmaci nei pazienti:

1. ASO (oligonucleotidi antisenso): molecole chimicamente modificate che si legano all'RNA per bloccarne la funzione.
2. siRNA coniugati con GalNAc: piccole molecole di RNA che silenziano i geni, modificate per legarsi in modo specifico alle cellule del fegato grazie al legame con il GalNAc.
3. Nanoparticelle lipidiche (LNP): "gusci" di lipidi che trasportano l'RNA (come nei vaccini mRNA) e lo proteggono finché non arriva dentro la cellula.

4. Vettori virali AAV: virus modificati usati per portare un gene sano dentro le cellule, soprattutto nei trattamenti di terapia genica.

Menzione particolare sugli acidi nucleici per poterli rendere più efficaci come farmaci, è il modificarli chimicamente. Queste modifiche aiutano a migliorare il modo in cui si comportano nel corpo (la loro farmacocinetica) e a ridurre la possibilità che attivino il sistema immunitario.

Ad esempio, come visto negli ASO e nei siRNA, si possono fare modifiche a diverse parti della molecola:

- Allo scheletro: come i legami fosforotioati (PS), che li rendono più resistenti alla degradazione.
- Allo zucchero: con modifiche come 2'-O-metile (2'-OMe), 2'-fluoro (2'F) che aumentano la stabilità e l'affinità per l'RNA bersaglio.
- Alle basi azotate: per migliorare la precisione e ridurre effetti collaterali.

Tutte queste modifiche aiutano gli acidi nucleici a durare di più nell'organismo, raggiungere meglio i tessuti giusti, legarsi con più precisione al bersaglio e a non scatenare una reazione immunitaria.

I coniugati GalNAc rappresentano una tecnologia di rilascio mirata, particolarmente efficace per la veicolazione di siRNA agli epatociti. Il ligando GalNAc si lega con alta affinità al recettore delle asialoglicoproteine, abbondantemente espresso sugli epatociti. Questo legame favorisce l'endocitosi mediata da recettore negli epatociti. Questa strategia ha permesso lo sviluppo di diversi farmaci siRNA approvati per malattie epatiche o sistemiche gestibili tramite silenziamento genico nel fegato.

Nanoparticelle Lipidiche (LNPs)

Le nanoparticelle lipidiche (LNPs) sono una tecnologia molto utile per “trasportare” gli acidi nucleici dentro le cellule. Sono in sviluppo da circa 25 anni e hanno avuto un ruolo fondamentale nella creazione di farmaci a base di siRNA e mRNA, come i vaccini per il COVID-19. Immaginatoci come dei gusci contenitori.

Le LNPs sono fatte da quattro componenti principali:

1. Lipidi cationici ionizzabili, che aiutano a “catturare” l'acido nucleico e rilasciarlo nella cellula.
2. Fosfolipidi, che aiutano a formare la struttura della particella.
3. Colesterolo, che dà stabilità.

4. PEG-lipidi, che aiutano le particelle a rimanere nel sangue senza essere subito eliminate.

Tutti questi componenti sono pensati per proteggere l'RNA, mantenerlo stabile e farlo arrivare dove serve, senza essere attaccato dal sistema immunitario. Le particelle hanno una dimensione di circa 50 nanometri, abbastanza piccole da passare attraverso gli epatociti nel fegato (che è un organo bersaglio molto comune).

Un esempio importante è Patisiran, un farmaco basato su siRNA, e ovviamente i vaccini mRNA per il COVID-19, che hanno mostrato quanto questa tecnologia sia efficace.

Vettori Virali (AAV)

I vettori derivati da virus adeno-associati (AAV) sono una nuova frontiera usata per la veicolazione di acidi nucleici nelle cellule. Questi vettori trasportano un filamento singolo di DNA (ssDNA) contenente un promotore, il gene terapeutico (cioè quello che vogliamo far funzionare), e un segnale di poliadenilazione (che serve per concludere correttamente l'espressione del gene). Gli AAV sono stati utilizzati con successo in terapie geniche. Un esempio clinico notevole è Voretigeneparvovec (Luxturna), un farmaco basato su AAV approvato per il trattamento della distrofia retinica ereditaria associata a mutazioni del gene RPE65.

Oltre alle quattro piattaforme principali, è possibile l'esplorazione di altri sistemi di trasporto, inclusi i sistemi di rilascio basati su peptidi. La combinazione di modificazioni chimiche degli acidi nucleici con sistemi di trasporto combinati o intelligenti, che rispondono a cambiamenti nell'ambiente fisiologico, è considerata promettente per migliorare ulteriormente l'efficacia terapeutica e ridurre la tossicità.

Il numero crescente di farmaci a base di acidi nucleici approvati dimostra il loro potenziale nel trattare le malattie e quanto il risultato ottenuto è stato uno dei traguardi più importanti della medicina. Infatti, a riprova di ciò si è visto come questi farmaci hanno raggiunto l'obiettivo di ottenere effetti a lungo termine o addirittura curativi. I farmaci a base di acidi nucleici attualmente in commercio e quelli in fase di sviluppo rappresentano spesso opzioni terapeutiche preziose per pazienti che in precedenza avevano limitate o nessuna opzione di trattamento.

Il successo di questa nuova svolta farmacologica ha spinto la ricerca a migliorare sempre di più la specificità verso i tessuti target e ad ampliare le possibili applicazioni terapeutiche. All'inizio, i NADs (ribadiamo, i farmaci a base di acidi nucleici) venivano soprattutto usati

per trattare malattie genetiche rare, ma oggi il loro utilizzo si sta allargando anche a malattie più comuni, come: malattie croniche (es. colesterolo alto, diabete), malattie infettive (es. virus), e malattie oftalmiche. Un esempio evidente di quanto i NADs possano avere un impatto concreto e veloce è rappresentato dai vaccini a mRNA contro il COVID-19, che sono stati sviluppati e approvati in tempi record, salvando milioni di vite. Un altro esempio molto promettente è Exa-cel, una terapia di gene editing per l'anemia falciforme e la beta-talassemia, che offre un trattamento potenzialmente curativo con una sola somministrazione capace di avere un effetto a lungo termine.

3.0: STRATEGIE DI VEICOLAZIONE DEI FARMACI A BASE DI ACIDI NUCLEICI

3.0 Strategie di veicolazione dei Farmaci a Base di Acidi Nucleici.

I farmaci a base di acidi nucleici (NADs) rappresentano una svolta promettente nel trattamento di un'elevata quantità di malattie, permettendo di agire a monte, cioè direttamente sulle cause genetiche o di modulare l'espressione genica con elevata specificità. A differenza dei farmaci convenzionali, presenti in commercio da anni e che spesso prendono di mira le proteine, i NADs sono molecole di dimensione più elevate e cariche negativamente, che presentano caratteristiche sfavorevoli per l'attraversamento delle membrane cellulari e sono suscettibili alla degradazione nell'ambiente biologico. Da qui possiamo percepire la difficoltà nel trovare un metodo per poter far attraversare queste molecole senza difficoltà (59-61). Sono state sviluppate diverse strategie che prevedono la somministrazione dei NADs, combinando modifiche chimiche innovative e sofisticate piattaforme di veicolazione, per migliorare la loro stabilità, specificità e l'efficacia terapeutica.

La somministrazione efficace e sicura dei NADs è un processo complesso che richiede il superamento di diverse barriere biologiche nel corpo umano. Le principali sfide sono varie:

- **Instabilità e Degradazione:** I NADs, una volta immessi nel flusso sanguigno o nei tessuti, sono altamente suscettibili alla degradazione da parte di nucleasi endogene e a processi chimici (come ossidazione e idrolisi). Questa rapida degradazione riduce la loro emivita e la concentrazione a livello del sito d'azione.
- **Riconoscimento da Parte del Sistema Immunitario:** gli acidi nucleici esogeni, possono essere riconosciuti dal sistema immunitario come qualcosa di esterno da dover eliminare. Questo avviene tramite i recettori di riconoscimento del pattern (PRRs). Quando questi recettori li individuano, possono attivare reazioni immunitarie indesiderate che rischiano di danneggiare la struttura degli acidi nucleici o di farli degradare troppo in fretta, rendendo il farmaco meno efficace o instabile.
- **Problemi di Target:** Molti farmaci a base di acidi nucleici (NADs), quando vengono somministrati per via sistemica, non riescono a raggiungere bene il tessuto designato, ciò perché non hanno un buon meccanismo naturale per riuscire ad arrivarci in modo specifico. Questo significa che si distribuiscono un po' ovunque nel corpo, e quindi solo una piccola parte del farmaco arriva davvero dove serve. Inoltre, il fatto che

possano finire anche in cellule o tessuti non desiderati può causare effetti collaterali o problemi di sicurezza, perché il farmaco potrebbe agire dove non dovrebbe.

- **Inefficienza nell'Assorbimento Cellulare e nell'Escape Endosomiale:** I NADs essendo macromolecole cariche negativamente, hanno difficoltà ad attraversare la membrana plasmatica, anch'essa carica negativamente, per entrare nelle cellule. Anche quando riescono a entrare, spesso tramite endocitosi vengono fagocitati e rimangono intrappolati negli endosomi. La conseguenza di questa problematica per la quale i NADs non riescono ad uscire è che se i NADs rimangono negli endosomi, vengono successivamente degradati dai lisosomi, limitando drasticamente la quantità di farmaco che raggiunge il citoplasma o il nucleo per esercitare il suo effetto terapeutico. Oltre a queste sfide biologiche, esistono anche ostacoli legati alla produzione su larga scala (scalabilità) e ai costi, che influenzano l'accessibilità e quanto queste terapie possono essere economicamente dispendiose per il pubblico. Per affrontare le sfide di somministrazione, la ricerca si è concentrata su due approcci principali: le modifiche chimiche dirette dei NADs e lo sviluppo di sistemi di veicolazione efficienti e mirati. Le modifiche chimiche mirano a migliorare la stabilità, l'affinità per il bersaglio, la resistenza alle nucleasi, la farmacocinetica e a ridurre l'immunogenicità e la tossicità dei NADs. Le principali strategie di modifica includono interventi sullo scheletro fosfodiesterico, sul ribosio e sulle nucleobasi.
- **Modifiche dello Scheletro:** Le primissime modifiche chimiche fatte sugli oligonucleotidi si sono concentrate sullo scheletro fosfodiesterico. Una modifica importante è stata quella di sostituire un atomo di ossigeno con uno di zolfo, creando così i fosforotioati (PS). Questa modifica ha portato diversi vantaggi: rende la molecola più resistente alla degradazione da parte degli enzimi (nucleasi), la fa durare di più nel sangue e rallenta l'eliminazione attraverso i reni; quindi, il farmaco resta in circolo più a lungo. Tuttavia, nonostante le modifiche ci sono degli effetti da tenere in considerazione: i fosforotioati possono anche causare infiammazioni e danni al fegato. (88-90) Un esempio famoso è Vitravene (fomivirsen), il primo oligonucleotide antisense approvato, che usava proprio questa modifica. Purtroppo, è stato poi ritirato dal mercato anche per via degli effetti infiammatori che causava.

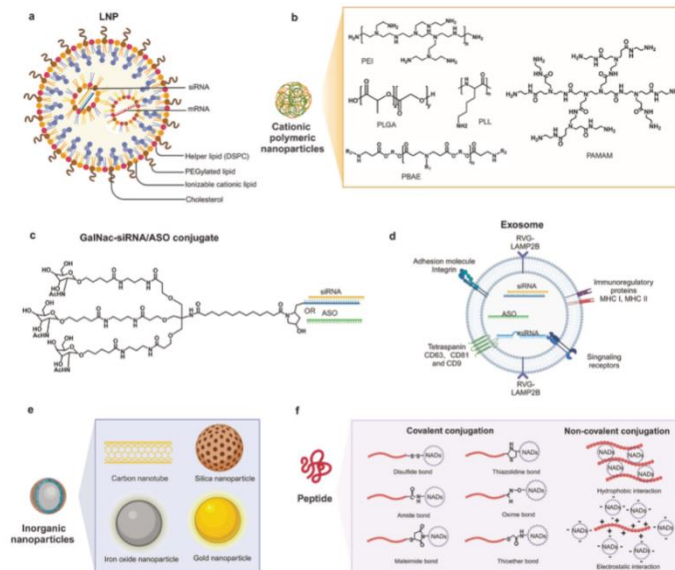
- **Modifiche del Ribosio:** Successivamente si sono verificate ulteriori modifiche per far sì che questi farmaci potessero finalmente diventare una nuova terapia in commercio; queste modifiche si concentrano spesso sulla posizione 2' del ribosio. Esempi comuni includono 2'-O-metile (2'-OMe), 2'-O-metossietile (2'-MOE) e 2'-fluoro (2'-F). Queste modifiche hanno fatto in modo tale da aumentare in maniera significativa l'affinità per l'RNA bersaglio e la resistenza alle nucleasi. Alcuni ASO terapeutici molto efficaci, come Spinraza (nusinersen) e Tegsedi (inotersen), includono modifiche chimiche chiamate 2'-MOE (cioè modifiche dello zucchero a livello della posizione 2'), che aumentano la stabilità e migliorano l'affinità per l'RNA bersaglio.
- Per quanto riguarda i siRNA, si stanno sperimentando modifiche “duali” a livello dello zucchero, come le 2',4'- e 2',5'-, che aiutano a migliorare la stabilità e l'efficienza del silenziamento genico. Un altro tipo di modifica sono i LNA (LockedNucleicAcids): questi acidi nucleici hanno una struttura bloccata grazie a un ponte chimico tra due atomi dello zucchero (C4' e O2'). Questo blocca la flessibilità della molecola e la rende molto stabile e affine al target. Al contrario, esistono anche gli UNA (UnlockedNucleicAcids): questi non hanno un legame tra C2' e C3', quindi sono più flessibili. Questa flessibilità può essere utile per migliorare l'efficacia e la stabilità dei siRNA in alcuni contesti.
- **Modifiche delle Nucleobasi:** Anche le modifiche alle basi azotate possono avere effetti importanti sui farmaci a base di acidi nucleici. Cambiare una base può aumentare la stabilità, migliorare l'attività biologica e ridurre il rischio di attivare una risposta immunitaria indesiderata. Ad esempio, sostituire la citosina con la 5-metilcitosina (5mC) può ridurre l'attivazione del sistema immunitario, senza compromettere l'appaiamento con la guanina (quindi senza rompere la complementarità di Watson-Crick). Un altro esempio importante è la pseudouridina (Ψ), usata nei vaccini a mRNA contro il COVID-19. Questa modifica ha aiutato a ridurre l'immunogenicità (cioè il rischio di reazione immunitaria contro l'mRNA) e a migliorare l'efficienza della produzione di proteine.

- **Analoghi degli Acidi Nucleici:** Alcuni farmaci a base di acidi nucleici (NADs) usano scheletri completamente diversi da quelli naturali, per migliorare le loro proprietà. Un esempio sono i PMO (oligomerimorfolinicifosforodiamidati), che non hanno carica elettrica e funzionano bloccando fisicamente l'RNA, ma non attivano RNasi H1. Farmaci PMO come eteplirsen, golodirsen, viltolarsen e casimersen sono stati approvati per la distrofia muscolare di Duchenne (DMD). Tuttavia, proprio perché sono neutri, i PMO vengono eliminati velocemente dai reni, quindi serve una dose alta, che però può causare tossicità. Un altro esempio sono i PNA (acidi nucleici peptidici), che hanno uno scheletro tipo peptidico. Sono molto stabili e si legano bene all'RNA, ma hanno problemi di scarsa distribuzione nel corpo e entrano con difficoltà nelle cellule. In pratica, per ottenere buoni risultati clinici, i NADs spesso combinano più modifiche. Per esempio, uno scheletro PS (fosforotioato) combinato con modifiche allo zucchero può mantenere la resistenza alle nucleasi e aumentare l'affinità per l'RNA target. Un altro esempio sono i "gapmer", che hanno una parte centrale di desossinucleotidi normali (per attivare RNasi H1) e due estremità modificate (per aumentare stabilità e potenza).

Nonostante le modifiche chimiche siano una vittoria ben evidente, si è notato che non sono abbastanza per la somministrazione efficace dei NADs. Un esempio evidente sono i NADs che hanno dimensioni molto elevate, come siRNA e mRNA, che richiedono dei trasportatori per superare le barriere cellulari e biologiche. I sistemi di rilascio garantiscono la riuscita della veicolazione proteggendo il farmaco dalla degradazione, facilitano l'ingresso cellulare, il targeting tissutale/cellulare e l'escape endosomiale.

Nanoparticelle Lipidiche (LNPs): Le LNPs sono una delle svolte più significative nel campo del trasporto dei farmaci per i NADs, in particolare siRNA e mRNA. Sono composte tipicamente da quattro componenti chiave: lipidi ionizzabili o cationici, fosfolipidi di supporto, colesterolo e lipidi PEG-ilati. I lipidi ionizzabili sono una parte fondamentale delle nanoparticelle lipidiche; servono per incapsulare bene gli acidi nucleici, che sono carichi negativamente. A pH acido, i lipidi si caricano positivamente e aiutano a catturare l'RNA o il DNA. A pH fisiologico (come nel sangue), però, tornano neutri, il che è importante per ridurre la tossicità e risposte immunitarie. Ma una volta che le LNPs vengono assorbite dalle cellule e finiscono in un ambiente più acido (come gli endosomi), questi lipidi si caricano positivamente, aiutando il farmaco ad uscire dall'endosoma e a raggiungere il citoplasma.

Questo meccanismo di fuga endosomale è cruciale. Un esempio importante è il DLin-MC3-DMA, usato in Onpattro®.



(Fig 2)

Fosfolipidi: Aiutano a stabilizzare la struttura delle LNPs.

Colesterolo: Contribuisce alla stabilità della membrana delle LNPs e ne facilita l'ingresso nelle cellule.

Lipidi PEG (glicolepolietilenico): Sono come un rivestimento esterno che aiuta a prevenire che le nanoparticelle si uniscano tra loro e che vengano rapidamente eliminate dal corpo. Tuttavia, se usati troppo o troppo a lungo, possono a volte causare problemi di risposta immunitaria.

Le LNPs sono particolarmente brave a consegnare farmaci al fegato, perché le cellule del fegato (gli epatociti) hanno un recettore specifico (il recettore delle lipoproteine a bassa densità) che "cattura" le LNPs che hanno adsorbito una proteina chiamata ApoE.. Queste nanoparticelle sono state fondamentali per lo sviluppo di farmaci come Patisiran (Onpattro®) e, più recentemente, per i vaccini a mRNA contro il COVID-19 come Comirnaty e Spikevax. Hanno anche aperto la strada a terapie di editing genetico.

Coniugati GalNAc-siRNA/ASO: Questa strategia è fondamentale per indirizzare gli acidi nucleici, in particolare i siRNA (che ricordiamo essere piccole molecole di RNA che silenziano

i geni), al fegato. Il segreto è la molecola GalNAc (N-acetilgalattosamina). Il meccanismo che segue è esplicativo della sua funzione: Il GalNAc è un carboidrato che si lega in modo molto specifico a un recettore chiamato ASGPR (asialoglicoproteina recettore), che si trova in grande quantità sulla superficie delle cellule del fegato (gli epatociti). Questa interazione permette al farmaco di essere catturato dalla cellula attraverso un processo chiamato endocitosi. Dopo essere entrato, il GalNAc si stacca e il recettore torna in superficie, pronto a catturare altre molecole, garantendo un'assunzione continua del farmaco.

Poiché questi coniugati non sono racchiusi in una nanoparticella, è cruciale che i siRNA siano chimicamente modificati per essere stabili nel sangue e non degradarsi. Modifiche allo scheletro del siRNA o agli zuccheri che lo compongono (come 2'-OMe, 2'-fluoro e legami fosforotioato) aumentano la loro resistenza agli enzimi e riducono l'attivazione del sistema immunitario. Possono essere somministrati tramite iniezione sottocutanea, il che è più comodo per il paziente. Farmaci come Givosiran (Givlaari®) per l'atrofia epatica acuta, Inclisiran (Leqvio®) per l'ipercolesterolemia e Lumasiran (Oxlumo®) per la ossaluria primaria, usano questa tecnologia per colpire il fegato.

Vettori Virali: I vettori derivati da virus, come gli adeno-associati virus (AAV) e i retrovirus/lentivirus, sono stati ampiamente studiati come veicoli di rilascio per la terapia genica. La loro caratteristica più importante è la capacità di trasportare attivamente il DNA direttamente nel nucleo della cellula. Questo è fondamentale per i farmaci a base di DNA, poiché il DNA funziona solo all'interno del nucleo. Gli AAV non si replicano da soli (hanno bisogno di un "virus helper") e integrano il loro DNA nel genoma dell'ospite con una frequenza molto bassa, riducendo il rischio di genotossicità. Esistono diversi tipi di AAV, ognuno con un tropismo, cioè una predilezione per tipi specifici di cellule o tessuti, il che permette un targeting mirato. Luxturna® è un farmaco per una forma di cecità ereditaria (amaurosi congenita di Leber), somministrato direttamente nell'occhio. Zolgensma® per l'atrofia muscolare spinale (SMA). Ci sono anche vettori adenovirus usati per vaccini, come alcuni vaccini COVID-19.

Nanoparticelle Polimeriche Cationiche: I sistemi basati su polimeri cationici sintetici o naturali formano complessi con i NADs tramite interazioni elettrostatiche: complessi formati da polimeri che hanno cariche positive e che interagiscono con la carica negativa degli acidi nucleici. Questi complessi possono entrare nelle cellule tramite endocitosi e sfruttare l'effetto

"spugna protonica" per favorire l'escape endosomiale. Polietilenimina (PEI) e poli-L-lisina (PLL) sono esempi studiati, sebbene la tossicità e la bassa efficienza siano limitazioni che richiedono modifiche funzionali.

Esosomi: Gli esosomi sono delle piccole vescicole con un diametro di 40-160 nanometri. Hanno una struttura a monolayer lipidico che racchiude proteine, lipidi, DNA e RNA, e sono un mezzo di comunicazione tra le cellule. Possono trasportare il loro carico in modo molto efficiente e, cosa molto importante, sono in grado di attraversare barriere difficili come la barriera emato-encefalica, che normalmente blocca la maggior parte dei farmaci destinati al cervello. Le sfide includono il caricamento efficiente dei NADs, infatti ci sono due vie:

Via esogena: Si prendono esosomi già isolati e si caricano i NADs dall'esterno, ad esempio usando elettroporazione (una tecnica che apre temporaneamente pori nella membrana con impulsi elettrici) o semplicemente incubandoli con il farmaco. Questa via è più semplice e veloce, ma può danneggiare gli esosomi o non essere molto efficiente.

Via endogena: In questo caso, si modificano le cellule che producono gli esosomi, in modo che inseriscano naturalmente i NADs al loro interno mentre li costruiscono; è un processo più preciso e può dare esosomi più funzionali, ma è più complicato e richiede più ricerca e lavoro in laboratorio. Il limite è quello che non è un veicolo estremamente preciso; quindi, il movimento è del tutto casuale.

Nanoparticelle Inorganiche (INPs): Nanocarrier basati su sostanze inorganiche come nanoparticelle d'oro (AuNPs), nanoparticelle di silice (SiNPs), nanoparticelle magnetiche (MNPs) e nanotubi di carbonio (CNTs) ed offrono strutture stabili per la veicolazione di NADs. Possono essere funzionalizzate superficialmente per migliorare il caricamento, il targeting e il rilascio controllato. Ad esempio, coniugati di siRNA con nanoparticelle d'oro sferiche (SNA) sono stati studiati per il trasporto al cervello, mostrando la capacità di attraversare la barriera ematoencefalica e accumularsi nei tumori.

Peptidi: I peptidi sono molecole di piccola dimensione molto specifiche e facili da sintetizzare. Possono essere utilizzati come veicoli sia mediante coniugazione covalente diretta con i NADs (coniugati peptide-oligonucleotide, POCs) sia formando complessi auto-assemblati non covalenti (nanoparticelle a base peptidica). I peptidi possono garantire il targeting tissutale/cellulare, la penetrazione cellulare (peptidi che penetrano la cellula, l'escape endosomiale e il targeting di organelli specifici).

Nonostante tutti i grandi progressi fatti nelle modifiche chimiche e nei sistemi di rilascio, ci sono ancora diverse sfide da affrontare prima che i farmaci a base di acidi nucleici (NADs) possano esprimere tutto il loro potenziale. Uno dei problemi principali è la sicurezza a lungo termine. Bisogna continuare a studiare se queste terapie possono causare tossicità o risposte immunitarie indesiderate, magari a causa dei materiali usati per trasportare il farmaco o delle modifiche fatte alle molecole stesse. Un'altra sfida è la loro riuscita a livello fisiologico: devono essere assorbiti bene, arrivare dove servono, rimanere attivi abbastanza a lungo e poi essere eliminati in modo sicuro. Anche le nuove tecnologie ed i metodi di laboratorio stanno aiutando tantissimo nella progettazione rapida ed efficiente di queste terapie. Infine, un altro ostacolo che dovrà essere superato è il garantire che queste cure siano davvero disponibili per tutti; per fare ciò sarà fondamentale semplificare la produzione, abbassare i costi e garantire comunque un'alta qualità. Ci sono ancora ostacoli, ma i progressi continuano sempre più veloci ed il futuro dei NADs è davvero promettente: potrebbero cambiare il modo in cui curiamo tante malattie, anche quelle che finora non avevano trattamenti efficaci.

CONCLUSIONI

Conclusioni

Nell'ultimo decennio, dati preclinici e clinici hanno dimostrato l'enorme potenziale delle terapie basate su acidi nucleici nel trattamento di diverse patologie.

I farmaci a base di acidi nucleici agiscono attraverso un'ampia varietà di meccanismi e con il progresso nello sviluppo delle strategie di veicolazione e nella modifica chimica di queste molecole, si è arrivati alla realizzazione di piattaforme tecnologiche sicure ed efficaci.

Il successo dell'applicazione in clinica di queste tecnologie ha suscitato grande interesse verso il miglioramento della specificità tissutale, ad esempio per gli ASO e i siRNA-coniugati e verso l'ampliamento delle potenziali applicazioni, in particolare per i sistemi di veicolazione basati sulle nanoparticelle lipidiche o su vettori adenovirus associati. Appare chiaro che le terapie basate su acidi nucleici sono pronte ad avere un impatto rivoluzionario per molte di quelle malattie per le quali non vi erano trattamenti adeguati.

Attualmente le tecnologie di veicolazione sono sfruttate per la produzione di farmaci a più ampia applicazione e, in particolare, hanno consentito un rapido sviluppo di vaccini in tempi di pandemia.

I vaccini a mRNA anti COVID-19 sviluppati da BioNTech/Pfizer e Moderna sono stati i primi vaccini a mRNA a ricevere l'autorizzazione "d'emergenza d'uso", da parte della FDA, e l'approvazione condizionale da parte dell'EMA. Tuttavia, una delle maggiori sfide incontrate nel loro sviluppo è data dalla scarsa stabilità, che rende necessaria la conservazione a temperature di congelamento.

È possibile concludere che l'esposizione dell'mRNA all'acqua è probabilmente il fattore principale dell'instabilità dei vaccini a mRNA. Ciò implica che diminuire l'esposizione all'acqua potrebbe essere un approccio promettente, attraverso, ad esempio, la tecnica della liofilizzazione.

Inoltre, è necessario che siano effettuati ulteriori studi per confermare la struttura proposta della LNP e per la caratterizzazione e ottimizzazione della struttura secondaria e terziaria dell'mRNA, in quanto vi sono indicazioni che alcune tipologie di ripiegamento, rendano la molecola più stabile.

Attraverso sforzi che mirano a rendere i vaccini più termostabili, sarà possibile facilitarne la distribuzione in tutto il mondo, limitando i costi associati.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Adewunmi, O., Shen, Y., Zhang, X. H. & Rosen, J. M. Targeted inhibition of lncRNA malat1 alters the tumor immune microenvironment in preclinical syngeneic mouse models of triplenegative breast cancer. *Cancer Immunol. Res.* 11, 1462–1479 (2023).
- 2) AIFA, Farmaci Biologici e Biosimilari, 2022
- 3) Akinc, A. et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 1357–1364 (2010).
- 4) Amodio, N. et al. Drugging the lncRNA MALAT1 via LNA gapmeR ASO inhibits gene expression of proteasome subunits and triggers anti-multiple myeloma activity. *Leukemia* 32, 1948–1957 (2018).
- 5) Anderson, E. J. et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in older adults. *New Engl. J. Med.* 383, 2427–243 (2020).
- 6) Asadirad, A. et al. Dendritic cell immunotherapy with miR-155 enriched tumor derived exosome suppressed cancer growth and induced antitumor immune responses in murine model of colorectal cancer induced by CT26 cell line. *Int. Immunopharmacol.* 104, 108493 (2022).
- 7) Augustine, R. et al. pH-responsive polypeptide-based smart nano-carriers for theranostic applications. *Molecules* 24, 2961 (2019).
- 8) Barrangou, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712 (2007)
- 9) Bege, M. & Borbas, A. The medicinal chemistry of artificial nucleic acids and therapeutic oligonucleotides. *Pharm. (Basel)* 15, 909 (2022).
- 10) Belliveau, N. M. et al. Microfluidic synthesis of highly potent limit-size lipid nanoparticles for in vivo delivery of siRNA. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 1, e37 (2012).
- 11) Bennett, C. F. & Swayze, E. E. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 259–293 (2010).
- 12) Berget, S. M., Moore, C. & Sharp, P. A. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus late mRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 74, 3171–3175 (1977).
- 13) Bungulawa, E. J. et al. Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *J. Nanobiotechnol.* 16, 81 (2018).
- 14) Bunka, D. H., Platonova, O. & Stockley, P. G. Development of aptamer therapeutics. *Curr Opin. Pharmacol.* 10, 557–562 (2010).
- 15) Charpentier, E. & Marraffini, L. A. Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. *Curr. Opin. Microbiol.* 19, 114–119 (2014).
- 16) Chen, S. et al. Influence of particle size on the in vivo potency of lipid nanoparticle formulations of siRNA. *J. Control. Release* 235, 236–244 (2016).
- 17) Chen, S. et al. Systematic evaluation of 2'Fluoro modified chimeric antisense oligonucleotide-mediated exon skipping in vitro. *Sci. Rep.* 9, 6078 (2019).

- 18) Chen, Y., Li, Z., Chen, X. & Zhang, S. Long non-coding RNAs: from disease code to drug role. *Acta Pharm. Sin. B* 11, 340–354 (2021).
- 19) Cooper, J. M. et al. Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. *Mov. Disord.* 29, 1476–1485 (2014).
- 20) Couch, Y. et al. A brief history of nearly EV-erything - the rise and rise of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 10, e12144 (2021).
- 21) Cox, D. B. T. et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* 358, 1019–1027 (2017).
- 22) Crescitelli, R., Lasser, C. & Lotvall, J. Isolation and characterization of extracellular vesicle subpopulations from tissues. *Nat. Protoc.* 16, 1548–1580 (2021).
- 23) Crooke, S. T., Vickers, T. A. & Liang, X. H. Phosphorothioate modified oligonucleotide-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 48, 5235–5253 (2020).
- 24) De Vivo, D. C. et al. Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: interim efficacy and safety results from the phase 2 nurture study. *Neuromuscul. Disord.* 29, 842–856 (2019).
- 25) Del Pozo-Rodriguez, A. et al. Gene therapy. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 171, 321–368 (2020).
- 26) Delorme-Axford, E. et al. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110, 12048–12053 (2013).
- 27) Dong, Y., Siegwart, D. J. & Anderson, D. G. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 144, 133–147 (2019).
- 28) Elbashir, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498 (2001).
- 29) Erathodiyil, N. & Ying, J. Y. Functionalization of inorganic nanoparticles for bioimaging applications. *Acc. Chem. Res.* 44, 925–935 (2011).
- 30) Esposito, R. et al. Multi-hallmark long noncoding RNA maps reveal non-small cell lung cancer vulnerabilities. *Cell Genomics* 2, 100171 (2022).
- 31) Eygeris, Y., Gupta, M., Kim, J. & Sahay, G. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery. *Acc. Chem. Res.* 55, 2–12 (2022).
- 32) *Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana*, XII ed., 2020
- 33) Felgner, P. L. et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413–7417 (1987).
- 34) Finkel, R. S. et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: final report of a phase 2, open-label, multicentre, dose-escalation study. *Lancet Child Adolesc. Health* 5, 491–500 (2021).
- 35) Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811 (1998).
- 36) Foster, D. J. et al. Advanced siRNA designs further improve in vivo performance of GalNAc-siRNA conjugates. *Mol. Ther.* 26, 708–717 (2018).
- 37) Friedmann, T. & Roblin, R. Gene therapy for human genetic disease? *Science* 175, 949–955 (1972).

- 38) Fu, Z. et al. In vivo self-assembled small RNAs as a new generation of RNAi therapeutics. *Cell Res* 31, 631–648 (2021).
- 39) Gangopadhyay, S. & Gore, K. R. Advances in siRNA therapeutics and synergistic effect on siRNA activity using emerging dual ribose modifications. *RNA Biol.* 19, 452–467 (2022).
- 40) Ghaemi, A. et al. CRISPR-cas9 genome editing delivery systems for targeted cancer therapy. *Life Sci.* 267, 118969 (2021).
- 41) Gokirmak, T. et al. Overcoming the challenges of tissue delivery for oligonucleotide therapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.* 42, 588–604 (2021).
- 42) Goswami, A., Prasad, A. K., Maity, J. & Khaneja, N. Synthesis and applications of bicyclic sugar modified locked nucleic acids: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 41, 503–529 (2022).
- 43) Gowda, V. L., Fernandez-Garcia, M. A., Jungbluth, H. & Wraige, E. New treatments in spinal muscular atrophy. *Arch. Dis. Child.* 108, 511–517 (2023).
- 44) Herkt, M. & Thum, T. Pharmacokinetics and proceedings in clinical application of nucleic acid therapeutics. *Mol. Ther.* 29, 521–539 (2021).
- 45) Hoy, S. M. Exagamglogene autotemcel: first approval. *Mol. Diagn. Ther.* 28, 133–139 (2024).
- 46) Hoy, S. M. Patisiran: first global approval. *Drugs* 78, 1625–1631 (2018).
- 47) Hu, B. et al. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct. Target Ther.* 5, 101 (2020).
- 48) Ishino, Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169, 5429–5433 (1987).
- 49) Janas, M. M. et al. Safety evaluation of 2'-deoxy-2'-fluoro nucleotides in GalNAc siRNA conjugates. *Nucleic Acids Res* 47, 3306–3320 (2019).
- 50) Jayaraman, M. et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angew. Chem.* 51, 8529–8533 (2012).
- 51) Jayaraman, M. et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angew. Chem.* 51, 8529–8533 (2012).
- 52) Johnsen, K. B. et al. Evaluation of electroporation-induced adverse effects on adipose-derived stem cell exosomes. *Cytotechnology* 68, 2125–2138 (2016).
- 53) Jung, H. N. et al. Lipid nanoparticles for delivery of RNA therapeutics: current status and the role of in vivo imaging. *Theranostics* 12, 7509–7531 (2022).
- 54) Kichler, A. & Schuber, F. Versatile synthesis of bi- and tri-antennary galactose ligands: interaction with the Gal/GalNAc receptor of human hepatoma cells. *Glycoconj. J.* 12, 275–281 (1995).
- 55) Kim, G. et al. Systemic delivery of microRNA-21 antisense oligonucleotides to the brain using T7-peptide decorated exosomes. *J. Control. Release* 317, 273–281 (2020).
- 56) Kim, M. S. et al. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine* 12, 655–664 (2016).

- 57) Kong, L., Campbell, F. & Kros, A. DePEGylation strategies to increase cancer nanomedicine efficacy. *Nanoscale Horiz.* 4, 378–387 (2019).
- 58) Ku, S. H. et al. Chemical and structural modifications of RNAi therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 104, 16–28 (2016).
- 59) Kulkarni, J. A. et al. Lipid nanoparticle technology for clinical translation of siRNA therapeutics. *Acc. Chem. Res.* 52, 2435–2444 (2019).
- 60) Kulkarni, J. A., Cullis, P. R. & van der Meel, R. Lipid nanoparticles enabling gene therapies: from concepts to clinical utility. *Nucleic Acid Ther.* 28, 146–157 (2018).
- 61) Kulkarni, J. A., Witzigmann, D., Thomson, S. B., Chen, S., Leavitt, B. R., Cullis, P. R., et al. (s.d.). The current landscape of nucleic acid therapeutics.
- 62) Lakhina, Y., Boulis, N. M. & Donsante, A. Current and emerging targeted therapies for spinal muscular atrophy. *Expert Rev. Neurother.* 23, 1189–1199 (2023).
- 63) Lamb, Y. N. BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: first approval. *Drugs* 81, 495–501 (2021).
- 64) Lechardeur, D. & Lukacs, G. L. Intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Curr. Gene Ther.* 2, 183–194 (2002).
- 65) Lehto, T., Ezzat, K., Wood, M. J. A. & El Andaloussi, S. Peptides for nucleic acid delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 106, 172–182 (2016).
- 66) Liang, Y., Duan, L., Lu, J. & Xia, J. Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics* 11, 3183–3195 (2021).
- 67) Lu, Z. G. et al. Nucleic acid drug vectors for diagnosis and treatment of brain diseases. *Signal Transduct. Target Ther.* 8, 604–656 (2023).
- 68) Luther, D. C. et al. Delivery of drugs, proteins, and nucleic acids using inorganic nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 156, 188–213 (2020).
- 69) Mahati, S. et al. Delivery of miR-26a using an exosomes-based nanosystem inhibited proliferation of hepatocellular carcinoma. *Front. Mol. Biosci.* 8, 738219 (2021).
- 70) Makarova, K. S., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Res* 41, 4360–4377 (2013).
- 71) Matsui, M. & Corey, D. R. Non-coding RNAs as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 167–179 (2017).
- 72) Meena, J. et al. Inorganic nanoparticles for natural product delivery: a review. *Environ. Chem. Lett.* 18, 2107–2118 (2020).
- 73) Miao, L. et al. Synergistic lipid compositions for albumin receptor mediated delivery of mRNA to the liver. *Nat. Commun.* 11, 2424 (2020).
- 74) Montes, J. et al. Nusinersen improves walking distance and reduces fatigue in later-onset spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 60, 409–414 (2019).
- 75) Mui, B. L. et al. Influence of polyethylene glycol lipid desorption rates on pharmacokinetics and pharmacodynamics of siRNA lipid nanoparticles. *Mol. Ther. Nucl. Acids* 2, e139 (2013).

- 76) Nair, J. K. et al. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 16958–16961 (2014).
- 77) Ng, E. W. et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug. Disc.* 5, 123–132 (2006).
- 78) Nielsen, K. E. et al. NMR studies of fully modified locked nucleic acid (LNA) hybrids: solution structure of an LNA:RNA hybrid and characterization of an LNA:DNA hybrid. *Bioconjugate Chem.* 15, 449–457 (2004).
- 79) Nikam, R. R. & Gore, K. R. Journey of siRNA: clinical developments and targeted delivery. *Nucleic Acid Ther.* 28, 209–224 (2018).
- 80) Nishio, H. et al. Spinal muscular atrophy: the past, present, and future of diagnosis and treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 11939 (2023).
- 81) Ottesen, E. W. et al. Diverse targets of SMN2-directed splicing-modulating small molecule therapeutics for spinal muscular atrophy. *Nucleic Acids Res.* 51, 5948–5980 (2023).
- 82) Parmar, R. G. et al. Facile synthesis, geometry, and 2'-substituent-dependent in vivo activity of 5'-(E)- and 5'-(Z)-vinylphosphonate-modified siRNA conjugates. *J. Med. Chem.* 61, 734–744 (2018).
- 83) Pegtel, D. M. & Gould, S. J. Exosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 88, 487–514 (2019).
- 84) Perret, G. & Boschetti, E. Aptamer-based affinity chromatography for protein extraction and purification. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 174, 93–139 (2020).
- 85) Philippidis, A. CASGEVY makes history as FDA approves first CRISPR/Cas9 genome edited therapy. *Hum. Gene Ther.* 35, 1–4 (2024).
- 86) Piatek, M. J. & Werner, A. Endogenous siRNAs: regulators of internal affairs. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1174–1179 (2014).
- 87) Rai, R., Alwani, S. & Badea, I. Polymeric nanoparticles in gene therapy: new avenues of design and optimization for delivery applications. *Polym. (Basel)* 11, 745 (2019).
- 88) Rajput, A., Varshney, A., Bajaj, R. & Pokharkar, V. Exosomes as new generation vehicles for drug delivery: biomedical applications and future perspectives. *Molecules* 27, 7289 (2022).
- 89) Ray, K. K. et al. Inclisiran and cardiovascular events: a patient-level analysis of phase III trials. *Eur. Heart J.* 44, 129–138 (2023).
- 90) Ray, K. K. et al. Two phase 3 trials of inclisiran in patients with elevated LDL cholesterol. *N. Engl. J. Med.* 382, 1507–1519 (2020).
- 91) Rehman, F. U., Liu, Y., Zheng, M. & Shi, B. Exosomes based strategies for brain drug delivery. *Biomaterials* 293, 121949 (2023).
- 92) Ren, X. et al. Exosomal DNA aptamer targeting alpha-synuclein aggregates reduced neuropathological deficits in a mouse parkinson's disease model. *Mol. Ther. Nucl. Acids* 17, 726–740 (2019).

- 93) Rich, A. & Davies, D. R. A new two stranded helical structure: polyadenylic acid and polyuridylic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 3548–3549 (1956).
- 94) Rich, A. A hybrid helix containing both deoxyribose and ribose polynucleotides and its relation to the transfer of information between the nucleic acids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 46, 1044–1053 (1960).
- 95) Riley, R. S. et al. Ionizable lipid nanoparticles for in utero mRNA delivery. *Sci. Adv.* 7, eaba1028 (2021).
- 96) Rossi, J. J. & Rossi, D. Oligonucleotides and the COVID-19 pandemic: a perspective. *Nucleic Acid Ther.* 30, 129–132 (2020).
- 97) Sabir, F. et al. DNA based and stimuli-responsive smart nanocarrier for diagnosis and treatment of cancer: applications and challenges. *Cancers (Basel)* 13, 3396 (2021).
- 98) Sahin, U. et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T-cell responses. *Nature* 586, 594–599 (2020).
- 99) Sasso, J. M. et al. The progress and promise of RNA medicine horizontal line an arsenal of targeted treatments. *J. Med. Chem.* 65, 6975–7015 (2022).
- 100) Shi, D. et al. To PEGylate or not to PEGylate: immunological properties of nanomedicine's most popular component, polyethylene glycol and its alternatives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 180, 114079 (2022).
- 101) Singh, N. N., Howell, M. D., Androphy, E. J. & Singh, R. N. How the discovery of ISS-N1 led to the first medical therapy for spinal muscular atrophy. *Gene Ther.* 24, 520–526 (2017).
- 102) Smith, C. I. E. & Zain, R. Therapeutic oligonucleotides: state of the art. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* 59, 605–630 (2019).
- 103) Song, L. Y. et al. Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1558, 1–13 (2002).
- 104) Springer, A. D. & Dowdy, S. F. GalNAc-siRNA conjugates: leading the way for delivery of RNAi therapeutics. *Nucleic Acid Ther.* 28, 109–118 (2018).
- 105) Stockert, R. J. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol. Rev.* 75, 591–609 (1995).
- 106) Su, S. A. et al. Emerging role of exosome-mediated intercellular communication in vascular remodeling. *Oncotarget* 8, 25700–25712 (2017).
- 107) Sun, X., Setrerrahmane, S., chencheng, L., Jialiang, H., & Hanmei, X. (s.d.). Nucleic acid drugs: recent progress and future perspectives.
- 108) Suran, M. Finding the tail end: the discovery of RNA splicing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 117, 1829–1832 (2020).
- 109) Swingle, K. L. et al. Amniotic uid stabilized lipid nanoparticles for in utero intramniotic mRNA delivery. *J. Control. Release* 341, 616–633 (2022)
- 110) Syed, Y. Y. Nedosiran: first approval. *Drugs* 83, 1729–1733 (2023).
- 111) Tan, X., Jia, F., Wang, P. & Zhang, K. Nucleic acid-based drug delivery strategies. *J. Control. Release* 323, 240–252 (2020).

- 112) Thess, A. et al. Historic nucleic acids isolated by Friedrich Miescher contain RNA besides DNA. *Biol. Chem.* 402, 1179–1185 (2021).
- 113) To, K. K. W. & Cho, W. C. S. An overview of rational design of mRNA-based therapeutics and vaccines. *Expert Opin. Drug Discov.* 16, 1307–1317 (2021).
- 114) Van Den Berg, A. I. S., Yun, C. O., Schiffelers, R. M. & Hennink, W. E. Polymeric delivery systems for nucleic acid therapeutics: approaching the clinic. *J. Control. Release* 331, 121–141 (2021)
- 115) Vasquez, G. et al. Evaluation of phosphorus and non-phosphorus neutral oligonucleotide backbones for enhancing therapeutic index of gapmer antisense oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 32, 40–50 (2022).
- 116) Verbeke, R., Lentacker, I., De Smedt, S. C. & Dewitte, H. The dawn of mRNA vaccines: the COVID-19 case. *J. Control. Release* 333, 511–520 (2021).
- 117) Vitravene Study, G. Safety of intravitreal fomivirsen for treatment of cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *Am. J. Ophthalmol.* 133, 484–498(2002).
- 118) Wang, C. et al. Targeted p53 activation by saRNA suppresses human bladder cancer cells growth and metastasis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35, 53 (2016).
- 119) Wang, C., Zhang, Y. & Dong, Y. Lipid nanoparticle-mRNA formulations for therapeutic applications. *Acc. Chem. Res.* 54, 4283–4293 (2021).
- 120) Wang, D., Tai, P. W. L. & Gao, G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 358–378 (2019).
- 121) Wang, J., Tian, T., Li, X. & Zhang, Y. Noncoding RNAs emerging as drugs or drug targets: their chemical modification, bio-conjugation and intracellular regulation. *Molecules* 27, 6717 (2022).
- 122) Wang, T. et al. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: lessons learned, progress and opportunities on aptamer development. *Biotechnol. Adv.* 37, 28–50 (2019).
- 123) Wang, X. et al. Induction of NANOG expression by targeting promoter sequence with small activating RNA antagonizes retinoic acid-induced differentiation. *Biochem. J.* 443, 821–828 (2012).
- 124) Wang, Z. et al. Gold nanoparticle-mediated delivery of paclitaxel and nucleic acids for cancer therapy (Review). *Mol. Med. Rep.* 22, 4475–4484 (2020).
- 125) Wilson, J. M. Lessons learned from the gene therapy trial for ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 96, 151–157 (2009).
- 126) Wittrup, A. & Lieberman, J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat. Rev. Genet.* 16, 543–552 (2015).
- 127) Witzigmann, D. Lipid nanoparticle technology for therapeutic gene regulation in the liver. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 344–363 (2020).
- 128) Xi, X. M., Xia, S. J. & Lu, R. Drug loading techniques for exosome-based drug delivery systems. *Pharmazie* 76, 61–67 (2021).

-
- 129) Xu, H., Liao, C., Liang, S. & Ye, B. C. A novel peptide-equipped exosomes platform for delivery of antisense oligonucleotides. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 13,10760–10767 (2021).
- 130) Xu, X. et al. Exosome-mediated delivery of kartogenin for chondrogenesis of synovial uid-derived mesenchymal stem cells and cartilage regeneration. *Bio-materials* 269, 120539 (2021).
- 131) Yang, T. et al. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in danio rerio. *Pharm. Res.* 32, 2003–2114 (2015).
- 132) Zamecnik, P. C. & Stephenson, M. L. Inhibition of rous sarcoma virus replication and cell transformation by a speci c oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 75, 280–284 (1978).
- 133) Zhang, H. et al. Exosome-mediated targeted delivery of miR-210 for angiogenic therapy after cerebral ischemia in mice. *J. Nanobiotechnol.* 17, 29 (2019).
- 134) Zhang, S. et al. The mechanistic, diagnostic and therapeutic novel nucleic acids for hepatocellular carcinoma emerging in past score years. *Brief. Bioinform.* 22,1860–1883 (2021).
- 135) Zhang, Y. et al. Lipids and lipid derivatives for RNA delivery. *Chem. Rev.* 121, 12181–12277 (2021).
- 136) Zhang, Z. et al. Nucleic acid-based therapy for brain cancer: challenges and strategies. *J. Control. Release* 350, 80–92 (2022).
- 137) Zheng, M. et al. Harnessing exosomes for the development of brain drug delivery systems. *Bioconjugate Chem.* 30, 994–1005 (2019).
- 138) Zheng, Y. Y., Wu, Y., Begley, T. J. & Sheng, J. Sulfur modi cation in natural RNA and therapeutic oligonucleotides. *RSC Chem. Biol.* 2, 990–1003 (2021).
- 139) Zong, Y., Lin, Y., Wei, T. & Cheng, Q. Lipid nanoparticle (LNP) enables mRNA delivery for cancer therapy. *Adv. Mater.* 35, e2303261 (2023).

