

maniera controllata in modo da non favorire la crescita di eventuali tumori presenti in sedi lontane da quella in cui sono espressi, e così via.

In molte di queste situazioni, una soluzione ottimale sarebbe quella di utilizzare il promotore naturale del gene terapeutico per dirigerne l'espressione *in vivo*; nella maggior parte dei casi, tuttavia, questo non risulta possibile, in quanto l'espressione di molti geni cellulari è controllata da regioni genetiche molto estese, non adatte quindi a essere clonate all'interno della maggior parte dei vettori attualmente disponibili.

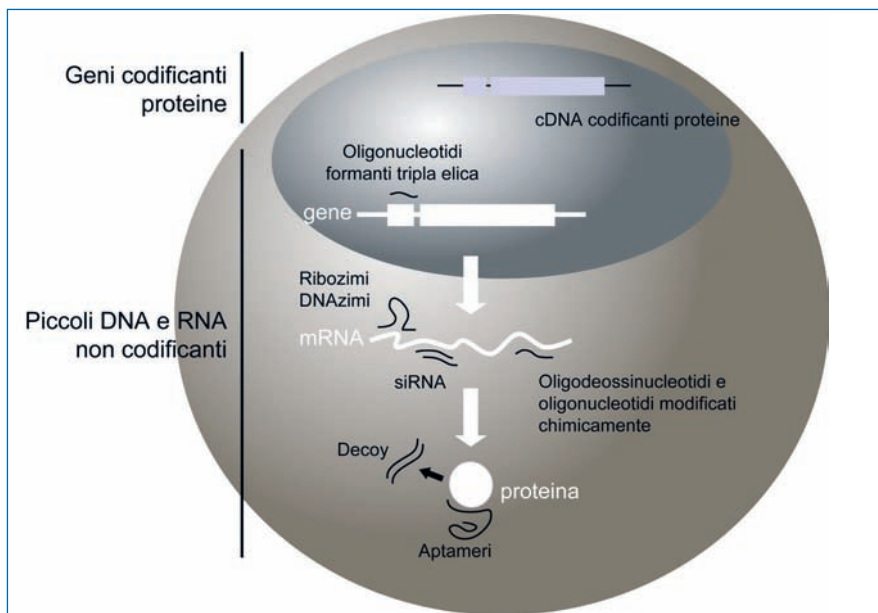
Una prima maniera di affrontare il problema della regolazione dell'espressione del trasgene *in vivo* è quella di limitarne l'espressione al tessuto di interesse, utilizzando un promotore specifico per quel determinato tessuto e di dimensioni sufficientemente piccole da essere contenuto in uno dei vettori utilizzati per il trasferimento genico. Esempi di tali elementi genetici sono l'*enhancer* del gene della creatina-chinasi muscolare (*muscle creatin-kinase*, MCK) o il promotore della  $\beta$ -actina per dirigere l'espressione nel muscolo scheletrico, il promotore del gene  $\alpha$  della catena pesante della miosina ( *$\alpha$ -myosin heavy chain*,  $\alpha$ -MHC) per il cuore, il promotore dell'insulina per il pancreas, il promotore dell'albumina per il fegato, il promotore della transtiretina per la retina, e così via.

Una modalità molto elegante per ottenere l'effetto opposto, ovvero quello di limitare l'espressione di un trasgene in un determinato tessuto, consiste nell'agire a livello post-trascrizionale e sfruttare la presenza, in molti tipi cellulari, di microRNA (miRNA) specifici (vedi sezione sui piccoli RNA con funzione regolatoria). Se la sequenza dell'mRNA del trasgene contiene il sito bersaglio di uno di questi miRNA, l'espressione della proteina sarà selettivamente inibita in quel determinato tipo cellulare, lasciandola peraltro invariata in tipi cellulari diversi. Questa proprietà può essere utilizzata, ad esempio, per bloccare l'espressione di una proteina di interesse nelle cellule che presentano l'antigene (*antigen presenting cell*, APC), impedendo quindi che il sistema immunitario monti una risposta contro di essa.

## Acidi nucleici non codificanti

Oltre alle sequenze di DNA in grado di codificare proteine aventi varie funzioni, lo spettro di applicazioni della terapia genica è enormemente allargato dalla possibilità di utilizzare acidi nucleici (DNA e RNA) con funzione regolatoria. Queste molecole possono essere suddivise in 6 principali categorie, ovvero:

- oligonucleotidi e oligonucleotidi modificati chimicamente;
- piccoli RNA e DNA con funzione catalitica (ribozimi e DNazimi, rispettivamente);
- piccoli RNA con funzione regolatoria (siRNA e microRNA);
- lunghi RNA antisenso;
- RNA e DNA con funzione di *decoy*;
- aptameri (RNA in grado di legarsi ad altre macromolecole in virtù della propria conformazione tridimensionale).



**Fig. 2.3.** Acidi nucleici terapeutici. Il sito di azione dei vari tipi di acidi nucleici con funzione terapeutica è mostrato lungo le vie dell'espressione genica

Gli oligonucleotidi a DNA o gli oligonucleotidi modificati chimicamente devono essere somministrati alle cellule dall'esterno, mentre le molecole di RNA possono essere anche generate all'interno della cellula inducendo la trascrizione delle sequenze che le codificano.

La Figura 2.3 rappresenta schematicamente i siti di azione di queste diverse classi di acidi nucleici regolatori all'interno della cellula. Questi comprendono virtualmente tutti i passaggi che regolano l'espressione genica, includendo la trascrizione e lo *splicing* (oligonucleotidi), la stabilità degli mRNA (oligonucleotidi, ribozimi, DNAzimi, siRNA e lunghi RNA antisense), la sintesi proteica (siRNA) e la funzione delle proteine (aptameri e *decoy*).

### Oligonucleotidi

La forma più semplice di acido nucleico con potenziale funzione terapeutica è rappresentata da corte molecole di DNA a singolo filamento, solitamente da 15 a 100 nucleotidi, sintetizzate chimicamente. L'utilizzo di questi oligonucleotidi si basa sulla proprietà intrinseca del DNA a singolo filamento di appaiarsi in maniera specifica a un altro filamento di DNA o di RNA avente sequenza complementare tramite la formazione di ponti idrogeno tra le basi azotate (i cosiddetti legami di Watson e Crick). Nonostante ciascuno dei legami formati sia non covalente, il loro numero complessivo fa sì che l'affinità tra due filamenti di DNA complementari sia

estremamente elevata ( $K_d$  dell'ordine di  $1 \times 10^{-15}$  Mol/L), di gran lunga superiore a quella, ad esempio, di un anticorpo con il suo ligando ( $K_d$  compresa tra  $1 \times 10^{-6}$  e  $1 \times 10^{-10}$ ) o di un fattore di crescita con il suo recettore ( $K_d$  tra  $1 \times 10^{-8}$  e  $5 \times 10^{-10}$ ). Inoltre, l'appaiamento delle basi consente di ottenere un'altissima specificità di riconoscimento del bersaglio, in quanto una sequenza specifica di 17 nucleotidi è statisticamente presente una sola volta nell'intero genoma umano.

In virtù delle loro proprietà, gli oligonucleotidi sintetici possono essere impiegati in almeno quattro tipi di applicazioni, ovvero:

- per inibire l'espressione genica, sfruttando il loro appaiamento con un mRNA bersaglio;
- per modulare il processo di *splicing* di un pre-mRNA, favorendo o impedendo l'inclusione di un esone nell'mRNA maturo;
- per bloccare la trascrizione, promuovendo la formazione, solitamente a livello del promotore di un gene, di strutture di DNA a tripla elica;
- per promuovere la correzione genica, sfruttando l'appaiamento dell'oligonucleotide con un segmento omologo di DNA genomico.

Le prime due di queste applicazioni hanno come bersaglio l'mRNA, le seconde due il DNA genomico. Vediamoli più nel dettaglio:

1. **Oligonucleotidi antisenso (*antisense oligonucleotide*, ASO) che inibiscono l'espressione genica.** Al fine di inibire selettivamente l'espressione di un gene cellulare o virale, può essere utilizzato un oligodeossinucleotide, ovvero una molecola di DNA tipicamente composta da 17-22 nucleotidi, avente una sequenza complementare all'mRNA del gene di interesse. Una volta introdotto nella cellula, l'ASO si appaia specificamente all'mRNA bersaglio, ne blocca la traduzione a livello del ribosoma, e ne stimola la degradazione da parte di enzimi cellulari aventi la proprietà di RNasi H, ovvero capaci di degradare gli ibridi DNA:RNA.
2. **Oligonucleotidi antisenso che modulano il processo di *splicing*.** In virtù della loro complementarità con l'mRNA bersaglio, gli ASO possono anche essere utilizzati per indurre l'esclusione di un esone durante la maturazione del pre-mRNA. In alcune patologie, mutazioni puntiformi presenti in un esone possono generare un codone di STOP, che porta alla sintesi di una proteina troncata prematuramente, o possono cambiare la cornice di lettura, generando una proteina dal contenuto amminoacidico alterato a valle della mutazione. In alcune situazioni quali, ad esempio, la distrofia muscolare di Duchenne, la patologia generata da mutazioni di questo tipo è molto più grave di quanto lo sarebbe quella conseguente alla presenza di una proteina che porta la delezione dell'intero esone all'interno del quale è presente la mutazione (vedi sezione sulla Terapia genica delle distrofie muscolari). La strategia per indurre l'esclusione di uno specifico esone da una proteina (*exon skipping*) può essere perseguita mediante il trattamento delle cellule con ASO complementari ai segnali che regolano lo *splicing* del pre-mRNA del gene interessato, aventi tipicamente come bersaglio le regioni dei siti donatori/accettori di *splicing* (SA/SD) o le sequenze interne all'esone con funzione di

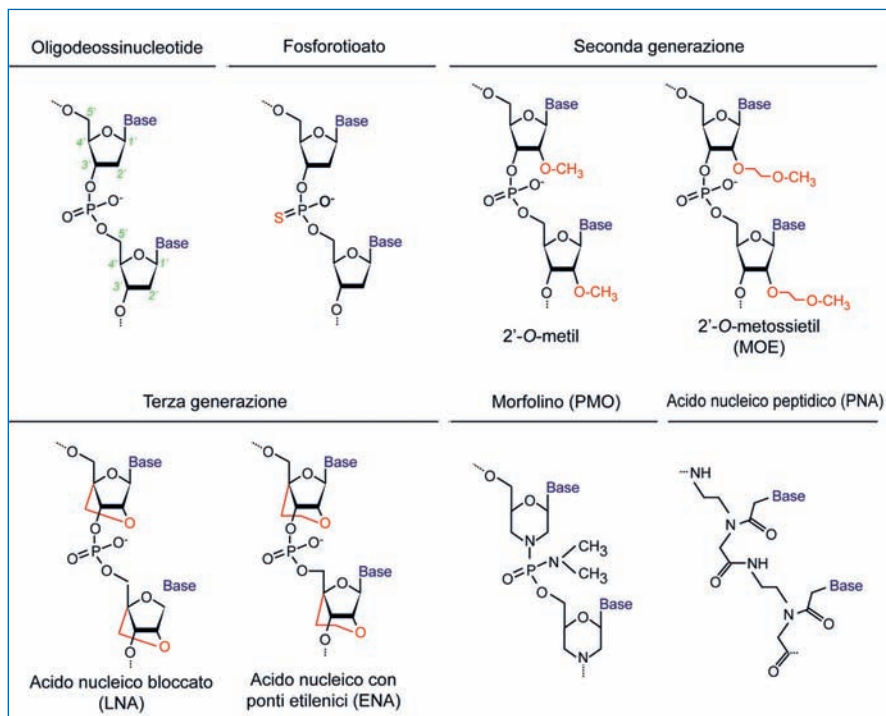
- potenziamento dello *splicing* (*exon sequence enhancer*, ESE).
3. **Oligonucleotidi che stimolano la formazione di strutture a tripla elica (*triple-helix-forming oligodeoxynucleotides*, TFO).** I TFO sono oligodeossinucleotidi a singolo filamento in grado di legarsi al solco maggiore del DNA in modo sequenza-specifico, riconoscendo una sequenza bersaglio di 10-30 paia di basi. Quando questa sequenza bersaglio è nel promotore di un gene, o immediatamente a valle del sito di inizio della trascrizione, la struttura a tripla elica impedisce il legame di fattori di trascrizione o l'apertura del duplex di DNA, impedendo quindi l'espressione del gene.
  4. **Oligonucleotidi per indurre la correzione di mutazioni puntiformi.** Uno degli obiettivi più ambiziosi della terapia genica è quello di ottenere la correzione di una mutazione direttamente a livello del genoma. Questo obiettivo può essere perseguito somministrando alla cellula un tratto di DNA con una sequenza identica alla regione da correggere, ma senza la mutazione, e sfruttando i meccanismi cellulari della riparazione del DNA per la sostituzione del segmento di DNA genomico con quello somministrato per via esogena. Ancorché l'approccio sia interessante dal punto di vista sperimentale, la frequenza con cui la correzione genica può essere ottenuta attualmente è ancora estremamente bassa, interessando solitamente <0,1% delle cellule, e per ora strettamente limitata alle cellule in coltura.

### Oligonucleotidi modificati

Alcuni dei problemi fondamentali dell'applicazione terapeutica degli oligodeossinucleotidi sono legati alla distribuzione nei tessuti che è limitata quando iniettati *in vivo*, alla citotossicità che esercitano e, soprattutto, alla loro scarsa stabilità, che ne determina un'emivita estremamente breve. Sia nell'ambiente extracellulare sia all'interno della cellula, infatti, piccole molecole di DNA naturale, in cui i nucleotidi sono congiunti da legami fosfodiesterici, sono soggette a rapida degradazione da parte di endo- e 3'-esonucleasi (DNasi).

Per ovviare a questo problema e aumentare l'efficienza di distribuzione di queste molecole nei diversi tessuti, la struttura degli oligonucleotidi è stata progressivamente sottoposta a varie modificazioni chimiche. Queste modificazioni sono rappresentate schematicamente nella Figura 2.4 e descritte di seguito.

1. Una prima generazione di oligonucleotidi modificati è costituita dagli oligodeossinucleotidi fosforotioati. In queste molecole, un atomo di ossigeno del gruppo fosfato, non coinvolto in legami, è sostituito da un atomo di zolfo. Questa modifica conferisce maggiore stabilità all'oligonucleotide, aumentandone l'emivita. *In vitro*, gli oligonucleotidi fosforotioati possono essere efficacemente veicolati nelle cellule mediante lipofezione (vedi capitolo sulle Metodologie per il trasferimento genico). *In vivo*, essi mostrano efficacia anche quando utilizzati quali acidi nucleici nudi; tuttavia, la loro emivita è breve (meno di 2 ore nel siero e di 4 ore nei tessuti), e devono quindi essere somministrati per via endovenosa continua.



**Fig. 2.4.** Struttura chimica degli oligonucleotidi modificati. La figura mostra lo scheletro di due nucleotidi adiacenti nel DNA naturale (in *alto a sinistra*) e nei vari tipi di oligonucleotidi di modificati. Nel caso dei fosforotioati e degli oligonucleotidi di seconda e terza generazione, le modificazioni chimiche introdotte rispetto al DNA naturale sono indicate in *rosso*

- Una seconda generazione di oligonucleotidi è stata ottenuta modificando la molecola di ribosio dei nucleotidi, mediante l'introduzione di gruppi alchilici nella posizione 2' dello zucchero; le molecole generate includono il 2'-O-metil- ed il 2'-O-metossietil-RNA. Queste molecole sono meno tossiche degli oligodeossinucleotidi fosforotioati; tuttavia, i cambiamenti conformazionali indotti dalle modificazioni, e in particolare la presenza del ribosio, fanno sì che il duplex formato dall'oligonucleotide e dal mRNA bersaglio non sia più un substrato dell'RNasi H, e che quindi l'effetto inibitorio sia soltanto dovuto all'impedimento della traduzione, con una conseguente minore efficacia complessiva. Questo inconveniente può essere evitato mediante la sintesi di oligonucleotidi ibridi, che contengono un blocco centrale di desossinucleotidi naturali in grado di indurre il taglio dell'ibrido oligonucleotide:mRNA bersaglio da parte delle RNasi H, fiancheggiato da entrambi i lati da un quantitativo di ribonucleotidi modificati in posizione 2' del ribosio, sufficienti a proteggere il blocco interno dalla degradazione. Questi oligonucleotidi vengono definiti *gapmer*.

3. Una modifica ancora più drastica è presente nei cosiddetti *bridged nucleic acids* (BNA), meglio conosciuti come *locked nucleic acids* (LNA), ovvero RNA bloccati dal punto di vista conformazionale, in cui il ribosio contiene un legame extra che connette carboni in posizione 2' e 4' (ponte 2'-0,4'-C-metilene). Questo legame blocca il ribosio nella conformazione strutturale C3'-endo, che è frequentemente presente nella forma strutturale A del DNA o dell'RNA. Nella variante ENA (*ethylen-bridged nucleosides*), gli atomi di carbonio in posizione 2' e 4' sono uniti da un ponte 2'-0,4'-C-etilene. Nel contesto dell'oligonucleotide, i nucleotidi LNA possono essere alternati, a piacimento, con nucleotidi o desossinucleotidi con struttura naturale, e possono quindi trovare spazio anche all'interno di ribozimi o di siRNA.  
Le modifiche allo scheletro degli oligonucleotidi possono essere così drastiche da cambiare quasi completamente la struttura chimica dell'acido nucleico, generando molecole che, pur mantenendo il principio dell'appaiamento tra le basi azotate, presentano caratteristiche chimiche radicalmente diverse dagli acidi nucleici naturali. Di questa terza generazione di oligonucleotidi modificati fanno parte i morfolino e i PNA (*peptide nucleic acids*).
4. I morfolino, anche conosciuti come PMO (*phosphorodiamidate morpholino oligomers*), sono molecole sintetiche, usualmente composte da 25 nucleotidi, che differiscono dal DNA naturale in quanto le basi azotate sono legate all'anello del morfolino anziché al deossiribosio, e il legame fosfodiesterico è sostituito da un legame fosforodiamidico. Queste molecole inibiscono l'espressione genica legandosi all'mRNA bersaglio e bloccandone il processamento o la traduzione in maniera sterica, indipendente dall'attività delle RNasi H. I morfolino vengono estesamente utilizzati in laboratorio per lo studio dello sviluppo in alcuni modelli animali, quali *Xenopus* o *Zebrafish*, in cui vengono microiniettati negli embrioni per bloccare in maniera stabile l'espressione di un gene di interesse. Nelle cellule di mammifero, l'entrata di queste molecole non avviene spontaneamente, e deve essere facilitata mediante la loro coniugazione, covalente o non-covalente, con peptidi in grado di veicarli oltre la membrana plasmatica o endosomiale. Esempi di tali peptidi sono quelli derivati dalla proteina omeotica Antennapedia di *Drosophila* o dalla proteina Tat di HIV-1. L'utilizzo dei morfolino è già entrato nella sperimentazione clinica quale strumento per bloccare la replicazione del virus dell'epatite C e del West Nile Virus o per prevenire la restenosi vascolare dopo angioplastica (quest'ultima applicazione utilizza uno *stent* in grado di eluire un PMO contro l'oncogene *c-myc*). Un'altra applicazione clinica interessante in fase di allestimento riguarda la terapia genica della distrofia muscolare di Duchenne, in cui i morfolino sono utilizzati per indurre l'esclusione, dall'mRNA maturo, degli esoni contenenti le mutazioni (*exon skipping*; vedi anche sopra).
5. Gli acidi nucleici peptidici (*peptide nucleic acids*, PNA) sono dei polimeri sintetici in cui le basi azotate sono connesse da uno scheletro costituito da ripetizioni dell'amminoacido modificato N-(2-amminoetil)-glicina, connesso tramite legami peptidici. Questi legami sono elettricamente neutri, a differenza

dei ponti fosfato del DNA, che sono carichi negativamente; ne consegue che i PNA formano legami molto stabili quando si appaiano a filamenti complementari di DNA o RNA, o formano triple eliche appaiandosi con legami di Hoogsteen con tratti di poli-purine o poli-piridimine. Inoltre, la loro struttura chimica non naturale rende i PNA molto resistenti alla degradazione. Nonostante queste caratteristiche molto attraenti dal punto di vista terapeutico, l'applicazione clinica dei PNA è stata finora fortemente limitata dalla loro modesta biodisponibilità una volta somministrati *in vivo*.

### Applicazioni cliniche degli oligonucleotidi

Nonostante la grande mole di ricerca compiuta nel campo degli oligonucleotidi, e gli indubbi progressi compiuti, l'efficienza globale di queste molecole come strumento di terapia genica rimane ancora non ottimale, come dimostra anche il successo limitato del pur vasto numero di sperimentazioni cliniche compiute negli ultimi anni. La prima applicazione degli oligonucleotidi a essere approvata dalle autorità negli Stati Uniti e in Europa è stata per il trattamento della retinite da citomegalovirus (CMV) nei pazienti con infezione da HIV-1. Questa sperimentazione era basata sulla somministrazione intraoculare di un ASO fosforotiato, chiamato fornivirsen, che aveva come bersaglio l'mRNA trascritto dall'unità trascrizionale immediata-precoce (geni IE) del CMV. Questo farmaco, tuttavia, ancorché efficace, è stato recentemente ritirato dal mercato nei paesi della Comunità Europea per motivi strettamente commerciali, in quanto la retinite da CMV nei pazienti con infezione da HIV-1 è diventata molto rara grazie al progresso delle terapie antiretrovirali. Molto più deludente, invece, è stato il trattamento di altre infezioni virali, quali quella da HSV-1 e HIV-1, in cui gli oligonucleotidi erano stati somministrati in maniera sistemica. Per ottenere un effetto terapeutico in queste situazioni, infatti, è richiesto che gli oligonucleotidi siano presenti in maniera permanente e ad alte concentrazioni nei tessuti, senza peraltro causare effetti collaterali importanti, un obiettivo difficilmente raggiungibile con le metodologie di veicolazione attualmente disponibili.

Molte delle sperimentazioni cliniche che utilizzano gli oligonucleotidi sono indirizzate alla terapia genica dei tumori. In questi casi, gli oligonucleotidi hanno come obiettivo gli mRNA di diversi geni indispensabili per la replicazione cellulare o coinvolti nella regolazione dell'apoptosi. Lo scopo di queste sperimentazioni è quindi quello di bloccare da un lato la crescita del tumore e dall'altro di indurre l'apoptosi delle cellule trasformate. La Tabella 2.2 riporta alcune delle applicazioni cliniche in cui gli oligonucleotidi sono stati utilizzati nella terapia dei tumori, somministrati per infusione endovenosa continua come DNA nudo o veicolati con lipidi, solitamente in combinazione con un trattamento chemioterapico convenzionale. Il risultato complessivo di queste sperimentazioni è stato modesto, specialmente per quanto riguarda l'utilizzo di ASO di prima generazione (fosforotiati). Alcuni dei composti di seconda generazione (fosforotiati con modificazione 2'-metossietile del ribosio), PNA e LNA e morfolino si sono peraltro



**Tabella 2.2.** Esempi di oligonucleotidi utilizzati per la sperimentazione clinica nella terapia genica dei tumori

Gene bersaglio	Funzione del gene	Nome del farmaco	Struttura dell'oligonucleotide	Tipo di tumore
Bcl2	Inibitore dell'apoptosi	G3139 (Oblimersen)	Fosforotioato	Melanoma, leucemia linfatica cronica, mieloma multiplo, carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC)
Clusterina	<i>Chaperon</i> delle proteine	OGX-011	Fosforotioato con ribonucleotidi modificati con 2'-metossietile ( <i>gapmer</i> )	Carcinoma della prostata, carcinoma della mammella, carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC)
Protein-chinasi C $\alpha$ (PKC $\alpha$ )	Trasduttore del segnale	ISIS 3621	Fosforotioato	Carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC)
Survivina	Inibitore dell'apoptosi	LY2181308	Fosforotioato con ribonucleotidi modificati con 2'-metossietile	Tumori solidi
Myb	Oncogene, fattore di trascrizione	LR3001	Fosforotioato con ribonucleotidi modificati con 2'-metossietile	Leucemia mieloide cronica ( <i>purging</i> del midollo osseo prima del trapianto)
XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)	Inibitore dell'apoptosi	AEG35156	Fosforotioato con ribonucleotidi modificati con 2'-metossietile	Leucemia mieloide cronica
HSP27	<i>Heat shock protein</i> , inibitore dell'apoptosi	OGX-427	Fosforotioato con ribonucleotidi modificati con 2'-metossietile	Carcinoma della prostata
STAT-3	Trasduttore del segnale e fattore di trascrizione	ISIS 345794	Fosforotioato con ribonucleotidi modificati con 2'-metossietile	Diversi tumori



rivelati più efficienti nei modelli animali, e sono attualmente in fase di sperimentazione clinica.

Infine, vanno ancora menzionate due ulteriori sperimentazioni terapeutiche degli oligonucleotidi, in cui la loro applicazione sembra dare risultati promettenti. La prima ha come bersaglio l'mRNA del gene dell'apolipoproteina B-100 (ApoB-100), un'importante proteina strutturale sulla superficie delle lipoproteine aterogene, quali VLDL e LDL. Apo-B100 facilita l'internalizzazione del colesterolo nelle cellule legandosi al recettore per le LDL e la sua iperproduzione è quindi legata allo sviluppo prematuro di aterosclerosi. Nella sperimentazione clinica, un oligonucleotide modificato contro ApoB-100, somministrato per via sistemica, si è dimostrato in grado di ridurre i livelli della proteina e, di conseguenza, quelli del colesterolo circolante. La seconda sperimentazione promettente, già citata sopra, è quella che utilizza oligonucleotidi morfolino, somministrati per via intramuscolare, per indurre *exon skipping* nei pazienti con distrofia muscolare di Duchenne.

Allo stato attuale, non è ancora chiaro se la scoperta del fenomeno dell'interferenza a RNA (vedi più sotto) e il conseguente sviluppo di metodologie di silenziamento genico basate sui siRNA, sia destinato progressivamente a sostituire l'utilizzo degli ASO nelle applicazioni mirate a ottenere lo spegnimento dell'espressione genica.

### Acidi nucleici catalitici

Negli anni '70 e '80 fu originariamente scoperto che gli RNA di alcuni organismi, tra cui il protozoo ciliato *Tetrahymena thermophila*, possiedono attività enzimatica, avendo la capacità di catalizzare il taglio dei legami fosfodiesterici presenti sulla propria o su altre molecole di RNA. Gli RNA con queste caratteristiche sono chiamati ribozimi.

Si conoscono oggi almeno sette classi di ribozimi naturali. Queste comprendono:

- 1) e 2) gli introni di gruppo I e II, che sono in grado di andare incontro a *splicing* attraverso un processo autocatalitico;
- 3) la subunità a RNA della ribonucleasi P (RNasi P) di *E. coli*, l'enzima responsabile della maturazione del 5' dei tRNA; nei batteri, questo enzima è composto da una subunità a RNA (RNA M1), appunto con funzione catalitica, e di una subunità proteica, con funzione strutturale (nell'uomo, la RNasi P è composta da una subunità a RNA, RNA H1, in cui l'attività di ribozima è presente solo in determinate circostanze, e da 10 subunità proteiche);
- 4) i ribozimi *hammerhead* ("a testa di martello"), presenti nel genoma a RNA di diversi viroidi e virusoidi delle piante, dove sono essenziali per sostenere il meccanismo di replicazione dell'RNA che avviene con un meccanismo a cerchio rotante (*rolling circle*);
- 5) i ribozimi *hairpin* ("a forcina"), anch'essi naturalmente presenti negli RNA satelliti di alcuni virus delle piante, dove partecipano al processo di replicazione del genoma a RNA virale;

- 6) il ribozima *pseudoknot* del virus dell'epatite  $\delta$  (HDV);
- 7) il ribozima dell'RNA satellite VS di *Neurospora*.

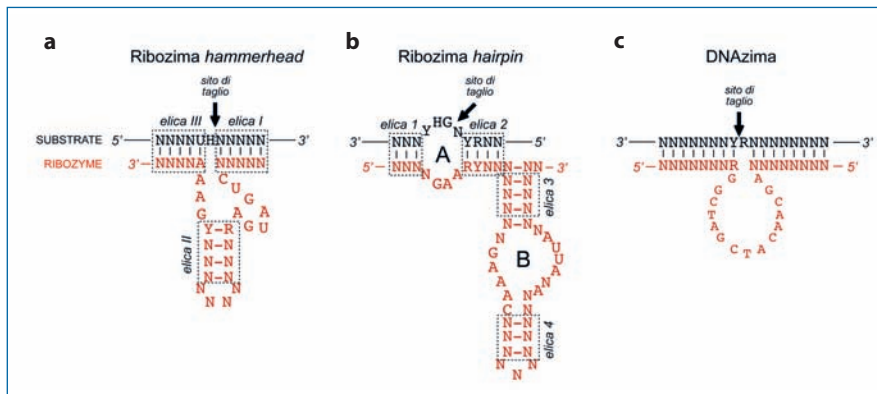
Mentre gli introni di gruppo I e II e la RNasi P hanno una lunghezza di diverse centinaia di nucleotidi e dipendono, per la loro funzione enzimatica, dalla formazione di complesse strutture secondarie di RNA, i ribozimi delle ultime 4 classi (in particolare, i ribozimi *hammerhead* e *hairpin*) sono corti (50-150 nucleotidi), e determinano la scissione del legame fosfodiesterico dell'RNA appaiandosi specificamente al proprio bersaglio. Il meccanismo generale di funzionamento di questi ribozimi è simile a quello di molte ribonucleasi (proteine), in cui un gruppo 2'-ossigeno nucleofilo attacca il fosfato adiacente nello scheletro di RNA, determinando la formazione di due prodotti di scissione, contenenti un 2',3'-fosfato ciclico e un'estremità 5'-OH. Dal momento che, per questi ribozimi, il taglio dipende dal precedente appaiamento specifico con l'RNA bersaglio, è possibile incorporare il *core* catalitico del ribozima all'interno di una molecola antisense, che ne dirige la funzione enzimatica su specifici mRNA cellulari o virali, determinandone la distruzione. A differenza degli ASO, i ribozimi sono dotati di vera attività enzimatica: dopo il taglio di una molecola di RNA bersaglio, essi si staccano da questa e sono riciclati per successivi cicli di appaiamento e taglio di altre molecole di substrato.

I ribozimi *hammerhead* sono tipicamente composti da ~40 nt e sono caratterizzati da una struttura secondaria che consiste in tre domini a elica (I, II, III) che racchiudono una giunzione che contiene il *core* catalitico determinato dalla presenza di specifici nucleotidi (Fig. 2.5a). Mentre l'elica II è formata intramolecolarmente dal ribozima, le eliche I e III dipendono dall'appaiamento della sequenza a singolo filamento del ribozima con sequenze complementari del substrato, e possono quindi essere modulate a piacimento per appaiarsi a un RNA bersaglio di cui si vuole determinare la distruzione.

I ribozimi *hairpin* sono costituiti da 4 eliche appaiate (eliche H1-H4) e due anse interne (A e B; Fig. 2.5b); il taglio enzimatico avviene a carico di un legame nell'ansa A. Negli RNA satelliti delle piante, il taglio avviene all'interno della stessa molecola di RNA; tuttavia, le sequenze delle eliche H1 e H2 possono essere modificate in maniera tale da renderle complementari alle sequenze desiderate di un RNA bersaglio, in modo da determinarne la scissione enzimatica. A differenza dei ribozimi *hammerhead*, i ribozimi *hairpin* funzionano senza richiedere il coordinamento di un atomo di metallo nel centro catalitico.

Una variante non naturale dei ribozimi è costituita dai cosiddetti desossiribozimi o DNAzimi, in cui l'acido nucleico è il DNA invece che l'RNA (Fig. 2.5c). Analogamente ai ribozimi, anche questa classe di molecole è composta da un dominio catalitico fiancheggiato da sequenze complementari al bersaglio di RNA. Il vantaggio dei DNAzimi rispetto ai ribozimi è legato alla maggiore stabilità del DNA rispetto all'RNA.

I campi di applicazione dei ribozimi (e dei DNAzimi) non differiscono sostanzialmente da quelli degli oligonucleotidi antisense, dal momento che tutte queste classi di molecole hanno come obiettivo primario il riconoscimento di un mRNA e la sua distruzione. L'utilizzo di queste molecole risulta quindi potenzial-



**Fig. 2.5.** Piccoli acidi nucleici catalitici. **a** Sequenza consenso e struttura secondaria di un ribozima *hammerhead* (in rosso) appaiato al proprio substrato (in nero). *N* indica qualsiasi nucleotide, *R* le purine, *Y* le pirimidine e *H* qualsiasi nucleotide a eccezione della *G*. Il ribozima *hammerhead* consiste di tre eliche e 11 residui non a elica, posti nella regione centrale molto conservata. Nei ribozimi comunemente utilizzati, l'elica II intramolecolare è formata da 4 paia di basi unite da un'ansa. Il sito di taglio del substrato è indicato; **b** sequenza consenso minima per un ribozima *hairpin* appaiato al proprio substrato; **c** sequenza nucleotidica e struttura secondaria di un DNAzima

mente interessante per la terapia genica delle malattie ereditarie autosomiche dominanti (in cui è richiesto che l'mRNA dell'allele patologico sia distrutto), delle malattie virali (in cui si ricerca la distruzione degli mRNA virali) o dei tumori. In quest'ultimo caso, l'obiettivo è quello di portare alla distruzione di mRNA iperespressi che concorrono a determinare il fenotipo trasformato, quali quelli di oncogeni attivati, o di mRNA che codificano proteine in grado di bloccare l'apoptosi delle cellule.

L'attività enzimatica dei ribozimi, che consente il loro riciclo su molteplici molecole bersaglio, determina una maggiore efficacia di queste molecole rispetto agli ASO, dal momento che questi determinano l'inattivazione del bersaglio in maniera stechiometrica. Come nel caso degli ASO, tuttavia, la somministrazione sistemica dei ribozimi è limitata dalla loro scarsa stabilità, dalla loro ridotta biodistribuzione e dall'intrinseca difficoltà a penetrare nelle cellule. Al contrario degli ASO, tuttavia, i ribozimi possono essere anche espressi endogenamente nelle cellule trasferendo i rispettivi geni nel contesto di vari vettori virali, come verrà discusso in seguito.

In termini di applicazioni cliniche, un ribozima sintetico avente come bersaglio il recettore 1 del *vascular endothelial growth factor* (VEGFR-1), somministrato per via sistemica, è stato utilizzato per inibire l'angiogenesi tumorale in diversi tipi di tumore, con successo limitato. Un altro ribozima sintetico indirizzato contro PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*, un co-fattore della DNA polimerasi  $\delta$  che è essenziale per consentire la replicazione del DNA cellulare), è stato

iniettato nell'umore vitreo per inibire la proliferazione delle cellule endoteliali nella retinopatia diabetica proliferativa. Infine, alcuni ribozimi sono stati espressi utilizzando vettori gammaretrovirali e lentivirali in alcune sperimentazioni per la terapia genica dell'infezione da HIV-1. Ulteriori dettagli su queste sperimentazioni sono presentati nei capitoli dedicati a ciascuna di queste malattie.

Analogamente agli ASO, non è chiaro in questo momento quali saranno le applicazioni cliniche che in futuro si continueranno a giovare dell'applicazione dei ribozimi e quali invece saranno più efficacemente affrontate mediante siRNA e shRNA.

### Piccoli RNA con funzione regolatoria (siRNA, microRNA)

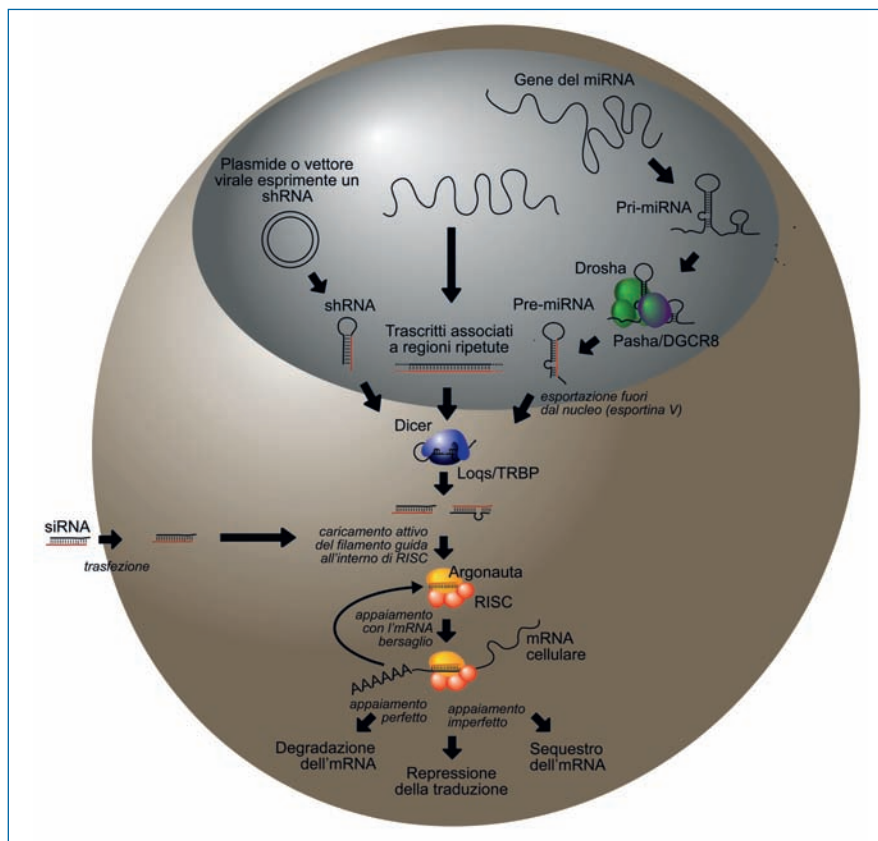
Alla fine degli anni '90, fu identificato un singolare effetto molecolare per cui, nel verme *Caenorhabditis elegans*, molecole di RNA a doppio filamento di cui uno dei due filamenti fosse complementare a un mRNA bersaglio risultavano estremamente efficaci nell'indurre il silenziamento dell'espressione di quell'mRNA, molto di più di quanto lo fossero molecole a singolo filamento, sia antisense che senso. Oggi sappiamo che questo fenomeno fa parte di un meccanismo generale di regolazione, originariamente identificato nelle piante già negli anni '80, che controlla naturalmente i livelli di mRNA a livello post-trascrizionale, promuovendo la distruzione dei messaggeri, in numerose specie di invertebrati e vertebrati. Questo meccanismo è collettivamente chiamato "interferenza a RNA" (*RNA interference*, RNAi) o "silenziamento genico post-trascrizionale a RNA", e gioca un ruolo fondamentale sia nella modulazione dell'espressione dei geni cellulari sia nella risposta alle infezioni virali.

La Figura 2.6 presenta una visione complessiva del fenomeno dell'RNAi. Il processo è innescato dalla presenza nel citoplasma di piccole molecole di RNA a doppio filamento (*double-stranded RNA*, dsRNA), della lunghezza di 21-26 bp, con un paio di nucleotidi non appaiati alle estremità 3' e con le estremità 5' fosforilate. Uno dei filamenti di queste molecole di dsRNA (il filamento "guida") viene assemblato all'interno di un complesso ribonucleoproteico (complesso RISC, *RNA-induced silencing complex*), che si lega specificamente all'mRNA bersaglio e ne determina il taglio o ne blocca la traduzione. Mediante l'appaiamento con l'mRNA bersaglio, il filamento guida di RNA conferisce specificità al RISC.

Le molecole di dsRNA che attivano l'RNAi possono essere generate mediante almeno due meccanismi diversi, quello dei microRNA e quello degli *short interfering RNA* (siRNA).

### MicroRNA (miRNA)

I miRNA vengono generati dalla cellula a partire da RNA cellulari che formano strutture a *stem-loop* (ovvero regioni palindromiche interrotte da un'ansa fatta di basi non complementari). Queste sequenze sono codificate da regioni di DNA



**Fig. 2.6.** Biogenesi e processamento intracellulare dei microRNA e dei siRNA (vedi testo per la descrizione)

localizzate all'interno degli introni dei geni che codificano proteine (nel 40% dei casi) o nelle regioni inter-geniche (nel 60% dei casi); in quest'ultimo caso, la medesima regione genomica spesso contiene un *cluster* di diversi miRNA uno a fianco dell'altro. La maggior parte dei miRNA sono trascritti dall'RNA polimerasi II sotto forma di RNA lunghi fino a un migliaio di nucleotidi, a partire da un promotore che, nel caso dei miRNA intronici, corrisponde di solito al promotore del gene che li ospita, mentre nel caso dei miRNA intergenici è costituito da una sequenza propria. Questi trascritti (definiti miRNA primari, pri-miRNA, contenenti il CAP all'estremità 5' e una sequenza poli-A all'estremità 3') sono processati nel nucleo da un complesso composto da almeno due componenti (l'enzima RNasi III Drosha e una proteina che lega il dsRNA chiamata Pasha in *Drosophila* o DGCR8 – *DiGeorge critical region 8* - nei mammiferi) per generare i pre-miRNA, costituiti da una corta struttura a *stem-loop* di circa 65-75 nt. I pre-miRNA sono quindi trasportati dal nucleo al citoplasma dall'esportina-5, e qui sono ulteriormente processati da un complesso di proteine che comprende la

proteina con attività di RNasi III Dicer e la proteina *Loquacious* (Loqs) in *Drosophila* o TRBP nell'uomo, per generare i miRNA propriamente detti, aventi due caratteristici nucleotidi non-appaiati (*overhang*) all'estremità 3'. Il processamento da parte del Dicer è accoppiato al caricamento del filamento guida all'interno di RISC, che rappresenta l'effettore finale dell'RNAi.

All'interno della cellula, la regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica da parte dei miRNA esercita un ruolo fondamentale in una serie di processi quali lo sviluppo embrionale, il differenziamento, l'apoptosi e la trasformazione tumorale. Più di un migliaio di miRNA umani sono già stati identificati, e il loro numero è certamente destinato ad aumentare; si stima che circa l'1-2% del genoma umano codifichi miRNA. Dal momento che un appaiamento perfetto non è richiesto ai miRNA per silenziare l'espressione di un gene bersaglio (vedi in seguito), ciascun miRNA, in media, può controllare l'espressione di circa 200 geni cellulari. Stime ottenute con valutazioni bioinformatiche indicano che almeno il 60% dei geni umani sia regolato mediante RNAi innescata da miRNA.

Al contrario dei miRNA, gli *short interfering RNA* (siRNA) sono prodotti da precursori costituiti da lunghi dsRNA, che possono essere prodotti endogenamente dalla cellula o forniti per via esterna. Queste molecole di dsRNA vengono anche processate da Dicer, e la via finale dell'RNAi mediata da RISC è comune con quella dei miRNA. Analogamente alle proteine Loqs e TRBP, la proteina che lega il dsRNA R2D2 interagisce con Dicer e favorisce l'assemblaggio dell'RNA dentro RISC.

L'RNAi porta al silenziamento dell'espressione genica mediante molteplici meccanismi, che coinvolgono il taglio dell'RNA bersaglio, l'inibizione della sua traduzione, o il suo sequestro in particolari compartimenti citoplasmatici.

Il componente catalitico chiave del complesso RISC è rappresentato da un complesso formato dai membri della famiglia di proteine Argonauto. Il complesso RISC di *Drosophila* contiene 5 proteine Argonauto, quello umano ~7. Queste proteine contengono un dominio PAZ, che lega i miRNA/siRNA, e un dominio PIWI, simile a quello delle RNasi H, che funge da effettore del taglio dell'RNA bersaglio a livello di uno specifico nucleotide (corrispondente al nucleotide in posizione 10 del filamento guida). Quest'attività endonucleolitica (conosciuta anche come attività *Slicer*, esercitata da Ago2 ma non da altri membri della famiglia di Argonauto che fanno parte del RISC), richiede un appaiamento perfetto tra il filamento guida dentro il RISC e l'RNA bersaglio, situazione che di solito si avvera quando i siRNA vengono forniti alla cellula per via esogena. In questa situazione, il RISC funziona come un enzima, degradando una molecola di substrato dopo l'altra, con grande efficienza complessiva. Nel caso della maggior parte dei miRNA prodotti endogenamente, invece, l'appaiamento avviene tipicamente nella regione non tradotta all'estremità 3' dei trascritti (3' UTR, *untranslated region*) e non è perfetto, ma coinvolge soltanto una regione di 7 nt all'estremità 5' del filamento guida (dal nucleotide 2 alla posizione 8), detta sequenza *seed* (seme). In questo caso, il silenziamento dell'espressione genica è prevalentemente dovuto all'inibizione della traduzione dell'mRNA bersaglio. Infine, un terzo meccanismo di silenziamento genico è dovuto alla proprietà delle proteine

Argonata, associate a RISC, di sequestrare gli mRNA bersaglio all'interno di specifici compartimenti citoplasmatici, chiamati corpi P (*P bodies*), in cui si pensa avvenga specificamente la degradazione dell'RNA.

### Utilizzo terapeutico dell'RNAi

L'introduzione nelle cellule di lunghe molecole di RNA a doppio filamento, composte da diverse centinaia di paia di basi, è una maniera molto efficace per indurre artificialmente il meccanismo dell'RNAi nei funghi, nelle piante, in *D. melanogaster* e *C. elegans*. Tuttavia, la possibilità di utilizzare i meccanismi dell'RNAi a scopo terapeutico nell'uomo è stata originariamente scoraggiata dall'osservazione che l'introduzione di molecole di dsRNA più lunghe di 30 bp nelle cellule di mammifero determina l'attivazione della produzione di interferone. Questa citochina viene normalmente secreta da molti tipi cellulari in seguito all'infezione con virus ad RNA che, nel loro ciclo replicativo, generano appunto forme di RNA a doppio filamento. Tuttavia, si è successivamente notato che molecole di dsRNA di 21-22 nucleotidi, con due nucleotidi non appaiati alle estremità 3', non stimolano la produzione di interferone; questa osservazione ha aperto la strada all'utilizzo prima sperimentale e, più recentemente, anche clinico, dell'RNAi.

Alcuni esempi di potenziali utilizzi dell'RNAi per la terapia genica umana sono presentati nella Tabella 2.3. A livello pre-clinico, diversi studi hanno dimostrato che queste molecole sono ben tollerate e mostrano un'efficacia e specificità complessive decisamente superiori agli ASO e ai ribozimi. Tuttavia, i siRNA si prestano meno degli oligonucleotidi all'introduzione di modificazioni chimiche che ne migliorino la stabilità e la biodistribuzione *in vivo*, con l'eccezione della possibilità di introdurre qualche legame fosforotiato o un gruppo alchilico in posizione 2'-O del ribosio di alcuni nucleotidi.

Il primo siRNA per cui è stata richiesta l'approvazione per l'uso terapeutico alla *Food and Drug Administration* degli Stati Uniti risale al 2004. Tra i farmaci attualmente in produzione possono essere ricordati siRNA per il trattamento dell'infezione da parte del virus respiratorio sinciziale (RSV), del virus dell'epatite C (HCV), del virus dell'immunodeficienza di tipo 1 (HIV-1), nonché per la terapia genica del morbo di Huntington e di altre malattie neurodegenerative. Per una discussione della logica che sottende a queste applicazioni si rimanda al capitolo sulle Sperimentazioni cliniche di terapia genica.

Sperimentazioni cliniche di fase I e fase II sono già state condotte con tre diversi siRNA per il trattamento di una importante patologia dell'occhio, la degenerazione maculare legata all'età (*age-related macular degeneration*, AMD), traendo quindi vantaggio della possibilità di somministrare direttamente i siRNA in un ambiente ristretto e delimitato come la camera posteriore dell'occhio, ovvero nell'umor vitreo. La forma essudativa dell'AMD è esacerbata dalla produzione patologica di nuovi vasi sanguigni a livello retinico, un processo largamente dipendente dall'iperproduzione, stimolata dall'ambiente ipossico, di fattori angiogenetici quali il VEGF. Uno dei siRNA utilizzati in queste sperimentazioni



**Tabella 2.3.** Potenziali approcci di terapia genica basati sull'utilizzo di siRNA

	Malattia	Gene bersaglio
Malattie ereditarie o multifattoriali	Ipercolesterolemia familiare	Apolipoproteina B
	Degenerazione maculare legata all'età (AMD)	VEGF, VEGFR1, RTP801
	Sclerosi laterale amiotrofica (SLA)	SOD1
	Atassia spinocerebellare di tipo 1	Atassina 1
	Morbo di Alzheimer	Tau, APP
	Morbo di Huntington	Allele mutato dell'Huntingtina
	Morbo di Parkinson	$\alpha$ -sinucleina
Tumori	Diversi tipi di tumori	Bcl-2
	Leucemia mieloide acuta (AML)	AML1/MTG8
	Leucemia mieloide cronica (CML)	Bcr-Abl
	Glioblastoma multiforme	MMP-9, uPAR
Malattie infettive	Epatite B	HBsAg
	Epatite C	NS3, NS5B, E2
	Influenza	Nucleoproteina, polimerasi
	HIV-1	Geni virali o cellulari coinvolti nella replicazione virale
	HSV-1	Glicoproteina E
	Virus Respiratorio Sinciziale (RSV)	Geni P, N, L

cliniche ha avuto appunto come bersaglio VEGF stesso, un altro il recettore R1 del VEGF e un terzo il gene indotto dall'ipossia RTP801. I primi risultati ottenuti sono stati del tutto rassicuranti in termini di sicurezza, e incoraggianti in termini di efficacia.

Uno dei problemi più rilevanti dei siRNA è legato alla possibilità che essi vadano a silenziare in maniera inappropriata geni cellulari diversi dal loro bersaglio specifico (il cosiddetto *off-target effect*): dal momento che la presenza di una sequenza di complementarietà tra il siRNA e un RNA bersaglio di solo 7 nucleotidi (sequenza *seed*; vedi in precedenza) è sufficiente per inibire la traduzione, è quasi inevitabile che ciascun siRNA possa silenziare, ancorché in maniera meno efficace del suo bersaglio specifico, anche altri geni. A livello sperimentale si può ovviare a questo inconveniente modulando la concentrazione di siRNA nella cellula, o, meglio, utilizzando più di un siRNA per silenziare lo stesso gene, ciascuno somministrato a concentrazioni basse e avente come bersaglio una regione diversa dell'mRNA. È possibile che queste strategie possano essere utilizzate in futuro anche *in vivo* per modulare la specificità di azione dei siRNA a livello clinico.

Infine, è interessante ricordare che il meccanismo dell'RNAi può anche essere utilizzato per spegnere l'espressione dei miRNA stessi, utilizzando corte sequenze di RNA antisenso complementari alle sequenze dei miRNA. Queste

molecole, che possono essere stabilizzate chimicamente o essere composte da LNA (*locked nucleic acid*), prendono il nome di *antagomirs* (in particolare, quando legate covalentemente ad una molecola di colesterolo, che ne favorisce il trasporto e l'ingresso nella cellula), e potrebbero in futuro essere utilizzate in applicazioni mirate a modulare le funzioni dei miRNA endogeni e quindi dei geni da essi fisiologicamente regolati (ad esempio, per attivare i livelli di espressione di un gene regolato in maniera negativa da un miRNA).

### Decoy

Gli acidi nucleici *decoy* (letteralmente “specchietti per le allodole”) sono piccole molecole di DNA o RNA contenenti un sito di legame per una determinata proteina e quindi in grado, quando presenti ad alte concentrazioni nella cellula, di legarsi a questa, sottraendola alle sue funzioni normali. Ad esempio, la replicazione del virus HIV-1 è strettamente dipendente dal legame di due delle sue proteine, il transattivatore Tat e la proteina regolatoria Rev, a specifiche sequenze di RNA presenti nei trascritti del virus, chiamate rispettivamente TAR (*trans-acting response*) e RRE (*Rev-responsive element*). In assenza di Tat non avviene la trascrizione del provirus integrato, in assenza di Rev gli mRNA nucleari non processati non vengono trasportati dal nucleo al citoplasma per la traduzione. L'iperespressione di corte sequenze di RNA corrispondenti a TAR o RRE nella cellula sottrae queste proteine alle loro funzioni normali e ha quindi la capacità di inibire la replicazione virale (vedi sezione sulla Terapia genica dell'infezione da HIV-1).

Il successo degli approcci basati sui *decoy* è limitato dall'alta concentrazione che essi devono persistentemente mantenere nella cellula per svolgere la propria azione competitiva, concentrazione che difficilmente è ottenibile somministrando l'acido nucleico per via esogena e che richiede, quindi, per i *decoy* ad RNA, la loro sintesi intracellulare.

### Aptameri

Nel 1990, alcuni laboratori svilupparono una metodologia, chiamata SELEX, per la selezione di molecole di RNA in grado di legarsi specificamente a proteine o piccoli composti organici scelti, partendo da una larga collezione di oligonucleotidi con sequenza casuale. Queste molecole, definite aptameri, sfruttano quindi la struttura secondaria degli acidi nucleici (ovvero la loro conformazione spaziale), anziché la complementarietà della loro sequenza, per legarsi a uno specifico bersaglio. Si tratta solitamente di corti frammenti di RNA, composti da 25-40 ribonucleotidi che presentano una struttura terziaria tale da consentire il loro legame ad alta affinità con una molecola bersaglio (con  $K_d$  che variano tra  $1 \times 10^{-9}$  e  $1 \times 10^{-12}$  Mol/L). Queste molecole sono in grado di legarsi specificamente al bersaglio e di sottrarlo alle sue funzioni nella cellula o nell'ambiente extracellulare,

o possono essere utilizzate per legare il bersaglio in saggi di tipo diagnostico. Dal punto di vista concettuale, quindi, le applicazioni degli aptameri sono simili a quelle degli anticorpi; a differenza degli anticorpi, tuttavia, gli aptameri sono più semplici da produrre in grande quantità, non sono immunogenici e mostrano maggiore stabilità, in quanto il loro scheletro può essere modificato per rendere le molecole resistenti alle nucleasi e prevenirne la rapida eliminazione quando somministrate per via sistemica.

La prima di queste molecole a raggiungere l'applicazione clinica è stato un aptamero contenente un RNA modificato di 28 nucleotidi, coniugato a due molecole di glicole polietilenico (vedi paragrafo successivo) chiamato pegaptanib, capace di legare ad alta affinità il fattore angiogenetico VEGF. Come discusso sopra, la produzione non controllata di questo fattore è uno dei principali responsabili dell'aumentata vascolarizzazione patologica della retina in corso di degenerazione maculare senile (AMD), una delle più importanti patologie che portano alla cecità nell'adulto. Sono ormai alcune migliaia i pazienti in cui il pegaptanib è stato somministrato nell'occhio per via intravitreale in alcune sperimentazioni cliniche di fase I, II e III. Il trattamento è risultato efficace, dimostrando un rallentamento della progressione della malattia nella maggior parte dei pazienti.

### Modalità di somministrazione o sintesi intracellulare dei piccoli RNA regolatori

Le diverse classi di piccoli acidi nucleici non codificanti possono essere somministrate alle cellule *in vivo* come molecole sintetiche o, nel caso degli RNA, espresse direttamente dalle cellule dopo il trasferimento al loro interno dei geni corrispondenti, sotto il controllo di un opportuno promotore.

### Somministrazione esogena

Nel caso in cui gli acidi nucleici siano somministrati per via esogena, esiste una grande variabilità nell'efficienza con cui diversi tipi cellulari *in vitro* e diversi tessuti *in vivo* internalizzano queste molecole. Le proprietà farmacocinetiche dei piccoli DNA o RNA possono essere variamente modificate dall'introduzione, quasi obbligatoria per evitare la rapidissima distruzione del DNA e dell'RNA naturali, delle varie modificazioni chimiche descritte nel paragrafo sugli Oligonucleotidi modificati. In alcuni casi, tali modificazioni sono sufficienti per consentire un'accettabile biodistribuzione tissutale e un'adeguata efficienza di ingresso nelle cellule bersaglio; in altri casi, è possibile veicolare gli acidi nucleici utilizzando lipidi cationici o polimeri.

Quando somministrati *in vivo*, a meno che l'inoculazione non avvenga in un distretto anatomicamente circoscritto quale la camera posteriore dell'occhio, i piccoli oligonucleotidi sono caratterizzati da una cinetica di eliminazione dal circolo sanguigno spesso troppo rapida. Per ovviare a questo problema, una delle

tecnologie utilizzate è quella di coniugare gli acidi nucleici a molecole quali il glicole polietilenico (*polyethylene glycol*, PEG), che aumenta la permanenza dei composti nel circolo sanguigno. Questo processo, definito “PEGilazione” è analogo a quello utilizzato dall’industria farmaceutica per migliorare le proprietà farmacocinetiche di diverse proteine ricombinanti utilizzate per la terapia, quali ad esempio l’interferone, l’eritropoietina e diverse altre.

Infine, una strategia molto interessante per favorire selettivamente l’ingresso di piccole molecole di acidi nucleici (oligonucleotidi, siRNA, antagomirs, ribozimi) nelle cellule e, in particolare, nel fegato, è quella di coniugarle in maniera covalente con una molecola di colesterolo. In questa maniera, il complesso colesterolo-acido nucleico viene internalizzato nelle cellule utilizzando il recettore per le lipoproteine a bassa densità (*low density lipoprotein*, LDL), che riconosce, appunto, le molecole di colesterolo e le internalizza con un meccanismo di endocitosi.

### Sintesi intracellulare di RNA regolatori

In virtù della loro specificità di riconoscimento del bersaglio, diversi tipi di molecole di RNA (in particolare RNA con funzione antisense, ribozimi, siRNA, RNA *decoy*, aptameri) presentano grandi potenzialità terapeutiche. Tuttavia, molte delle applicazioni per cui sarebbero desiderabili (tra cui la terapia di diverse malattie virali come l’infezione da HIV e HCV, la terapia dei tumori mediante la distruzione di mRNA cellulari, o la terapia di alcune malattie genetiche dominanti in cui si desidera silenziare uno specifico allele) richiedono la prolungata o continua azione dell’RNA terapeutico, un traguardo difficilmente perseguibile mediante la sua somministrazione per via esogena. Allo scopo di prolungare l’attività dei piccoli RNA regolatori, è altresì possibile trasferire nelle cellule i geni che codificano queste molecole e sfruttare quindi il processo di trascrizione per sintetizzarle endogenamente.

Per quanto riguarda i ribozimi, la produzione intracellulare di queste molecole può essere ottenuta inserendo le sequenze di DNA che le codificano all’interno della regione non tradotta (*untranslated region*, UTR) di geni trascritti dalla RNA polimerasi II (Pol II), quale, ad esempio, il gene dell’actina. Oppure, i ribozimi possono essere trascritti inserendo la loro sequenza nel contesto di quelle dei tRNA (trascritti da Pol III) o, più efficacemente, dei piccoli RNA nucleari (*small nuclear RNA*, snRNA) U1 (trascritto da Pol II) o U6 (Pol III), coinvolti nel processo di *splicing*, o del piccolo RNA di adenovirus VA-I (Pol III). Il ribozima solitamente sostituisce una porzione di questi piccoli RNA e viene quindi trascritto nel contesto di queste molecole, utilizzando come promotori le regioni regolatorie dell’espressione proprie di questi trascritti. Le cassette trascrizionali rappresentate dai tRNA, snRNA o l’RNA VA-I contenenti il ribozima possono essere clonate all’interno di vettori retrovirali, adenovirali o AAV. Nel caso dei vettori retrovirali, una strategia che si è rivelata particolarmente efficace è la clonazione all’interno della regione U3 del LTR al 3’ del genoma virale, in modo

da sfruttare la duplicazione del gene del ribozima anche nel LTR al 5' del provirus durante il processo di trascrizione inversa (vettori doppia-copia; vedi sezione sui Vettori basati sui gammaretrovirus).

Analoghe strategie possono essere applicate l'espressione intracellulare di RNA *decoy* o aptameri, inserendo quindi il DNA che codifica le rispettive sequenze nel contesto di piccoli RNA trascritti da Pol II o pol III, e ottenendo il trasferimento di questi geni con plasmidi o vettori virali. Nel caso dei trascritti con funzione antisenso, questi possono anche essere relativamente lunghi, ed essere quindi prodotti come mRNA canonici trascritti da Pol II e processati con l'aggiunta del CAP e di una coda di poli-A. Un esempio di tale trascritto utilizzato per la terapia genica è desumibile da una sperimentazione clinica attualmente in corso, in cui viene utilizzato un vettore lentivirale per esprimere una lunga sequenza antisenso relativa al gene *env* di HIV-1 (vedi sezioni sulla Terapia genica dell'infezione da HIV-1).

Anche i siRNA possono essere prodotti all'interno della cellula utilizzando la trascrizione da parte della Pol III o della Pol II. La Pol III genera dei trascritti abbondanti con estremità 3' e 5' definite e non modificate da CAP e coda di poli-A. Due sono i promotori più utilizzati, quelli del snRNA U6 o quello del gene della subunità H1 dell'RNasi P umana. La strategia di gran lunga più utilizzata, è quella di esprimere un unico RNA contenente, di seguito, la sequenza bersaglio (19-21 nt) e quella ad essa complementare (19-21 nt) separate da un'ansa (3-9 nt), in modo da generare una corta forcina (*hairpin*; *short hairpin RNA*, *shRNA*). Questi shRNA sono quindi processati dall'enzima Dicer per generare siRNA di 21-23 nucleotidi. Alternativamente, le sequenze che generano gli shRNA possono essere inserite all'interno di una delle anse di un microRNA naturale, quale miR-30, in modo da conferire stabilità all'shRNA e consentirne l'espressione regolata da parte del promotore del miRNA stesso. Questi costrutti, definiti shRNAmir, vanno incontro alle stesse fasi di maturazione dei miRNA endogeni. Analogamente a quanto descritto in precedenza per i ribozimi, le cassette trascrizionali, sia di Pol III che di Pol II, possono essere veicolate nella cellula utilizzando plasmidi o, più efficientemente, vettori retrovirali, adenovirali o AAV.

Infine, è importante osservare che l'espressione intracellulare di shRNA può essere potenzialmente tossica. Analogamente ai siRNA introdotti esogenamente nella cellula, la loro produzione endogena può causare effetti indesiderati, quali l'attivazione del sistema dell'immunità innata o il silenziamento genico *off-target*. Inoltre, dal momento che gli shRNA e gli shRNAmir sfruttano l'apparato cellulare dei miRNA per la loro produzione, essi possono competere con i miRNA endogeni e inibirne la funzione.

## Letture consigliate

### Geni codificanti proteine

- Baum C, Margison GP, Eckert H-G et al (1996) Gene transfer to augment the therapeutic index of anticancer chemotherapy. *Gene Ther* 3:1-3
- Lobato MN, Rabbitts TH (2003) Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents. *Trends Mol Med* 9:390-396
- Muyldermans S, Cambillau C, Wyns L (2001) Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem Sci* 26:230-235

### Acidi nucleici non codificanti

- Brown BD, Naldini L (2009) Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nat Rev Genet* 10:578-585
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642-655
- Castanotto D, Rossi JJ (2009) The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 457:426-433
- Duca M, Vekhoff P, Oussedik K et al (2008) The triple helix: 50 years later, the outcome. *Nucleic Acids Res* 36:5123-5138
- Dykxhoorn DM, Palliser D, Lieberman J (2006) The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene Ther* 13:541-552
- Fichou Y, Férec C (2006) The potential of oligonucleotides for therapeutic applications. *Trends Biotechnol* 24:563-570
- Que-Gewirth NS, Sullenger BA (2007) Gene therapy progress and prospects: RNA aptamers. *Gene Ther* 14:283-291
- Rao DD, Vorhies JS, Senzer N et al (2009) siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Delivery Rev* 61:746-759
- Ryther RC, Flynt AS, Phillips JA 3rd et al (2005) siRNA therapeutics: big potential from small RNAs. *Gene Ther* 12:5-11
- Sioud M, Iversen PO (2005) Ribozymes, DNazymes and small interfering RNAs as therapeutics. *Curr Drug Targets* 6:647-653
- Shi Y (2003) Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet* 19:9-12
- Stevenson M (2004) Therapeutic potential of RNA interference. *N Engl J Med* 351:1772-1777
- Zentilin L, Giacca M (2004) In vivo transfer and expression of genes coding for short interfering RNAs. *Curr Pharm Biotechnol* 5:341-347
- Wagner RW (1994) Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 372:333-335

Terapia genica

Giacca, M.

2011, XXI, 240 pagg., Softcover

ISBN: 978-88-470-1988-1