

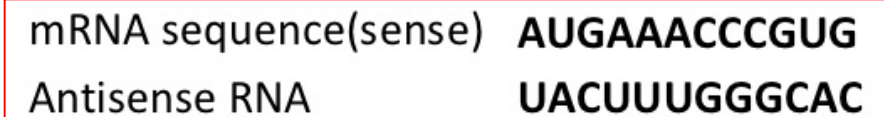
CTF
Corso Farmaci Biologici

Gli oligonucleotidi:
struttura, caratteristiche, impiego

Gli **oligonucleotidi** sono polimeri costituiti da un numero variabile da 13 a 60 nucleotidi di DNA o RNA. Benchè sintetizzati per via chimica, si annoverano fra i farmaci biotecnologici e innovativi, poiché si tratta di macromolecole di dimensioni molto più grandi dei farmaci a piccola molecola e con elevata specificità d'azione sul bersaglio farmacologico.

Le classi di oligonucleotidi per un possibile uso terapeutico sono:

1. oligonucleotidi antisenso a DNA (aODN);
2. oligonucleotidi antisenso a RNA (*small interfering RNA*, siRNA);
3. ribozimi;
4. oligonucleotidi antigène;
5. aptameri;
6. oligonucleotidi “decoy” di fattori di trascrizione,



Le classi 1, 2, 3, e 4 sono dei modulatori dell'espressione genica; svolgono un'azione molto selettiva che sfrutta il principio di complementarità fra le basi azotate che caratterizza gli acidi nucleici.

In linea di principio, questo tipo di molecole/strumenti farmacologici possono essere progettate per inibire l'espressione di qualsiasi gene e, quindi, proteina codificata dal genoma umano, con un tempo di latenza nell'insorgenza di risposta biologica che dipende dal turnover fisiologico della proteina bersaglio.

Gli oligonucleotidi di tipo 5 e 6 sono, invece, dei modulatori dell'attività di una proteina bersaglio, poiché agiscono direttamente su di essa tramite un legame a elevata affinità. Per natura chimica e meccanismo d'azione, questa classe di molecole presenta dei vantaggi rispetto agli anticorpi monoclonali che agiscono con un meccanismo d'azione simile.

Meccanismo/i d'azione degli oligonucleotidi

Gli oligonucleotidi antisenso (*Antisense Oligonucleotides*, **ASO**) sono di due tipi:

- gli ASO a DNA (*antisense OligoDesoxiNucleotides*, ***αODN***), costituiti da singoli filamenti di DNA - di 15-20 nucleotidi
- gli ASO a RNA, rappresentati dagli *small interfering RNA* (***siRNA***), formati da due filamenti complementari di RNA di 19-21 nucleotidi.

La lunghezza dell'oligomero è tale da permettere un appaiamento specifico con l'RNA bersaglio e la formazione di duplex a doppio filamento DNA-RNA o RNA-RNA.

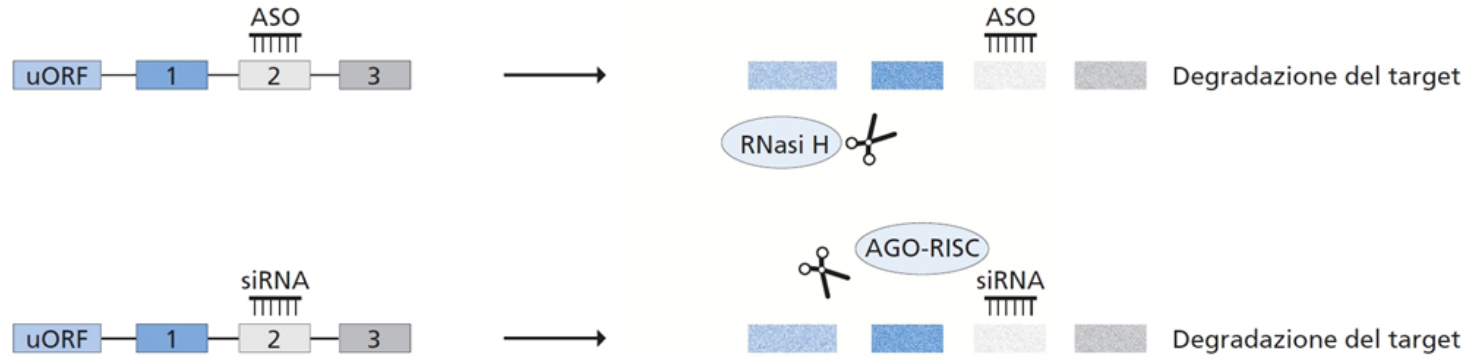
Una volta appaiati all'RNA, gli ASO inducono due differenti risposte:

- attivazione di ribonucleasi (RNasi), ovvero RNasi H o argonauta 2 (AGO2), che degradano selettivamente l'mRNA;
- inibizione della traduzione o della maturazione dell'RNA, mediata da un meccanismo d'ingombro sterico.

Una volta appaiati all'RNA, gli ASO inducono due differenti risposte:

- attivazione di ribonucleasi (RNasi), ovvero RNasi H o argonata 2 (AGO2), che degradano selettivamente l'mRNA;
- inibizione della traduzione o della maturazione dell'RNA, mediata da un meccanismo d'ingombro sterico.

(a) Silenziamento genico attraverso l'attivazione di enzimi cellulari



Attivazione di RNasi H e degradazione dell'RNA bersaglio

Attivazione di AGO2 (argonata 2) e degradazione dell'RNA bersaglio

(b) Silenziamento genico attraverso ingombro sterico

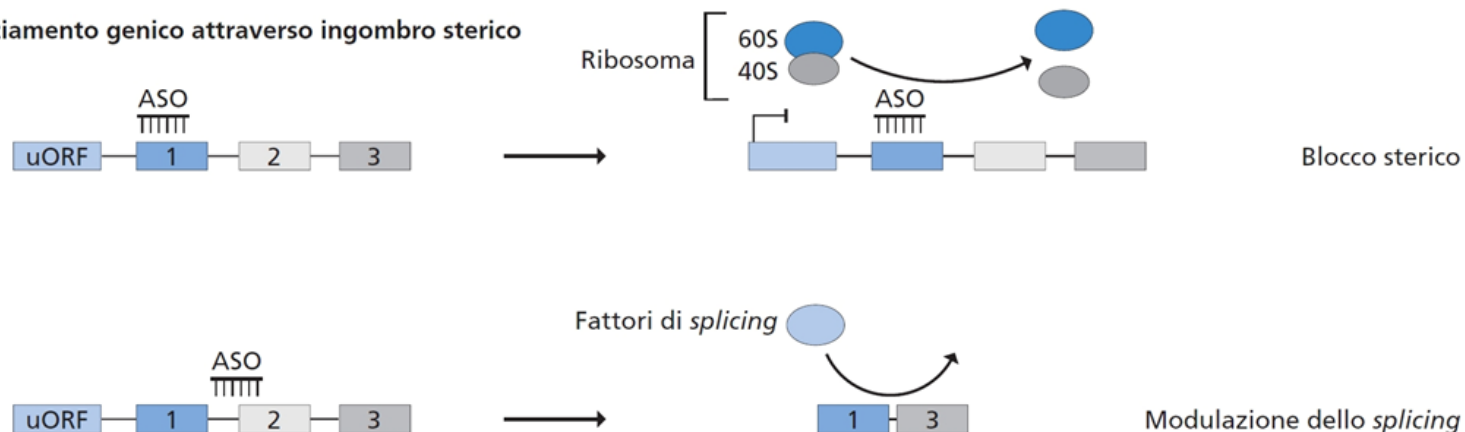


Figura 12.1 (a) Il legame ASO-mRNA genera un ibrido che funge da substrato per l'RNasi H (in alto). Il siRNA associato al complesso RISC attiva AGO2. L'attività di queste ribonucleasi porta al taglio dell'mRNA target (in basso). **(b)** Gli aODN inibiscono la traduzione di un mRNA (in alto) o lo splicing di un pre-mRNA (in basso) interagendo con le sequenze importanti per l'avvio di questi processi e inibendole mediante ingombro sterico.

- attivazione di ribonucleasi (RNasi), ovvero RNasi H o argonata 2 (AGO2), che degradano selettivamente l'mRNA;

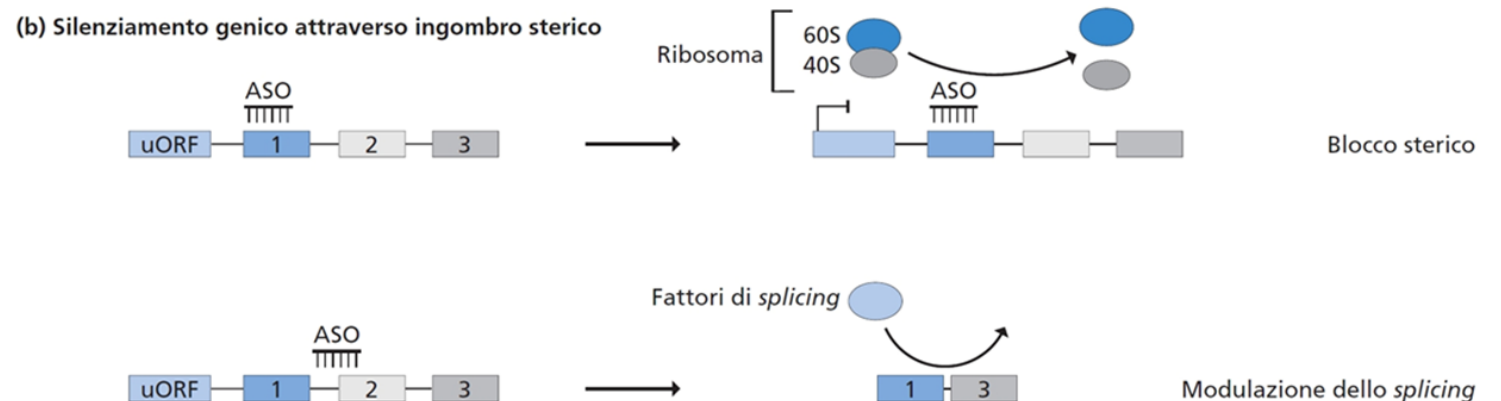
small interfering RNA (siRNA sintetici e double strand) e short hairpin RNA (shRNA, naturali e danno origine a un double strand siRNA): sono entrambi (derivati da sequenze endogene o sintetizzati in base alla complementarità Watson-Crick) si inseriscono nel processo fisiologico di «interferenza dell'RNA», e si legano al complesso di silenziamento indotto da RNA (RNA-Induced Silencing Complex, RISC), contenente anche le endonucleasi AGO.

In questo modo, mentre uno dei due filamenti di siRNA è degradato, l'altro, detto «filamento guida», trasporta il complesso RISC su un mRNA complementare alla propria sequenza nucleotidica, formando un ibrido RNA-RNA che attiva e induce AGO a degradare l'mRNA.

Mediante questo processo endogeno, i siRNA inibiscono l'espressione genica in modo molto specifico ed efficiente

- inibizione della traduzione o della maturazione dell'RNA, mediata da un meccanismo d'ingombro sterico.

b) Gli aODN inibiscono la traduzione di un mRNA (in alto nella slide precedente) o lo splicing di un pre-mRNA (in basso nella slide precedente) interagendo con le sequenze importanti per l'avvio di questi processi e inibendole mediante ingombro sterico.



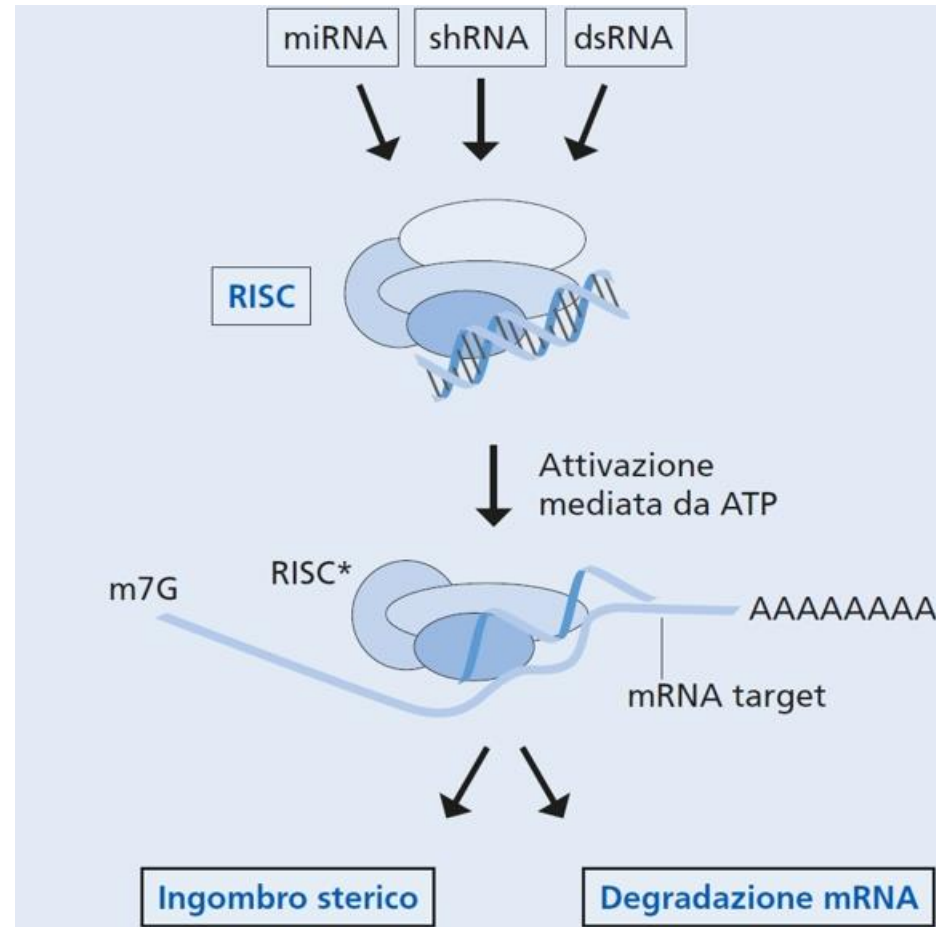


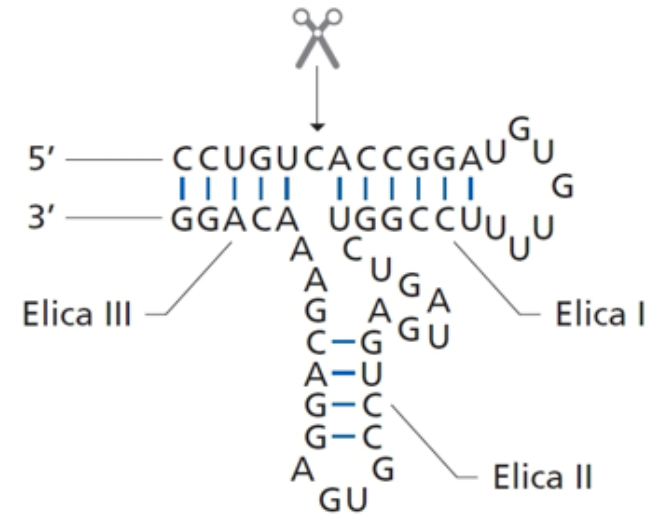
Figura A Meccanismo di interferenza della traduzione di un mRNA bersaglio mediato da RNA non codificante di piccole dimensioni.

I **ribozimi** sono molecole di RNA ad attività catalitica che portano al taglio dei legami fosfodiesterici in una catena di ribonucleotidi a doppio filamento.

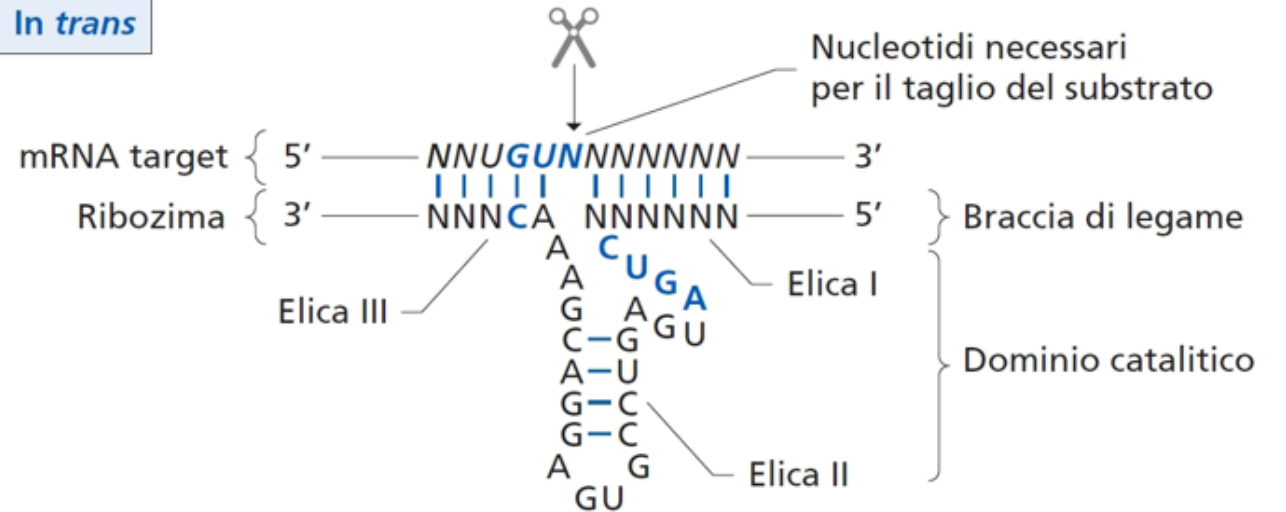
La concentrazione elevata di ioni divalenti necessari per l'attività e la bassa efficienza di assorbimento limitano l'applicazione terapeutica dei ribozimi, mentre sono dei validi strumenti per analizzare o validare nuovi bersagli costituiti da proteine.

Figura 12.2 Struttura molecolare che induce l'autocatalisi (taglio in *cis*) di un ribozima *hammerhead* o il taglio di un mRNA bersaglio (taglio in *trans*).

In *cis*



In *trans*



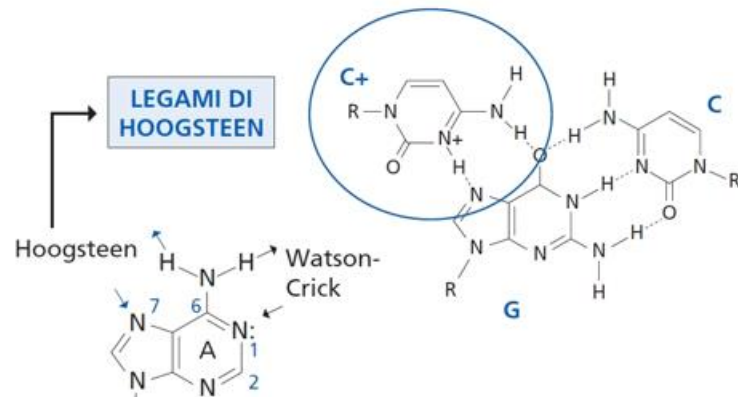
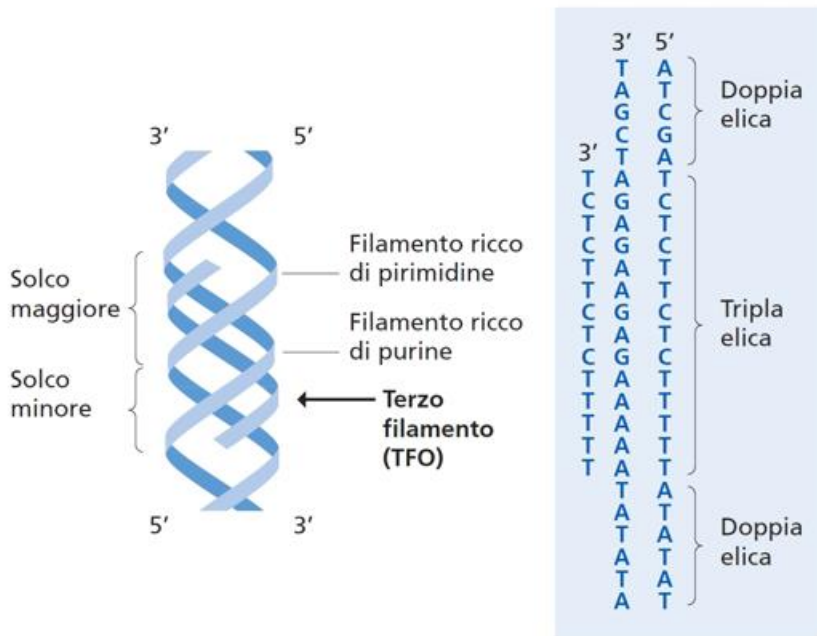


Figura 12.3 Interazioni macromolecolari e legami chimici nel meccanismo di modulazione dell'espressione genica dei TFO.

Oligonucleotidi antigène detti Triplex o TFO (Triplex-Forming oligonucleotides). I TFO sono oligonucleotidi a singolo filamento di DNA che si intercalano nel solco maggiore del DNA, formando legami a tripla elica con sequenze genomiche ricche di basi puriniche. La specificità dell'interazione è dovuta alla possibilità di formare legami idrogeno con adenina e guanina, detti legami di Hoogsteen con conseguente effetto d'ingombro sterico e inibizione della trascrizione.
NON ATTUALMENTE IMPIEGATI IN TERAPIA

Gli **aptameri** (lat. *aptus* - adatto e gr. *meros* - parte) sono molecole oligonucleotidiche che si legano a una specifica molecola bersaglio. Possono essere utilizzati sia per la ricerca di base sia per scopi clinici come farmaci macromolecolari.

Gli aptameri possono essere combinati con i ribozimi per autodegradarsi in presenza della loro molecola bersaglio. Queste molecole composte hanno applicazioni di ricerca, industriali e cliniche ma attualmente hanno applicazione clinica molto ridotta

Gli **oligonucleotidi *decoy*** (“esca”) sono DNA a doppio filamento progettati per legare fattori di trascrizione e inibire la loro attività, modulando così l’espressione genica. Per ottenere un’azione specifica contro un fattore di trascrizione, i DNA *decoy* hanno una sequenza nucleotidica che mima quella presente nel sito di legame del fattore di trascrizione al promotore dei geni bersaglio. Introdotti nella cellula ad alte concentrazioni, i DNA *decoy* sottraggono il fattore di trascrizione dal legame con il promotore e neutralizzano la sua azione regolatrice sui geni bersaglio

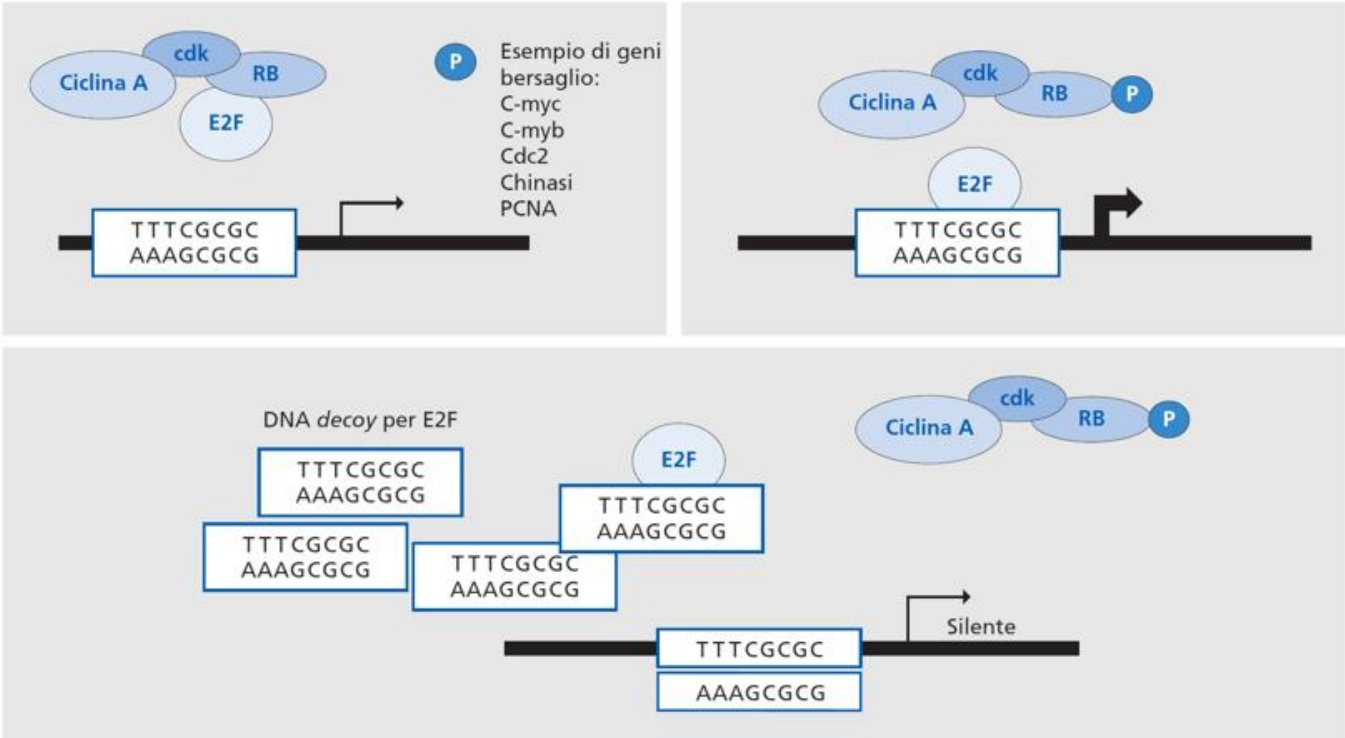
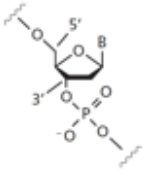


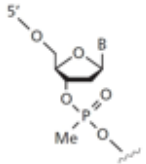
Figura 12.4 Meccanismo d’azione degli oligonucleotidi a DNA *decoy*: l’esempio del fattore di trascrizione E2F che controlla l’espressione di geni legati alla proliferazione cellulare.

Oligonucleotide non modificato

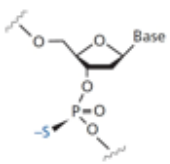


Oligonucleotidi di prima generazione

Metilfosfonati

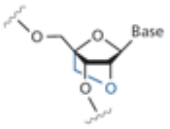


Fosforotiati

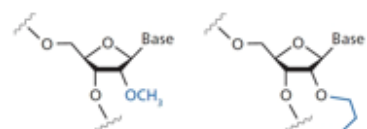


Oligonucleotidi di seconda generazione

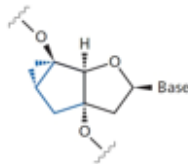
LNA



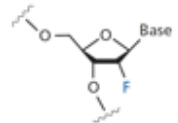
2'-O-Metile e metossietile



DNA triciclico

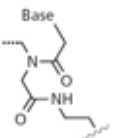


2' fluoro



Oligonucleotidi di terza generazione

PNA



PMO

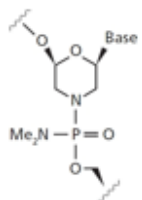


Figura 12.6 Modificazioni chimiche apportate agli oligonucleotidi.

Rapida degradazione e una certa tossicità dei prodotti di degradazione.

Più stabili, meglio assorbiti e distribuiti e meno escreti vs ASO immodificati; applicabilità ridotta da necessità di dosi alte e ripetute.

Questi ASO sono chiamati LNA (*Locked Nucleic Acid*) e mostrano un'affinità di legame senza precedenti con un generale miglioramento delle proprietà farmacocinetiche. Anche i DNA triciclici (tc-DNA), costituiti da tre anelli condensati, mostrano un aumento della lipofilia con un miglior profilo di assorbimento.

3° gen: gli acidi peptidonucleici (Peptidic Nucleic Acid, PNA), e i morfolino fosforodiamidati (Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers, PMO): applicazioni particolari.

L'assorbimento degli oligonucleotidi per via orale, intravitale o polmonare è molto variabile, generalmente inferiore all'1% della dose somministrata, perciò sono prevalentemente somministrati per via endovenosa e sottocutanea.

La BEE è impermeabile agli ASO, ma l'iniezione intratecale, cioè nel liquor spinale, permette una buona distribuzione al sistema nervoso centrale. Dopo somministrazione s.c., gli oligonucleotidi sono rapidamente assorbiti dal sito d'iniezione al torrente circolatorio, raggiungendo una Cmax plasmatica in 3-4 ore per le molecole di seconda generazione.

Buona biodisponibilità favorita dal legame con proteine plasmatiche che previene la loro filtrazione glomerulare e la escrezione nelle urine. I fosforotioati hanno maggiore stabilità plasmatica e biodisponibilità.

In generale, la distribuzione degli ASO è relativamente ampia e gli organi che raggiungono la più alta concentrazione sono il fegato e il rene, seguiti dal midollo osseo, adipociti e linfonodi.

Ne deriva una prima fase di diminuzione rapida dei livelli ematici che avviene in poche ore, seguita da una seconda fase dovuta all'eliminazione.

Per gli oligonucleotidi di prima generazione, l'azione delle nucleasi porta alla rapida degradazione in frammenti che per le limitate dimensioni perdono la capacità di legarsi alle proteine plasmatiche e sono eliminati rapidamente nelle urine.

Gli oligonucleotidi di seconda generazione, invece, sono resistenti all'azione delle nucleasi e sono quindi metabolizzati lentamente con emivita dell'ordine di 2-1 settimane, consentendo un dosaggio di una volta a settimana o anche meno frequenti.

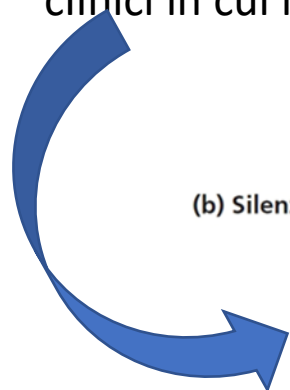
Tossicità degli ASO di I° e II° generazione è dovuta a: meccanismi ibridazione-dipendente o ibridazione-indipendente.

La prima comprende gli effetti avversi che si manifestano per l'interazione dell'ASO con l'RNA bersaglio, causando un eccessivo effetto farmacologico oppure con un RNA non specifico; per ridurre questo è importante caratterizzare accuratamente sia l'RNA bersaglio sia l'oligonucleotide. La tossicità indipendente dall'ibridazione è dovuta a: • interazione con proteine; • meccanismi pro-infiammatori; • accumulo a livello tissutale (fegato e reni).

Malattie neurodegenerative

L'oligomero **eteplirsen** (FDA nel 2016) per la terapia della distrofia muscolare di Duchenne (DMD), una malattia del tessuto muscolare che porta a morte i pazienti intorno ai 30 anni di vita. È una malattia a carattere ereditario correlato a mutazioni del gene della distrofina.

Eteplirsen è un PMO costituito da 28 nucleotidi e agisce con meccanismo di *exon-skipping*, è indicato per i pazienti portatori di una particolare mutazione genetica che causa la delezione degli esoni 49-50, con conseguente formazione di un segnale di stop sull'esone 51. Legandosi in modo specifico alla sequenza intronica dell'esone 51, **eteplirsen** esclude tale esone dal trascritto primario della distrofina, ma, dato che l'esone 52 è corretto, il trascritto finale origina una proteina trunca ma parzialmente funzionante. Gli studi sperimentali in modelli preclinici hanno mostrato buone sicurezza e tollerabilità anche alle dosi massime senza particolari effetti avversi, promuovendo così lo sviluppo di studi clinici in cui il farmaco è somministrato una volta alla settimana per infusione venosa di una dose pari a di 30 mg/kg.



(b) Silenziamento genico attraverso ingombro sterico

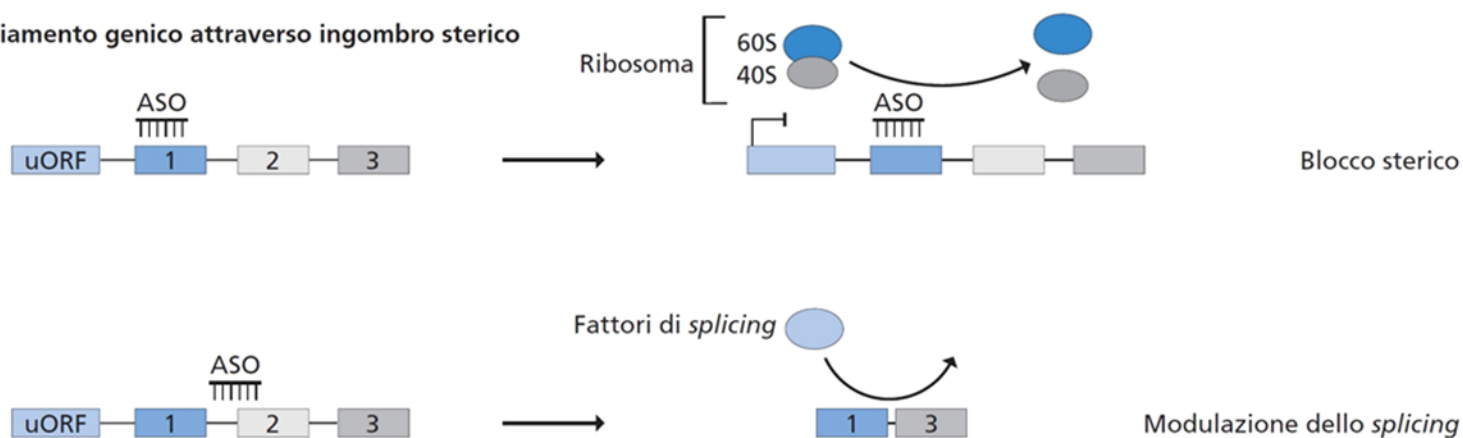
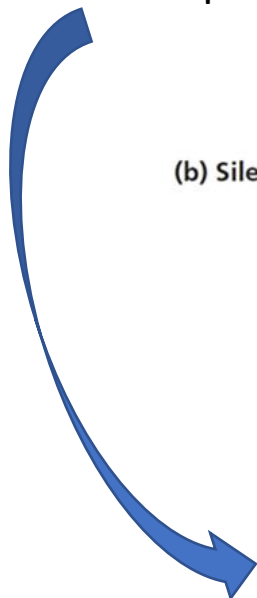


Figura 12.1 (a) Il legame ASO-mRNA genera un ibrido che funge da substrato per l'RNasi H (in alto). Il siRNA associato al complesso RISC attiva AGO2. L'attività di queste ribonucleasi porta al taglio dell'mRNA target (in basso). (b) Gli aODN inibiscono la traduzione di un mRNA (in alto) o lo splicing di un pre-mRNA (in basso) interagendo con le sequenze importanti per l'avvio di questi processi e inibendole mediante ingombro sterico.

Nusinersen - Un altro esempio d'impiego clinico di oligonucleotidi in ambito neurologico riguarda l'atrofia muscolare spinale (Spinal Muscular Atrophy, SMA), una malattia degenerativa dei motoneuroni dovuta a mutazioni del gene di sopravvivenza del motoneurone (SMN1) con conseguente perdita di funzione.

Nel genoma umano sono presenti due forme del gene per la proteina SMN: 1. SMN1, che genera un mRNA tradotto nella proteina SMN completamente funzionale; 2. **SMN2**, che differisce da SMN1 per un solo nucleotide nell'esone 7 che, tuttavia, **induce lo splicing di questo esone nel 90% dei trascritti di SMN2, dando origine a una proteina più corta che viene subito degradata**; lo splicing alternativo nel 10% dei trascritti del gene SMN2 causa l'inclusione dell'esone 7, dando origine a un mRNA funzionalmente identico a quello codificato da SMN1 e che produce una proteina completamente attiva.

Gli studi sui meccanismi di patogenesi hanno permesso di individuare **la sequenza esatta responsabile del silenziamento dell'esone 7, che è diventata il bersaglio dell'azione di nusinersen**, un ASO 2'-O-metossietilico (PMO), che tramite ingombro sterico impedisce lo splicing dell'esone 7.



(b) Silenziamento genico attraverso ingombro sterico

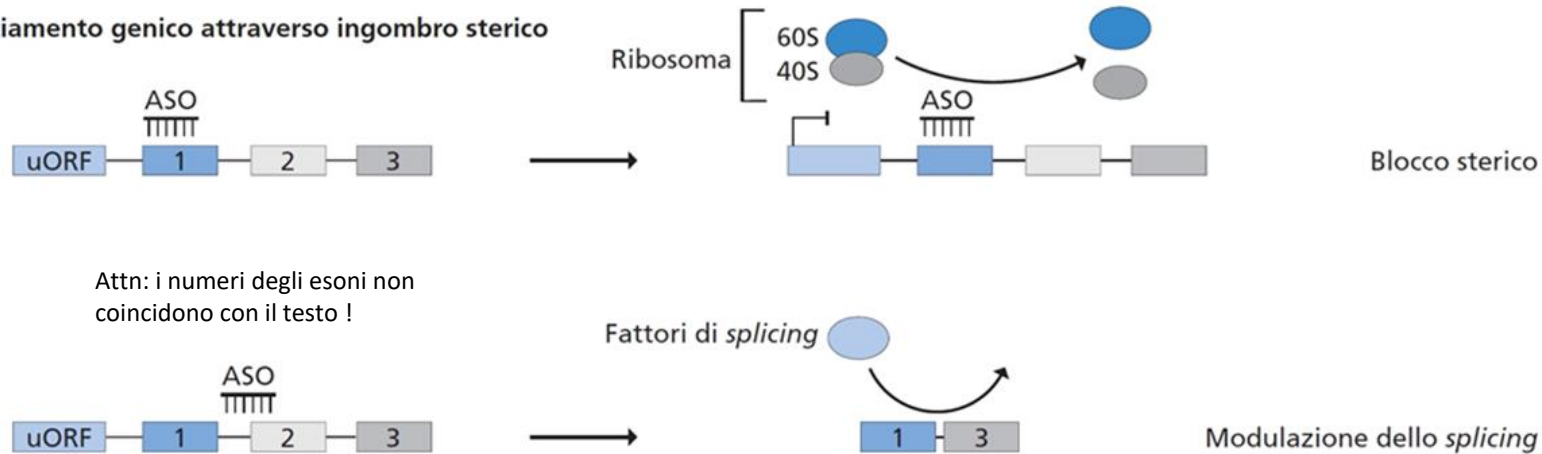


Figura 12.1 (a) Il legame ASO-mRNA

(in basso). (b) Gli aODN inibiscono la traduzione di un mRNA (in alto) o lo splicing di un pre-mRNA (in basso) interagendo con le sequenze importanti per l'avvio di questi processi e inibendole mediante ingombro sterico.

Ipercolesterolemia familiare

Il **mipomersen** è un ASO a DNA progettato per inibire la sintesi dell'apolipoproteina B, fattore chiave dell'aterosclerosi. La formazione dell'eteroduplex fra aODN e mRNA codificante apoB induce l'attività di RNasi H, riducendo la biosintesi di apoB.

E' stato approvato (FDA nel 2013) per l'ipercolesterolemia familiare in soggetti in cui la terapia standard non è sufficiente a ridurre i livelli di colesterolo e lipoproteine aterogene; è iniettato per via sottocutanea una volta alla settimana, in aggiunta alla terapia ipolipidemizzante e alla dieta.

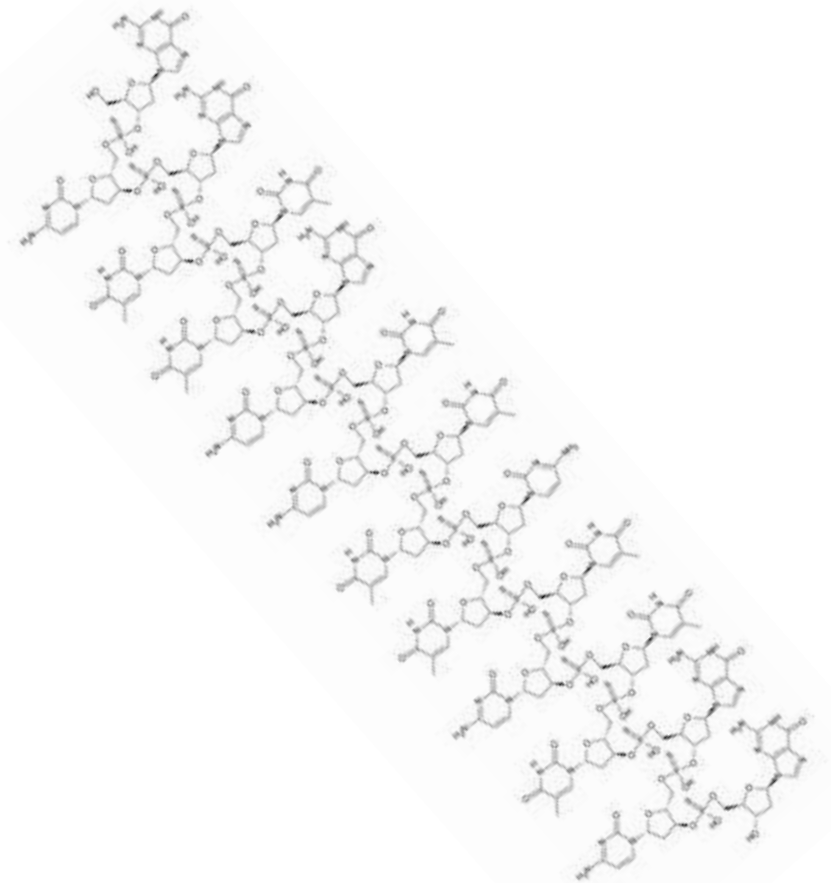
(a) Silenziamento genico attraverso l'attivazione di enzimi cellulari



Il **fomivirsen** è un ASO fosforotioato a DNA utilizzato nella **retinopatia dovuta all'infezione da citomegalovirus** in pazienti immunocompromessi. E' stato il primo fra gli oligonucleotidi a essere utilizzato per la terapia umana.

BERSAGLIO - Il meccanismo d'azione prevede il **legame con mRNA virali codificanti per proteine (chiamate Immediate Early Gene Region, IE2) ad attività sulla replicazione virale**. La somministrazione avviene una volta ogni due o più settimane per via intravitreale, che generalmente si associa a lenta distribuzione; metabolismo del farmaco con un'emivita di circa 55 ore.

Il **pegaptanib** è un aptamero a RNA approvato dalla FDA nel 2001 per il trattamento della degenerazione maculare legata all'età (Age-Related Macular Degeneration, AMD), in cui la formazione di vasi sanguigni anomali è responsabile delle emorragie e della distorsione progressiva della visione centrale. Un ruolo centrale nell'eziologia della malattia è svolto dal fattore di crescita dell'endotelio vascolare (**VEGF**). Sia la modificazione della struttura chimica tramite l'aggiunta di gruppi O-metili e fluoro sul C in posizione 2' sia il legame covalente all'estremità 5' terminale con polietilenglicole hanno migliorato la biodisponibilità di questo **aptamero ad azione inibitoria sul VEGF**. Viene somministrato per iniezione intravitreale una volta ogni 6 settimane alla dose di 0,3 mg disciolti in volumi molto piccoli.



OLIGONUCLEOTIDI come AGENTI TERAPEUTICI

blocco specifico della sintesi di proteine

Meccanismo d'azione: gli oligodeossinucleotidi possono interrompere la sequenza di trascrizione ed espressione di un gene a diversi livelli:

1. Appaiandosi alla doppia elica di DNA ne modificano la conformazione spaziale, impedendo la formazione del complesso di inizio della trascrizione genica (blocco totale della sintesi) (TRIPLEX)
2. Appaiandosi al trascritto primario impediscono il processamento a RNA (O.A.)
3. Appaiandosi all'RNA citoplasmatico bloccano la traduzione in proteina (O.A.)
4. Appaiandosi all'RNA ne favoriscono la degradazione ad opera di enzimi (RNAsi) (O.A.)
5. Legando altri acidi nucleici che riconoscono proteine specifiche (APTAMERI)
6. Svolgendo funzioni enzimatiche (RIBOZIMI) hanno attività catalitica e scindono il legame fosfodiesterico

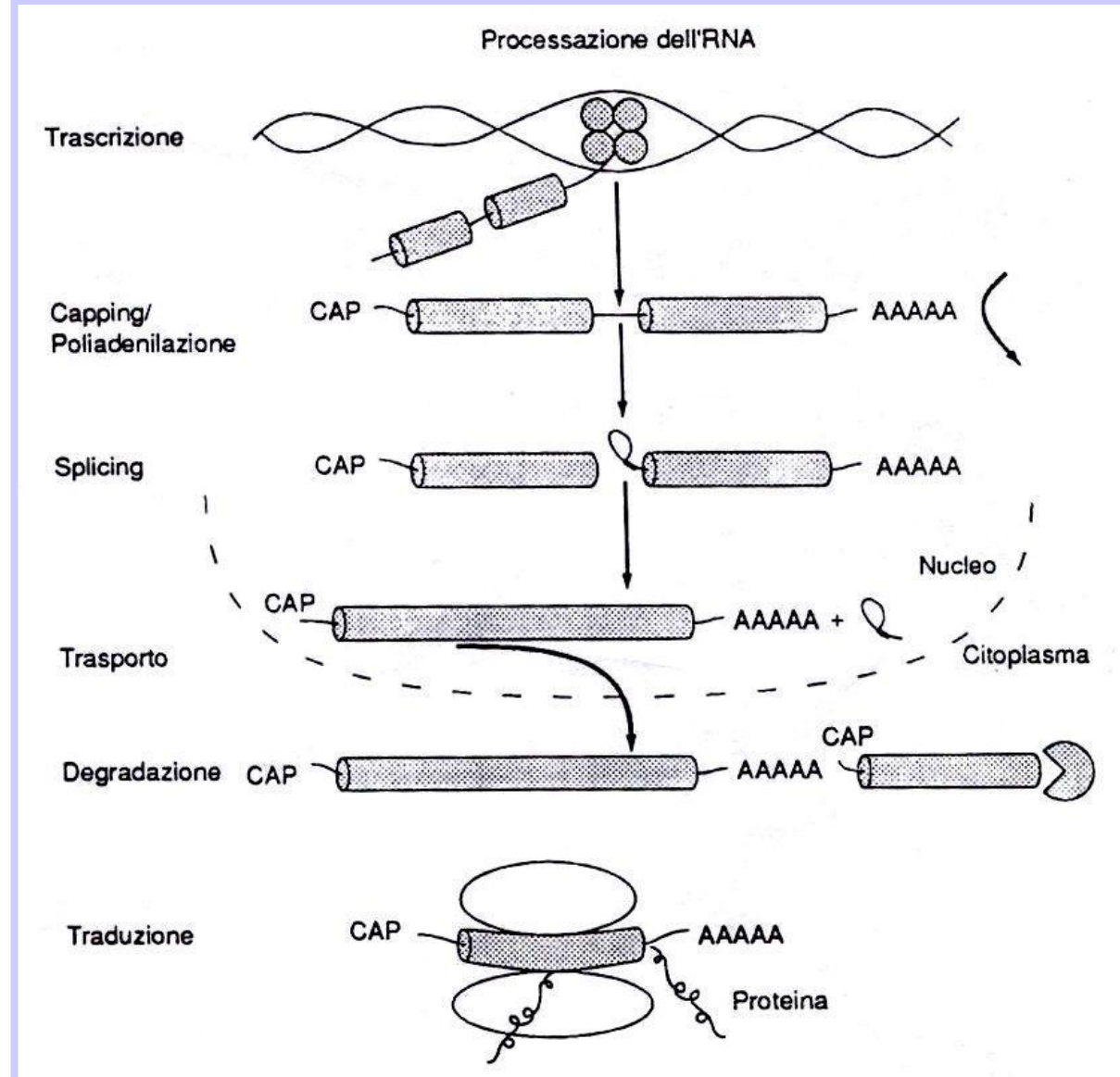
O.A esistono in natura e regolano l'espressione genica

Triplex lavorano solo ad altissime concentrazioni

Aptameri sono sintetici, possono essere inseriti in un vettore, legano proteine che possono essere fattori di trascrizione (una volta individuata la sequenza interessata si può amplificare e riprodotta come bloccante la trascrizione)

OLIGONUCLEOTIDI come AGENTI TERAPEUTICI

Processazione di RNA in eucariota

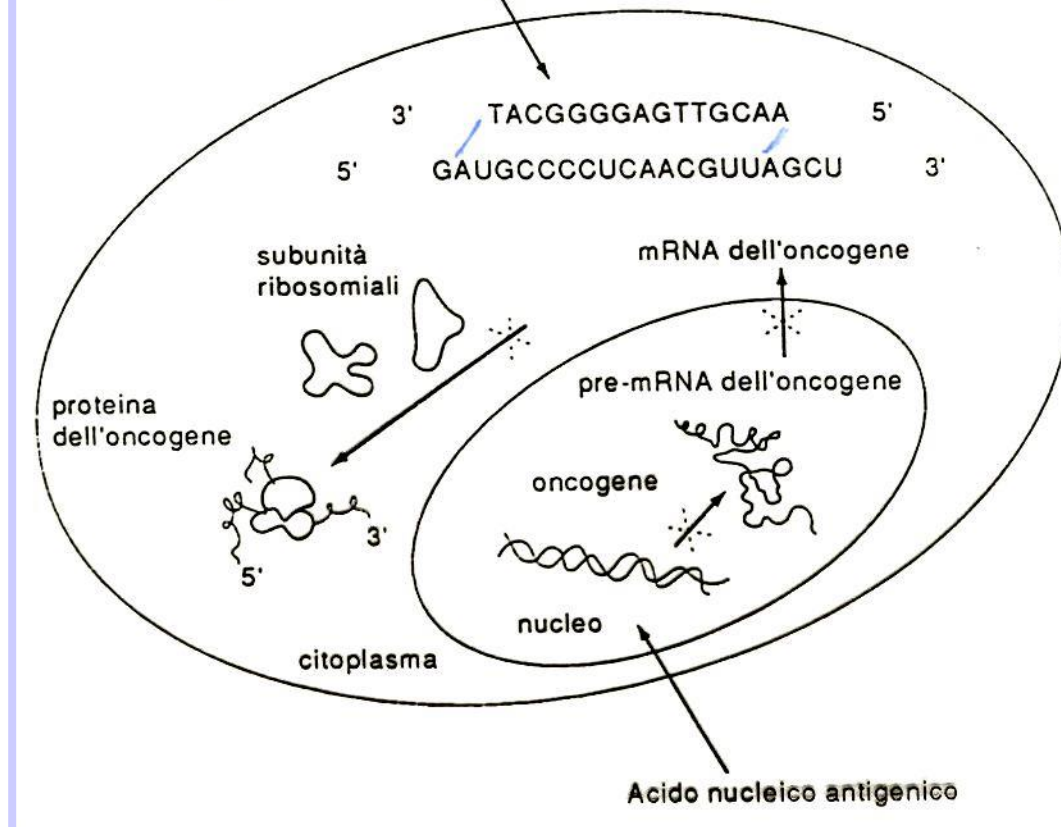


OLIGONUCLEOTIDI come AGENTI TERAPEUTICI

Meccanismo d'azione di oligonucleotidi antisense

Acido nucleico antisense

3' TACGGGGAGTTGCAA 5'



APPLICAZIONI TERAPEUTICHE

cura di tumori solidi

leucemie

infezioni virali, batteriche e parassitarie

malattie autoimmuni

In alcuni tipi di tumore la proliferazione cellulare incontrollata sembra sia legata alla produzione di proteine specifiche codificate da oncogeni.

L'uso di OA potrebbe ridurre la sintesi di tali proteine.

Conclusioni: OA non modificati possono essere attivi in colture cellulari, malgrado la presenza di nucleasi

- 1) OA fosforotioati e metilfosfonati sono quelli modificati più attivi
- 2) OA sono attivi nei confronti di oncogeni, agenti virali, fattori di crescita, recettori
- 3) mancano le prove degli effettivi meccanismi d'azione

Uso Farmacologico degli oligodeossinucleotidi antisenso
(aODN) sintetici

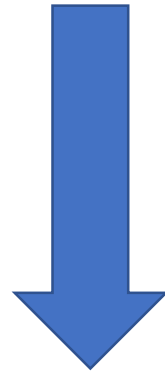
APPLICAZIONI TERAPEUTICHE

Metabolismo: vita media 10-20 minuti (si può ↑ con
coniugazione con colesterolo), bassa tossicità

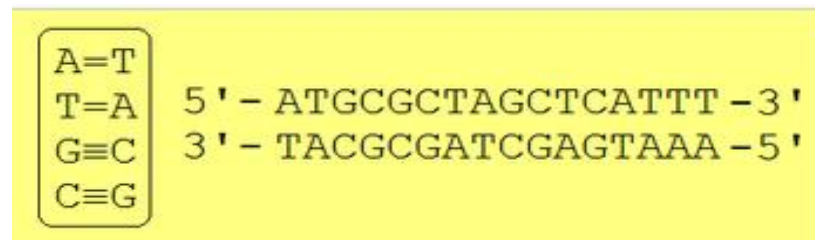
Eliminazione: escrezione

Via di somministrazione: EV, IP, SC, IM, transdermica,
nasale

Per oligonucleotide antisenso si intende un breve frammento di DNA, che contiene la sequenza nucleotidica complementare del filamento di DNA codificante (senso) o di RNA messaggero (mRNA).



Es. sequenza di DNA



Perciò l'antisenso, grazie a questa sua "specularità" si appaia al DNA o all'mRNA, annullandone l'attività biologica.

→ Gli oligonucleotidi di impiego in terapia sono sintetici, ma nelle cellule sono stati individuati anche oligonucleotidi endogeni, di cui è ignota la funzione

GLI OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSENTO (aODN)

mRNA



A G U A G C U A G C U A G

...
A T C G A T C

aODN



L'aODN si lega in modo specifico alla sequenza complementare dell'mRNA. Il tratto di catena ibrida che così si forma determina per via enzimatica o per impedimento sterico l'inattivazione dell'intero messaggero

Meccanismo d'azione → gli ODN possono interrompere la sequenza di trascrizione ed espressione di un gene/o proteina a diversi livelli

- 1. Appaiandosi alla doppia elica di DNA ne modificano la conformazione spaziale, impedendo la formazione del complesso di inizio della trascrizione genica (blocco totale della sintesi) (TRIPLEX)**
- 2. Appaiandosi al trascritto primario impediscono il *processing* dell'RNA**
- 3. Appaiandosi all'RNA citoplasmatico bloccano la traduzione in proteina**
- 4. Appaiandosi all'RNA ne favoriscono la degradazione ad opera di enzimi (RNAsi)**
- 5. APTAMERI = sono brevi seq. di acidi nucleici che riconoscono proteine specifiche, che tramite tecnica SELEX vengono amplificati**
- 6. RIBOZIMI = sono seq. di RNA con funzioni enzimatiche che svolgono attività catalitica (es. scindono il legame fosfodiesterico di un mRNA)**

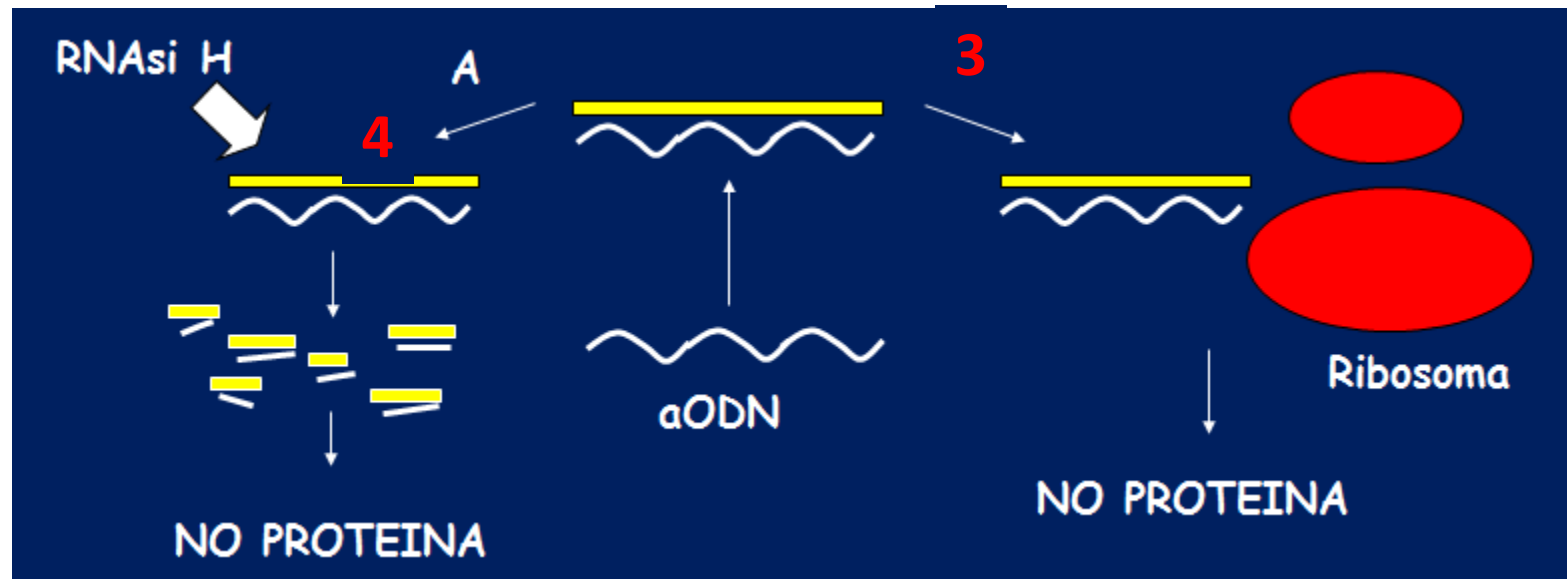
Tra i meccanismi principali d'azione degli aODN

3- IMPEDIMENTO STERICO:

La catena di RNA-DNA impedisce la traduzione sui ribosomi, impedendo la sintesi della proteina

4- ATTIVAZIONE DA PARTE DELLA RNAsi H:

Degrada la componente di RNA delle catene ibride DNA-RNA



APPLICAZIONI TERAPEUTICHE

1. CONTROLLO DELLA CRESCITA NEOPLASTICA

1^ GENERAZIONE: aODN contro mRNA importanti nel ciclo mitotico

FOSFOROTIOATI: Sono analoghi degli aODN naturali

VANTAGGI: stabili alle nucleasi, facile sintesi e attivazione dell'RNAsi H

SVANTAGGI: poco assorbiti e modesta tossicità

METILFOSFONATI:

VANTAGGI: - minore solubilità quindi maggiore concentrazione intracellulare

SVANTAGGI: - non attivano l'RNAsi H

2^ GENERAZIONE: aODN contro le traslocazioni cromosomiche di linfomi e leucemie

2. TERAPIA ANTIVIRALE

HIV: blocco delle proteine essenziali per il ciclo riproduttivo
(TAT,REF)

Herpes Simplex: impiego clinico per cheratite erpetica
Virus influenzali

3. CARDIOLOGIA

- **Ipertensione:** aODN contro geni che sintetizzano per molecole vasoattive (renina-angiotensina, recettore adrenergico, endotelina e neuropeptide Y, callicreina, peptide natriuretico atriale, NO, calcitonina)
- **Ischemia miocardica**
- **Nel controllo della proliferazione endotelio-intima muscolare delle arterie coronariche dopo stress meccanico (azione sull'm-RNA che codifica per il PDGF)**

PROBLEMATICHE RIGUARDANTI GLI ANTISENSO IN TERAPIA

1. Scarsa riproducibilità negli esperimenti in colture cellulari
2. Variabilità del grado di purezza delle diverse preparazioni
3. Uptake cellulare ancora poco definito
4. Costo elevato
5. Risposta immunitaria indesiderata

→ **GLI ACIDI NUCLEICI** possono essere target farmacologici

A- BERSAGLIO MOLECOLARE PIU' DEFINITO

Numero di proteine intracellulari: 1000-100000

Numero di RNA: 100-10000

Numero di geni: 1-2

B- SINTESI MIRATA

Bersagli possono essere sequenze anche uniche nel genoma

C- AZIONE MOLTO SPECIFICA

Utilizzando interazioni con altri nucleotidi si possono sfruttare i vantaggi della complementarità tra due catene secondo il modello di Watson e Crick