OLIGONUCLEOTIDI, UNA RETE PER MIGLIORARE IL DELIVERY DI FARMACI

Le strategie terapeutiche che si basano su brevi sequenze di nucleotidi (Rna o Dna), negli ultimi tempi, si sono rivelate efficaci nel trattare malattie geniche, come la distrofia muscolare di Duchenne o l'atrofia muscolare spinale (Sma). Il problema resta però la via di somministrazione

Cristina Tognaccini
AboutPharma and Medical Devices
ctognaccini@aboutpharma.com

Nel 2016, secondo una review pubblicata su Embo Molecular Medicine, erano già state autorizzate all'emissione in commercio quattro terapie a base di oligonucleotidi antisenso (detti anche Aso dall'inglese, AntiSense Oligonucleotides) e oltre centro trial erano in corso per testarne la validità. I siRNA (short interfering Rna o Rna interferente breve), gli oligonucleotidi antisenso e in generale tutte le strategie che si basano su brevi sequenze (tipicamente con venti o meno) di nucleotidi (Rna o Dna) in grado di interferire con la sintesi delle proteine, negli ultimi tempi si sono rivelate efficaci nel trattare malattie geniche, come la distrofia muscolare di Duchenne o l'atrofia muscolare spinale (Sma) per citarne alcune, subendo una forte accelerata nella ricerca. Anche perché si tratta di una piattaforma facilmente replicabile per altre malattie. Come dice lo stesso titolo della revisione di Embo però (Delivery is key: lessons learnt from developing splice-switching antisense therapies), il vero cruccio al momento è il delivery. Tanto che come racconta Michela Alessandra Denti, professoressa associata al dipartimento di biologia cellulare computazionale e integrta (Cibio) dell'Università degli studi di Trento, l'Europa tramite la European cooperation in science and technology (Cost), ha stanziato fondi per creare reti di esperti, denominate Cost Actions, che si incontrano e collaborano su argomenti specifici, come il delivery delle piccole molecole di acidi nucleici.

Denti racconta di aver partecipato – insieme a Elisa Giorgio, ricercatrice presso il Dipartimento di scienze mediche dell'Università degli studi di Torino, rappresentanti italiane nominate dal ministero della Salute – a una precedente Cost action impegnata a esportare anche ad altre patologie, la strategia di exon-skipping (salto dell'esone) che aveva dato buoni risultati per la distrofia muscolare di Duchenne. "Quella Cost action, che ha coinvolto i maggiori esperti di oligonucleotidi antisenso è

© 2019 Health Publishing & Services S.r.l. – Tutti i diritti riservati

terminata – commenta la ricercatrice – ma abbiamo fatto domanda per aprirne una nuova, ottenendola, sul delivery, perché avevamo capito che si trattava del problema principale. Ne fanno parte esperti di vari settori, alcuni per esempio si occupano di nanoparticelle, altri lavorano nelle aziende, perché questo tipo di ricerca è molto più avanti nell'industria, ma spesso è difficile ottenere informazioni, mentre durante questi piccoli incontri si riesce a parlare meglio. L'obiettivo è condividere conoscenze, esperienze ed errori per trovare soluzioni migliori ed efficaci".

L'EXONE SKIPPING

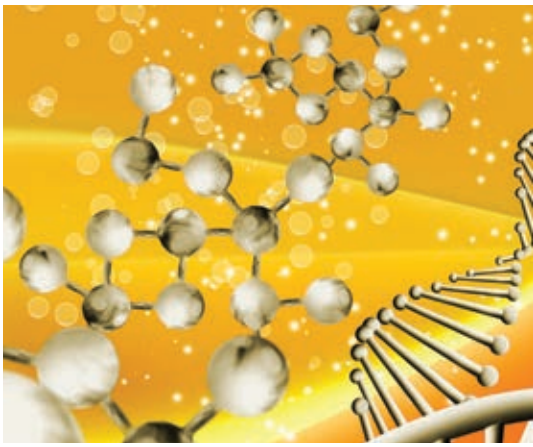
Gli oligonucleotidi, si tratti di siRna o oligonucleotidi antisenso, possono correggere i difetti genetici alla base di alcune malattie, sfruttando strategie diverse. I siRna per esempio, possono indurre la degradazione dell'Rna messaggero (mRna) fondamentale per la sintesi delle proteine, bloccando l'espressione del gene che è mutato. Così come gli Aso, che possono portare a degradazione del Rna messaggero ma con un meccanismo differente. Proprio quest'ultimo approccio si sta utilizzando anche per la Corea di Huntington, in cui è necessario eliminare un trascritto che si accumula nel nucleo. In altri casi come per la distrofia muscolare di Duchenne e per la Sma (per cui si stanno testando terapie già in fase clinica) si modifica lo splicing (montaggio) del pre-Rna messaggero, che è una copia esatta del Dna e che subisce un processo di splicing nel nucleo, per essere "ridotto" a Rna messaggero. Poiché il Dna contiene un difetto, i ricercatori riescono, tramite rimaneggiamento dello splicing nel nucleo, a correggerlo. Nel caso della distrofia muscolare di Duchenne il gene difettoso è quello della distrofina, la cui trasduzione viene interrotta prematuramente portando a una proteina più piccola e non funzionante correttamente. Gli oligonucleotidi legano il pre mRna quando ancora deve subire il processamento nel nucleo, quindi lo splicing, e facendo saltare un esone durante questa fase (l'exone skipping), aggiustano la sintesi della distrofina. "Dal punto di vista del delivery – commenta Denti – l'obiettivo qui è veicolare i piccoli acidi nucleici, dentro al nucleo delle cellule muscolari. Il che comporta un ulteriore problema. Per altre malattie, come la Sma, va curato il neurone ed è ancora più complicato farvi arrivare gli oligonucleotidi, perché devono superare la Barriera emato-encefalica".

PASSARE DAL MIDOLLO SPINALE

La strategia usata per la Sma è leggermente differente, perché durante lo splicing viene fatto un exone inclusion al posto dello skipping (lavorando sul gene SMN2, simile ma non identico al gene SMN1, il cui difetto causa la malattia) trovano il modo per ingannare l'Rna premessagero, "convincendolo" a includere un esone che normalmente non inserirebbe. "Si può fare perché ormai consociamo il processo di splicing a sufficienza per guidarlo" spiega Denti. "È stato fatto ed è molto efficace ma il problema è la somministrazione, perché per arrivare al moto neurone bisogna passare dal midollo spinale, per cui vanno fatte iniezioni intratecali, nella colonna vertebrale, ogni 15 giorni. È una grossa spesa sia perché bisogna dare gli oligonucleotidi ripetutamente, sia perché il trattamento deve essere eseguito da un medico specializzato e soprattutto è invasivo per il paziente".

IL VANTAGGIO DELLA REVERSIBILITÀ

Stessa situazione, se non peggio per la Corea di Huntington, per cui bisogna intervenire in tempi precoci e nella corteccia celebrale. Motivo per cui si è pensato, come prima fase della terapia di provare con iniezioni intraventricolari. Al momento sono diverse dunque le prove che queste terapie siano efficaci, ma quello che manca secondo



molti esperti è un modo meno invasivo di somministrarle. Anche perché non trattandosi di terapie geniche, che correggono per sempre il difetto, devono essere somministrati ripetutamente, come se fossero un classico farmaco. Il che da un certo punto di vista può essere anche un bene, come ricorda Denti, perché in caso di effetti indesiderati si può interrompere la cura. "Una tendenza ormai chiara – aggiunge – è che gli enti regolatori mostrano una certa difficoltà nell'autorizzare una terapia genica, perché se qualcosa va storto non si può tornare indietro".

OLIGONUCLEOTIDI "NUDI"

Gli oligonucleotidi – già in commercio o in fase di sperimentazione – vengono somministrati per via intratecale, intraventricolare e generalmente intravena. Sono iniettati "nudi" senza particolari rivestimenti, anche perché si pensa che una volta in circolo siano inglobati dalle lipoproteine. Attualmente sono in corso studio su alcuni coniugati con molecole di Peg (glicole polietilenico), un polimero, e sulle nanoparticelle, ma sono ancora lontane da un'applicazione in clinica, perché ci sono pochi studi sulla tossicologia. "Per l'esigenza di dimostrare un'efficacia in breve tempo, anche e soprattutto per rispondere a un bisogno dei pazienti, si è preferito andare sul semplice per evitare complicazioni" commenta la ricercatrice trentina.

© 2019 Health Publishing & Services S.r.l. – Tutti i diritti riservati

IL NOSE-TO-BRAIN

La via più usata, anche perché meno invasiva, è la intravenosa, che comporta però un duplice problema. Da una parte infatti è la via più lunga se il farmaco deve raggiungere particolari siti, come il cervello, anche e soprattutto a causa delle diverse barriere che il nostro organismo ha sviluppato per motivi di difesa. E non si parla solo della barriera emato-encefalica, che è la più nota, ma anche di altre, come quella endoteliare che si trova nel muscolo. Così al momento i ricercatori sono impegnati a trovare un modo per superarle. Sia studiando particolari vettori come la nanoparticelle o i polimeri appunto, che opportunamente modificati possono consegnare il farmaco, sia cercando altre vie, come l'intranasale. D'altra parte il triste esempio di alcune droghe di abuso, conferma che il nose-to-brain è uno dei percorsi più rapidi per veicolare una molecola al cervello, perché ci si avvicina al bersaglio e si è già oltre la barriera emato-encefalica. "Una volta superato l'epitelio olfattivo – afferma Denti – le molecole devono comunque passare da una cellula all'altra per arrivare ai neuroni cerebrali. Per cui il salto c'è lo stesso, ma è sicuramente più corto rispetto alla somministrazione in vena".

ALTRE VIE

Un altro organo di particolare interesse – soprattutto per le aziende – è l'occhio, che ha anche il vantaggio di essere relativamente isolato dal sistema immunitario. L'esperta spiega che ci sono vari studi che hanno testato la somministrazione per esempio sotto la retina o intravitreale: "Ci sono farmaci già in commercio per la degenerazione maculare e ci sono stati tanti tentativi anche con gli siRna. Se n'è occupata soprattutto Alnylam, che sta puntando molto su malattie di occhio e fegato, non a caso, ma perché sono più facilmente raggiungibile. Infine ci sono studi per malattie rare della pelle, come la epidermolisi bollosa, per cui si stanno provando strategie di skipping esonico, ma con iniezioni direttamente del derma".

UNO SCUDO PER FEGATO E RENI

Il vantaggio delle somministrazioni in loco, è anche e soprattutto la riduzione della dose e la delimitazione di eventuali organi colpiti. Tornando ai limiti della via endovenosa infatti, il secondo è che per fare arrivare il farmaco a destinazione– soprattutto in caso di target difficili da raggiungere come il cervello – spesso è necessario aumentare la dose, con la conseguenza che la maggior parte del prodotto va a finire nel fegato e nei reni, filtri naturali del sangue. "I trial condotti per testare il farmaco per la distrofia muscolare di Duchenne – racconta Denti – ne hanno dimostrato l'efficacia, ma anche che la maggior parte di quello che si inietta si accumula nel fegato, e in seconda battuta in alcuni tipi di cellule renali. Il grosso problema, oltre a farli arrivare nel posto giusto, è anche evitare che si accumulino in altre sedi causando effetti indesiderati. Anche con la somministrazione nel liquido cefalo rachidiano, il medicinale passa la barriera emato-encefalica al contrario (anche se la maggior parte resta confinata nel cervello) e si ritrova nel sangue. Per cui può comunque andare a finire nel fegato o in altri organi e bisognerà capire se comporta effetti negativi o meno. Il problema è che non è stato ancora ideata nessuna strategia che faccia in modo che gli oligonucleotidi siano 'rimbalzati' da fegato e dai reni".

LA DUPLICE FUNZIONE

La soluzione ideale sarebbe trovare un sistema con una duplice funzione, che possa veicolare gli oligonucleotidi dove devono esplicare l'effetto terapeutico e allo stesso tempo impedisca loro di accumularsi in altri organi dove non devono andare. Denti spiega che si stanno provando diverse strategie, ma per lo più focalizzate sul targeting specifico su un tessuto, mentre non c'è praticamente niente che depotenzi l'accumulo nel fegato e nei reni. "Vi è una tossicità legata alla dose – conferma – perché quando vengono fatti i trial e si decidono le quantità di oligonucleotidi da iniettare si deve considerare che l'80% sarà non efficace. Le dosi stabilite oggi, sono notevoli e potrebbero dare effetti non desiderati. Per prima cosa si è cercato di capire se queste terapie fossero efficaci, solo ora si stanno affrontando i limiti della somministrazione e del drug delivery. D'altra parte, si tratta pur sempre di terapie che oggi fanno la differenza tra la vita e la morte ed era importante che fossero disponibili il prima possibile".

Parole chiave
Malattie genetiche, Oligonucleotidi antisenso, rna interference, drug delivery
Aziende/Istituzioni
Cibio, Università di Trento, Alnylam, European cooperation in science and technology (Cost), Università degli Studi di Torino,

© 2019 Health Publishing & Services S.r.l. – Tutti i diritti riservati