

RNA KOT TERAPEVTSKA TARČA: PRILOŽNOSTI IN OMEJITVE V SODOBNI MEDICINI

RNA AS A THERAPEUTIC TARGET: OPPORTUNITIES AND LIMITATIONS IN MODERN MEDICINE

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Petra Seliškar, mag. farm.

izr. prof. dr. Martina Hrast Rambaher, mag. farm.

izr. prof. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: petra.seliskar@ffa.uni-lj.si



POVZETEK

RNA je ključna biomolekula, ki poleg prenosa genetskih informacij uravnava celične procese in je pomembna terapevtska tarča. Njene regulatorne sposobnosti vključujejo utišanje genov ter usmerjanje epigenetskih modifikacij, kar omogoča razvoj zdravil, kot so protismiselni oligonukleotidi, male interferenčne RNA in aptameri. Protismiselni oligonukleotidi in male interferenčne RNA utišajo informacijsko RNA z vezavo na komplementarna zaporedja, medtem ko aptameri zavirajo interakcije med proteini. Kemijske modifikacije povečujejo stabilnost teh učinkovin. Določanje struktur RNA z metodami, kot so jedrska magnetna resonanca, krioelektronska mikroskopija in sekvenciranje, je ključno za razvoj terapij. Izzivi pri razvoju terapij RNA vključujejo dinamično naravo RNA, omejeno kemijsko raznolikost ter težave pri selektivnem ciljanju.

KLJUČNE BESEDE:

aptameri, male molekule, RNA, siRNA, terapevtski oligonukleotidi

ABSTRACT

RNA is a vital biomolecule that regulates cellular processes and therefore serves as a key therapeutic target. Its regulatory abilities include gene silencing and guiding epigenetic modifications, enabling the development of drugs like antisense oligonucleotides, small interference RNAs, and aptamers. Antisense oligonucleotides and small interference RNAs silence mRNA by binding to complementary sequences, while aptamers inhibit protein-protein interactions. Chemical modifications enhance the stability of these agents. Determining RNA structures using techniques such as nuclear magnetic resonance, cryogenic electron microscopy and sequencing is crucial for therapy development. Challenges in developing RNA-based therapies include RNA's dynamic nature, limited chemical diversity, and difficulties in selective targeting.

KEY WORDS:

aptamers, RNA, siRNA, small molecules, therapeutic oligonucleotides

1 UVOD

Ribonukleinska kislina, bolj znana kot RNA, je temeljna biomolekula, sestavljena iz nukleotidnih gradnikov. Deluje kot prenašalec genetskih informacij in funkcionalni regulator v celičnih procesih. Strukturno je sestavljena iz riboznega sladkornega ogrodja, fosfatnih skupin in štirih dušikovih baz: adenina, gvanina, citozina in uracila (slika 1A in 1B). Prisotnost uracila namesto timina in sladkorja riboze namesto deoksiriboze loči RNA od deoksiribonukleinske kisline (DNA). Ta edinstvena kemijska sestava omogoča RNA, da se zvije v tridimenzionalne strukture, kar omogoča interakcije s proteini, DNA in drugimi molekulami RNA, kar je ključnega pomena za njene številne funkcije v bioloških procesih (1, 2).

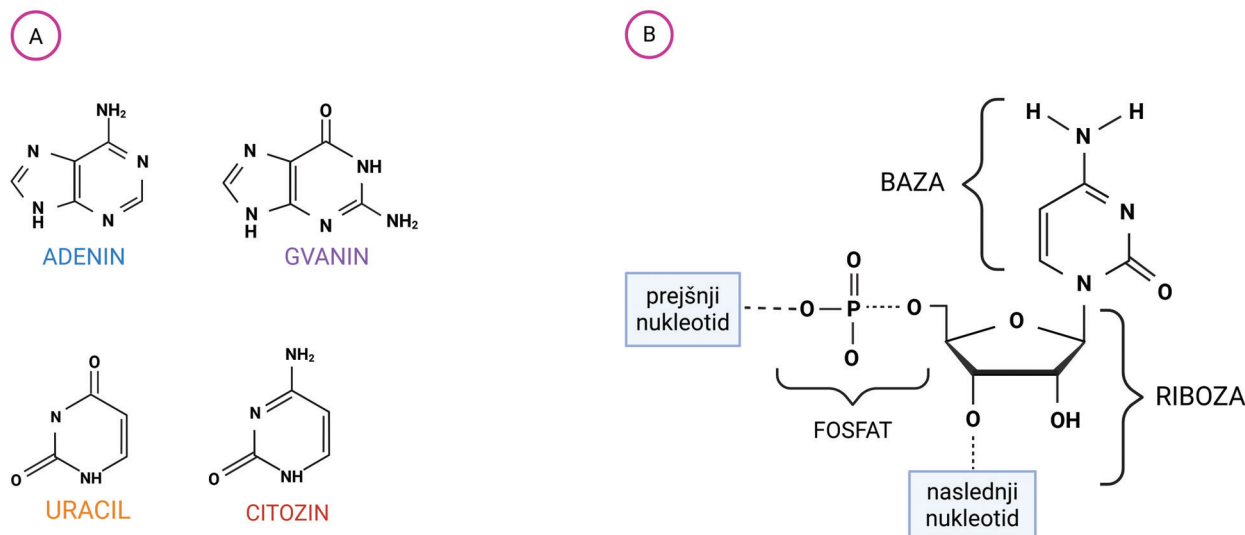
Obstaja več glavnih vrst RNA, vsaka s svojimi značilnimi funkcijami. Informacijska RNA (mRNA) prenaša genetske informacije iz DNA do ribosomov za sintezo proteinov, prenašalna RNA (tRNA) prinaša aminokisline do ribosomov med sintezo proteinov, ribosomska RNA (rRNA) tvori del strukture ribosomov in katalizira tvorbo peptidnih vezi ter nekodirajoče RNA (1). Slednje vključujejo regulatorne RNA, kot so mikroRNA (miRNA) in dolge nekodirajoče RNA

(lncRNA), ki uravnavajo izražanje genov preko interakcije z mRNA, kromatinom ali proteini (1).

2 FUNKCIJE RNA

RNA ima poleg svojih osnovnih funkcij tudi izjemno prilagodljivost. Nekatere molekule RNA, imenovane ribocimi, imajo katalitične lastnosti, kar pomeni, da lahko pospešujejo biokemične reakcije, kot je izrezovanje RNA (angl. *RNA splicing*). Poleg tega RNA tvori tudi genetski material pri različnih virusih, vključno s SARS-CoV-2 in virusom gripe, ki za razmnoževanje in okužbo uporabljajo izključno RNA (3, 4).

Pomembne so tudi regulatorne sposobnosti RNA. Z interakcijami baznih parov med seboj ali z drugimi nukleinskimi kisljinami lahko molekule RNA uravnavajo izražanje genov. Ta lastnost je osnova za mehanizme, kot sta RNA-interferenca (utišanje genov s pomočjo malih interferenčnih RNA, siRNA) in epigenetske modifikacije, ki jih usmerjajo lncRNA. Ta raznolikost funkcij kaže na ključno vlogo RNA v celičnih procesih in poudarja njen pomen kot terapevtsko tarčo za razvoj novih zdravil (5).



Slika 1: (A) Štiri nukleinske baze, ki jih najdemo v RNA. (B) Primer posameznega nukleotida znotraj verige RNA. Povzeto po (1). Slika je bila ustvarjena s programom Biorender.

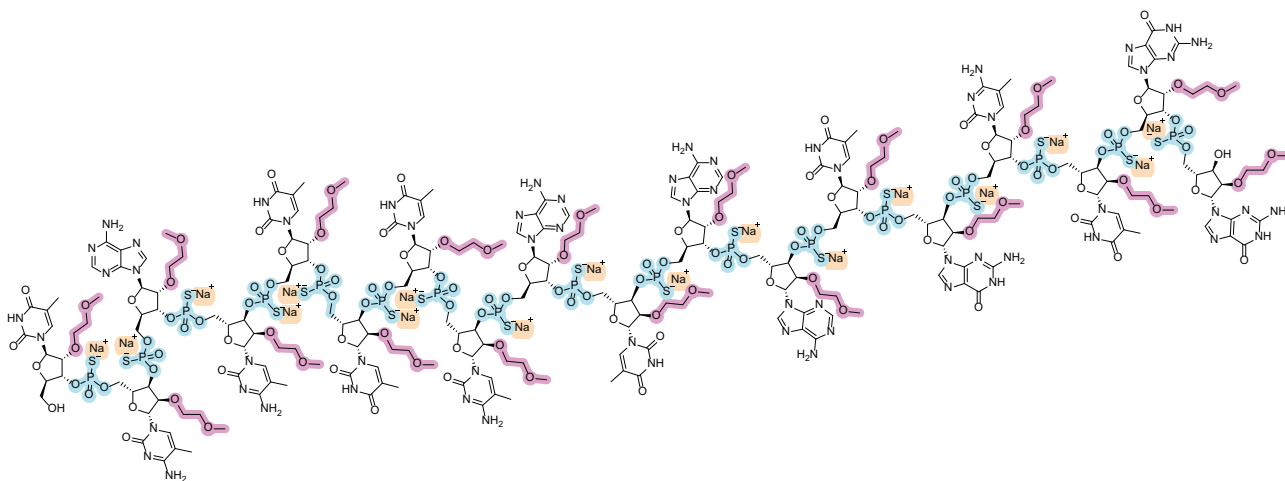
Figure 1: (A) The four nucleic bases found in RNA molecules. (B) Example of a single RNA nucleotide within an RNA chain. Adapted from (1). Created in Biorender.



3 MEHANIZMI DELOVANJA UČINKOVIN NA RNA

Približno 75 % človeškega genoma, ki se prepiše v RNA, predstavlja ogromno področje potencialnih tarč, predvsem zaradi funkcionalne raznolikosti RNA. Medtem ko se le 1,5 % genoma prevede v proteine, molekule RNA opravljajo številne druge vloge, ki jih je mogoče izkoristiti za razvoj terapevtskih spojin (6, 7). RNA lahko moduliramo kot terapevtsko tarčo z različnimi strategijami, ki izkoriščajo njene strukturne in funkcionalne vloge v mehanizmi razvoja bolezni. Trenutno odobreni terapevtski oligonukleotidi na trgu so razdeljeni v tri razrede z različnimi mehanizmi delovanja: protismiselni oligonukleotidi (ASO), siRNA in aptameri. Poleg oligonukleotidov so na trgu in v kliničnem razvoju tudi male molekule, ki delujejo na RNA in modulirajo njeno funkcijo. Med zdravitelnimi učinkovinami, ki sta jih odobrila Ameriški vladni urad za zdravila in prehrano (FDA) in Evropska agencija za zdravila (EMA), sta tudi nu-

sinersen (slika 2) za zdravljenje spinalne mišične atrofije in patisiran za zdravljenje dedne transtiretinske amiloidoze. Prvi sodi med ASO in se veže na nezrelo mRNA, ki zapisuje mutirani protein za preživetje motoričnih nevronov (SMN2), s tem uravnava njeno izrezovanje in omogoča povečano prevajanje celotnega proteina. Patisiran na drugi strani sodi med siRNA ter z vezavo na mutirano mRNA divjega tipa za transtiretin sproži razpad te mRNA ter tako zmanjša kopičenje transtiretina in s tem zadrževanje amiloidnih delcev v tkivih in organih. Nasploh so ASO kratke, kemijsko spremenjene verige nukleotidov, ki jih oblikujemo tako, da se vežejo na tarčno mRNA. Delujejo na tri glavne načine. Prvi je preko razgradnje mRNA. Če se ASO veže na tarčno mRNA, lahko aktivira encim RNaza H, ki razgradi mRNA in tako prekine sintezo beljakovine. Naslednji način je preskakovanje eksonov. Z vezavo na pre-RNA namreč lahko ASO spremenijo njeno procesiranje, kar povzroči izključitev določenih eksonov in spremeni končno obliko mRNA; to je še posebej uporabno pri zdravljenju genetskih bolezni, ki so posledica mutacij v eksonih. Zadnji način delovanja je s sterično blokado. S fizičnim zaviranjem določenih



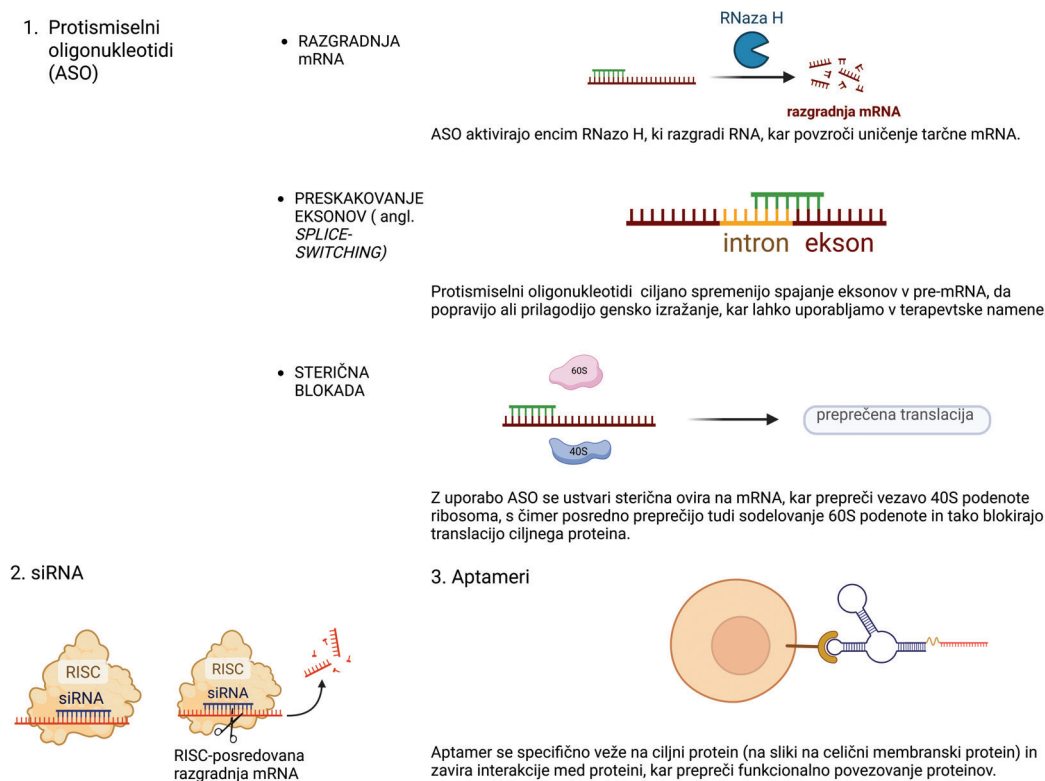
Slika 2: Struktura nusinersena v obliki soli. Protiion Na^+ je obarvan oranžno. Molekula vsebuje 2'-O-metoksietilne modifikacije na 2' položaju riboznega obroča (obarvan roza), ki povečujejo termodinamsko stabilnost vezave na ciljno RNA in zmanjšujejo občutljivost na nukleazno razgradnjo. Fosfatna hrbtenica molekule vsebuje fosforotioatne vezi (obarvano modro) namesto fosfodiesterških, kar podaljša razpolovno dobo zdravila in izboljša njegovo distribucijo v centralnem živčnem sistemu. Zaradi teh modifikacij je nusinersen bolj stabilen in učinkovitejši kot drugi protismiselni oligonukleotidi brez teh sprememb. Povzeto po (10, 11).

Figure 2: Structure of nusinersen in salt form. Counterion Na^+ is coloured orange. The molecule contains 2'-O-methoxyethyl modifications at the 2' position of the ribose ring (pink colour), which enhance the thermodynamic stability of binding to the target RNA and reduce susceptibility to nuclease degradation. The phosphate backbone of the molecule incorporates phosphorothioate bonds (blue colour) instead of phosphodiester bonds, extending the drug's half-life and improving its distribution in the central nervous system. Due to these modifications, nusinersen is more stable and effective compared to other antisense oligonucleotides lacking these features. Adapted from (10, 11).

mest na mRNA lahko ASO preprečijo translacijo. Drugi razred učinkovin so dvovertične siRNA, ki po vključitvi v z RNA induciran kompleks za utišanje (angl. *RNA-induced silencing complex*; *RISC*) sprožijo razgradnjo komplementarne mRNA, kar prekine sintezo tarčne beljakovine in s tem zmanjša njeno izražanje. Tretji razred, aptameri, ki predstavljajo kratke verige nukleotidov ali peptidov, se zaradi svoje tridimenzionalne strukture zelo specifično vežejo na tarčne proteine in s tem preprečujejo njihove interakcije z drugimi proteini (slika 3) (8–10). Vsi trije mehanizmi omogočajo natančno uravnavanje genske ekspresije ali translacije in so uporabni v sodobni terapiji. Proizvodnja terapevtskih oligonukleotidov mora biti zasnovana tako, da omogoča hitro prilagajanje spremembam na trgu in hkrati zagotavlja stroškovno učinkovitost. Začetni del proizvodnje izkorišča dobro preučeno fosforamiditno kemijo, znano iz

60. let prejšnjega stoletja, ki uporablja avtomatizirano sintezo na trdnem nosilcu. Po drugi strani je zaključni del proizvodnje, ki obsega korake čiščenja in izolacije, ostal v senci bolj temeljito preučene sinteze, čeprav ga pogosto štejemo za omejujoči korak proizvodnje terapevtskih oligonukleotidov (10).

Kemijske modifikacije, kot so fosforotioatna modifikacija (slika 2), spremembe iz anionskih molekul v nevtralne, metilacija pirimidinskega jedra in druge, lahko povečajo odpornost proti nukleazam, povzročijo višje afinitete, izboljšajo farmakokinetiko in povečajo prehajanje skozi celično membrano. Med pomembnejše modifikacije štejemo tudi 2'-O-metilacijo RNA, ki poveča njeno stabilnost z zaščito pred encimsko razgradnjo (npr. pred RNazami) in zmanjša imunogenost s preprečevanjem neželenih imunskih odzivov. Hkrati izboljša afiniteto in specifičnost baz-



Slika 3: Mehanizem delovanja protismiselnih oligonukleotidov (ASO), malih interferenčnih RNA (siRNA) in aptamerov. mRNA – informacijska RNA, RNaza H – ribonukleaza H, pre-mRNA – predhodna RNA, RISC – z RNA – inducirani kompleks za utišanje. Povzeto po (10). Slika je bila izdelana s programom Biorender.

Figure 3: Mechanism of action of antisense oligonucleotides (ASO), small interfering RNA (siRNA), and aptamers. mRNA - messenger RNA, RNase H - ribonuclease H (an enzyme that catalyzes the cleavage of phosphodiester bonds in RNA), pre-mRNA - precursor RNA (the first product of gene transcription in the nucleus), RISC - RNA-induced silencing complex (a complex that mediates gene silencing triggered by RNA). Adapted from (10). Created in Biorender.

nega parjenja s tarčno RNA, kar je ključno za učinkovitost terapevtskih oligonukleotidov. Obstajajo tudi inovacije pri dostavi, kot so lipidni nanodelci, za izboljšanje terapevtske specifičnosti in stabilnosti (9, 10). Izzivi ostajajo pri učinkovitosti dostave in zmanjševanju neželenih učinkov, ki nastanejo večinoma zaradi preostalih nečistot v učinkovini, vendar ti pristopi poudarjajo vsestranskost RNA kot tarče za zdravila pri rakavih obolenjih, genetskih motnjah in vnetnih boleznih (8).

4 METODE ZA DOLOČANJE STRUKTURE RNA

Določanje strukture RNA je ključno za razumevanje njene funkcije in razvoj strategij, usmerjenih proti RNA. Obstaja več metod za določanje struktur RNA, vsaka ima svoje prednosti in omejitve. Uporabljamo lahko biofizikalne metode (jedrska magnetna resonanca, krioelektronska mikroskopija, rentgenska kristalografija, HORNET), kemijsko sondiranje (SHAPE, dimetilsulfat sondiranje), visokozmogljivostne presejalne metode, računalniške pristope ali kombinacijo teh tehnik (12).

Rentgenska kristalografija omogoča določitev visokoločljivostnih tridimenzionalnih struktur RNA. Postopek vključuje kristalizacijo RNA in analizo uklona rentgenskih žarkov skozi kristal. Čeprav zagotavlja atomsko natančnost, je proces kristalizacije RNA lahko zelo zahteven, zlasti pri molekulah z gibljivimi deli (12).

Jedrska magnetna resonanca (NMR) je uporabna za preučevanje RNA v raztopini, saj omogoča opazovanje dinamičnega obnašanja molekul (13). Posebej učinkovita je pri manjših molekulah RNA in lahko poda informacije o strukturi ter molekulskih interakcijah. Vpogled v lokalne strukturne značilnosti, kot so glikozidni vezni koti, torzijski koti in konformacije sladkornega obroča, nam omogoča NMR (13, 14). Krioelektronska mikroskopija je postala priljubljena pri določanju struktur velikih molekul RNA in RNA-proteinskih kompleksov (15). Vključuje hitro zamrzovanje RNA vzorcev in njihovo slikanje z elektronskim mikroskopom, kar omogoča vizualizacijo zapletenih struktur RNA brez potrebe po kristalizaciji (15). Metoda SHAPE (angl. *selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*) uporablja reagente, ki selektivno modificirajo osnovni skelet RNA v strukturno prilagodljivih regijah. Tako pridobimo informacije o strukturi RNA na ravni posameznih nukleotidov in ustvarimo natančne modele sekundarne strukture.

Metoda SHAPE temelji na kemijski modifikaciji 2'-OH skupin v fleksibilnih delih RNA, kar med sintezo komplementarne DNA ustavi reverzno transkriptazo in omogoči kartiranje strukturno dinamičnih območij. Na voljo sta tudi sondiranje na liniji in dimetilsulfat (DMS) sondiranje (16). Specifična metoda sondiranja DMS je sekvenciranje RNA, ki omogoča natančno kartiranje strukture RNA s pomočjo sekvenciranja. Ta metoda uporablja metilacijo adeninov in citozinov v nesparjenih delih RNA, kar prav tako blokira reverzno transkriptazo, pri čemer visokoprepustno sekvenciranje razkrije nesparjena območja v strukturi RNA. Vse naštetje metode omogočajo visokoločljivostno analizo struktur RNA *in vivo* ali *in vitro*. Metoda HORNET (angl. *holistic RNA structure determination method using atomic force microscopy, unsupervised machine learning and deep neural networks*) je celostni pristop k določanju struktur RNA, ki združuje mikroskopijo na atomsko silo, strojno učenje in globoke nevronske mreže. Ta inovativna tehnika omogoča določanje tridimenzionalnih topoloških struktur RNA, predvsem velikih in prilagodljivih molekul. SHAPE-Seq je tehnika, ki združuje kemijo SHAPE z visokozmogljivim sekvenciranjem, kar omogoča sočasno analizo številnih struktur RNA (16).

Izbira metode za določanje strukture RNA je odvisna od več dejavnikov, kot so velikost RNA, njena fleksibilnost, zelena ločljivost in specifično raziskovalno vprašanje. Pogosto kombinacija različnih tehnik omogoča najbolj celovit vpogled v strukturo in funkcijo RNA. Prav tako je mogoče podatke nizke ločljivosti, pridobljene s kemijskim sondiranjem ali krioelektronsko mikroskopijo, združiti s podatki visoke ločljivosti iz NMR ali rentgenske kristalografije, da ustvarimo bolj popolne strukturne modele.

5 CILJANJE RNA Z ZDRAVILNIMI UČINKOVINAMI

Razvoj novih molekul za ciljno vezavo na RNA otežujejo številne omejitve, povezane z RNA kot terapevtsko tarčo. Čeprav je uporaba malih molekul za usmerjanje proti RNA obetavna, je hkrati zelo zahtevna zaradi dinamične narave RNA, omejene kemijske raznolikosti in težav pri doseganju selektivne vezave (17, 18).

Molekule RNA so naravno gibljive in imajo manjšo kemijsko raznolikost kot proteini (RNA je sestavljena iz nukleotidov s 4 različnimi bazami, proteini pa iz 20 aminokislin), kar otežuje načrtovanje malih molekul, ki bi se lahko selektivno



in učinkovito vezale na določene strukture RNA (17). Poleg tega ligandi, ki se vežejo na RNA, pogosto kažejo nizko specifičnost, saj se lahko vežejo na več različnih tarč RNA, kar otežuje razvoj selektivnih zdravil (18). Pri razvoju učinkovin moramo upoštevati tudi, da morajo male molekule tekmovati z zelo velikimi in strukturno zapletenimi ribosomskimi RNA, ki lahko zasenči ciljanje struktur drugih RNA. Strukturni in regulacijski elementi RNA so zapleteni, zato je določanje selektivnosti malih molekul in prepoznavanje tarč RNA še vedno velik izziv. To zahteva napredne metode za identifikacijo in potrditev tarč RNA ter njihovih interakcij z malimi molekulami (18, 19). Terapije usmerjene na RNA, kot so siRNA in ASO, lahko povzročijo nespecifične učinke, vključno z nenamernim (angl. *off-target*) izklopom genov, imunsko aktivacijo in toksičnostjo nosilcev, kar otežuje interpretacijo eksperimentalnih rezultatov in lahko vodi do neželenih učinkov (20). Obstaja več primerov malih molekul, ki ciljajo specifične RNA. Nekatere so že dostopne na trgu, saj so bile odobrene s strani EMA ali FDA (preglednica 1), nekatere so že bile odobrene in so nato izgubile dovoljenje (preglednica 2). Zaradi hitrega napredovanja področja obstaja tudi veliko število učinkovin, ki so v različnih fazah kliničnih študij (preglednica 3). Nekatere spojine zavirajo nastajanje

miRNA, povezanih z boleznimi (npr. miR-132, ki je trenutno v predkliničnih študijah), medtem ko ASO, kot je nusinersen, cilja pre-mRNA gena *SMN2* in se uporablja za zdravljenje spinalne mišične atrofije (SMA) in je na trgu že od decembra 2016. V razvoju so tudi spojine, kot so IO-NIS_MAPTRx, ki vpliva na alternativno spajanje proteina tau, povezanega z nekaterimi nevrodegenerativnimi boleznimi in je od leta 2022 v 2. fazi kliničnih preskušanj. Poleg tega sta znani dve zdravilni učinkovini, risdiplam in branaplam, ki so jih razvili za zdravljenje spinalne mišične atrofije z modulacijo spajanja RNA (7). Risdiplam je odobreno zdravilo za zdravljenje SMA, ki z modulacijo spajanja gena *SMN2* poveča proizvodnjo funkcionalnega proteina SMN in je na trgu za klinično uporabo. Branaplam je bil razvijan kot peroralno zdravilo za SMA, vendar je bil razvoj za to indikacijo ustavljen zaradi napredka obstoječih terapij, razvoj za Huntingtonovo bolezen pa je bil kasneje prekinjen zaradi varnostnih težav (21). Obstaja tudi protibakterijska učinkovina linezolid, odobrena leta 2000, ki zavira sintezo bakterijskih proteinov z vezavo na 23S rRNA v 50S podenoti ribosoma, kar omogoča učinkovitost proti odpornim sevom (npr. MRSA), vendar lahko dolgotrajna uporaba povzroči zaviranje kostnega mozga zaradi vpliva na mitohondrijsko rRNA (22, 23).

Preglednica 1: Odobrene zdravilne učinkovine, ki ciljajo RNA. Povzeto po (7, 21, 22, 23, 24).

Table 1: Approved therapeutic agents targeting RNA. Adapted from (7, 21, 22, 23, 24).

Zdravilna učinkovina	Tip	Tarča in mehanizem delovanja	Indikacija	Leto odobritve (EMA)
Nusinersen	ASO (SSO)	ASO cilja pre-mRNA transkript gena <i>SMN2</i> in modulira izrezovanje intronov/eksonov (angl. <i>splicing</i>), kar omogoči vključitev eksona 7 v končno mRNA. To povzroči proizvodnjo funkcionalnega SMN proteina	Spinalna mišična atrofija	2017
Inotersen	ASO	TTR mRNA; RNaza H posredovana degradacija mRNA	Dedna transtiretinska amiloidoza s polineuropatijo	2018
Volanesorsen	ASO	ApoC III mRNA; znižanje ApoC III proteina	Družinska hilmikronemija	2019
Patisiran	siRNA	TTR mRNA; RISC-posredovana degradacija mRNA LNP-dostava)	Dedna transtiretinska amiloidoza s polineuropatijo	2018

Golodirsén	ASO (SSO)	DMD mRNA (ekson 53); izrezovanje eksona 53 za delno obnovitev distrofina	Duchennova mišična distrofija	2020
Givosiran	siRNA	ALAS1 mRNA; znižanje deltaaminolevulinske kisline (GalNAc-dostava)	Akutna hepatična porfirija	2020
Lumasiran	siRNA	HAO1 mRNA; znižanje glikolatne oksidaze (GalNAc-dostava)	Primarna hiperoksalurija tip 1	2020
Inklisiran	siRNA	PCSK9 mRNA; znižanje LDL holesterola (GalNAc-dostava)	Družinska heterozigotna hiperholesterolemija	2020
Viltolarsén	ASO (SSO)	DMD mRNA (ekson 53); izrezovanje eksona 53 za delno obnovitev distrofina	Duchennova mišična distrofija	2021
Kasimersén	ASO (SSO)	DMD mRNA (ekson 45); izrezovanje eksona 45 za delno obnovitev distrofina	Duchennova mišična distrofija	2021
Eplontersén	ASO	TTR mRNA; RNaza H posredovana degradacija mRNA (GalNAc-dostava)	Dedna transtiretinska amiloidoza s polineuropatijo	2023
Avacinkaptad pegol	Aptamer	Sestavina komplementa C5; inhibicija komplementnega proteina C5 (PEG dostava)	Suha starostna degeneracija makule	2023
Linezolid	Antibiotik	23S rRNA (bakterijski ribosom); inhibicija proteinske sinteze z blokado iniciacije translacije	Okužbe s po Gramu pozitivnimi bakterijami	2001
Risdiplam	Mala molekula	SMN2 pre-mRNA; modulacija izrezovanja eksona 7 za povečanje funkcionalnega SMN proteina	Spinalna mišična atrofija	2021

ASO – protismiselni oligonukleotid, SSO – oligonukleotid za spremembo izrezovanja, siRNA – mala interferenčna RNA, pre-mRNA – nezrela oblika RNA pred izrezovanjem, RISC – z RNA induciran kompleks za utišanje, LNP-dostava – lipidni nanodelci za dostavo, GalNAc – N-acetilgalaktozamin, PEG – polietilenglikol, SMN2 – gen za protein za preživetje motoričnih nevronov (angl. Survival motor neuron 2), TTR – transtiretin, ApoC-III – apolipoprotein C-III, DMD – distrofin, ALAS1 – encim za sintezo hema, PCSK9 – encim za regulacijo lipoproteinov nizke gostote.

Preglednica 2: Prekinjen razvoj zdravilnih učinkovin, ki ciljajo RNA. Povzeto po (7, 21, 22, 23, 24).

Table 2: Discontinued development of RNA-targeting medicinal products. Adapted from (7, 21, 22, 23, 24).

Zdravilna učinkovina	Tip	Tarča	Razlog za umik	Leto odobritve	Leto umika
Fomivirsen	ASO	CMV IE2	Nizko povpraševanje (nadomeščena z novimi terapijami)	1998	2006
Mipomersen	ASO	ApoB 100	Varnostni problemi (jetrne okvare)	2013	2019
Pegaptanib	Aptamer	VEGF	Komercialni neuspeh	2006	2017
Branaplam	Mala molekula	SMN2 pre-mRNA / Huntingtin mRNA	Znaki periferne nevropatije, povečane vrednosti NfL, spremembe na možganskih slikah	/	Razvoj ustavljen 2023

ASO – protismiselni oligonukleotid, CMV – citomegalovirus, IE2 – zgodnji virusni protein, ApoB – apolipoprotein B, VEGF – vaskularni endotelni rastni faktor, NfL – lahka veriga neurofilamenta, SMN2 – gen za protein za preživetje motoričnih nevronov, pre-mRNA – nezrela oblika RNA.

Preglednica 3: Učinkovine, ki ciljajo RNA – v kliničnem razvoju. Povzeto po (7, 21, 22, 23, 24).

Table 3: RNA-targeting medicinal products in clinical development. Adapted from (7, 21, 22, 23, 24).

Zdravilna učinkovina	Tip	Tarča	Indikacija	(Pred-)klinični razvoj
Pelakarsen	ASO	Lipoprotein	Kardiovaskularne bolezni	Faza 3
Tofersen	ASO	SOD1 mRNA	Amiotrofična lateralna skleroza	Faza 3
Fitusiran	siRNA	Antitrombin III	Hemofilija	Faza 3
Vutrisiran	siRNA	TTR mRNA	Dedna transtiretinska amiloidoza	Odobren v ZDA 2022
IONIS-MAPTRx	ASO	MAPT mRNA (tau); zmanjšanje proizvodnje tau proteina prek degradacije mRNA	Alzheimerjeva bolezen	Faza 2
Nedosiran	siRNA	LDHA mRNA	Primarna hiperoksalurija	Faza 3
Sepofarsen	EON	CEP290	Leberjeva kongenitalna amavroza	Faza 2/3
Inhibitor miR-132	ASO	miR-132; blokada mikroRNA-132 za preprečevanje patološkega preoblikovanja srca	Srčno popuščanje	Predklinični razvoj

ASO – protismiselni oligonukleotid, SOD1 – superoksid dismutaza 1, siRNA – mala interferenčna RNA, TTR – transtiretin, MAPT – oznaka za gen za tau protein, LDHA – laktat dehidrogenaza A, EON - oligonukleotid za spremembo izrezovanja, CEP290 – gen za fotoreceptorski protein, miR – mikroRNA.

6 SKLEP

RNA predstavlja izjemno obetavno tarčo za razvoj novih zdravil zaradi svoje strukturne in funkcionalne raznolikosti. Njena sposobnost interakcije z drugimi biomolekulami omogoča širok spekter terapevtskih pristopov, kot so protismiselni oligonukleotidi, siRNA in aptameri. Napredek v kemijskih modifikacijah je izboljšal stabilnost, specifičnost in farmakokinetiko teh učinkovin. Kljub temu ostajajo izzivi, kot so dinamična narava RNA, omejena kemijska raznolikost in težave pri selektivnem ciljanju. Določanje struktur RNA z naprednimi metodami, kot so NMR, krio-EM in SHAPE-Seq, je ključno za razumevanje njene funkcije ter načrtovanje učinkovitih terapij. Uspešni primeri zdravil, kot sta nusinersen za zdravljenje spinalne mišične atrofije in linezolid za zdravljenje bakterijskih okužb, dokazujejo potencial RNA-usmerjenih terapij. V prihodnosti bo kombinacija inovativnih tehnologij in racionalnega načrtovanja ključna za premagovanje omejitev ter širjenje uporabe na RNA usmerjenih zdravil.

7 LITERATURA

- Šponer J, Bussi G, Krepl M, Banáš P, Bottaro S, Cunha RA, et al. RNA Structural Dynamics As Captured by Molecular Simulations: A Comprehensive Overview. *Chem Rev.* 2018 Apr 25;118(8):4177–338.
- Ganser LR, Kelly ML, Herschlag D, Al-Hashimi HM. The roles of structural dynamics in the cellular functions of RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Aug;20(8):474–89.
- Biology LibreTexts [Internet]. 2016 [cited 2025 Feb 3]. 9.13: Ribozymes. Available from: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/Biology_\(Kimball\)/09%3A_Regulation_of_Gene_Expression/9.13%3A_Ribozymes](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/Biology_(Kimball)/09%3A_Regulation_of_Gene_Expression/9.13%3A_Ribozymes)
- Cao C, Cai Z, Xiao X, Rao J, Chen J, Hu N, et al. The architecture of the SARS-CoV-2 RNA genome inside virion. *Nat Commun.* 2021 Jun 24;12(1):3917.
- Wahlestedt C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Jun;12(6):433–46.
- Fu XD. Non-coding RNA: a new frontier in regulatory biology. *Natl Sci Rev.* 2014 Jun 1;1(2):190–204.
- Childs-Disney JL, Yang X, Gibaut QMR, Tong Y, Batey RT, Disney MD. Targeting RNA structures with small molecules. *Nat Rev Drug Discov.* 2022 Oct;21(10):736–62.
- Dhuri K, Bechtold C, Quijano E, Pham H, Gupta A, Vikram A, et al. Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *J Clin Med.* 2020 Jun 26;9(6):2004.
- Traber GM, Yu AM. RNAi-Based Therapeutics and Novel RNA Bioengineering Technologies. *J Pharmacol Exp Ther.* 2023 Jan;384(1):133–54.
- Abe A, Časar Z. Overview and Recent Advances in the Purification and Isolation of Therapeutic Oligonucleotides. *Org Process Res Dev.* 2025 Jan 17;29(1):15–33.
- PubChem. Nusinersen [Internet]. [cited 2025 Jun 19]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nusinersen>
- Jackson RW, Smathers CM, Robart AR. General Strategies for RNA X-ray Crystallography. *Molecules.* 2023 Feb 23;28(5):2111.
- Barnwal RP, Yang F, Varani G. Applications of NMR to structure determination of RNAs large and small. *Arch Biochem Biophys.* 2017 Aug;628:42–56.
- Allain FH-T, Varani G. How accurately and precisely can RNA structure be determined by NMR? *J Mol Biol.* 1997 Mar;267(2):338–51.
- Zhang K, Li S, Kappel K, Pintilie G, Su Z, Mou TC, et al. Cryo-EM structure of a 40 kDa SAM-IV riboswitch RNA at 3.7 Å resolution. *Nat Commun.* 2019 Dec 3;10(1):5511.
- Wu Y, Shi B, Ding X, Liu T, Hu X, Yip KY, et al. Improved prediction of RNA secondary structure by integrating the free energy model with restraints derived from experimental probing data. *Nucleic Acids Res.* 2015 Sep 3;43(15):7247–59.
- Falese JP, Donlic A, Hargrove AE. Targeting RNA with small molecules: from fundamental principles towards the clinic. *Chem Soc Rev.* 2021;50(4):2224–43.
- Hargrove AE. Small molecule–RNA targeting: starting with the fundamentals. *Chem Commun.* 2020;56(94):14744–56.
- Disney MD. Targeting RNA with Small Molecules To Capture Opportunities at the Intersection of Chemistry, Biology, and Medicine. *J Am Chem Soc.* 2019 May 1;141(17):6776–90.
- Bereczki Z, Benczik B, Balogh OM, Marton S, Puhl E, Pétervári M, et al. Mitigating off-target effects of small RNAs: conventional approaches, network theory and artificial intelligence. *Br J Pharmacol.* 2025 Jan;182(2):340–79.
- Neurology live [Internet]. 2022 [cited 2025 Jun 20]. Novartis Suspends Phase 2 Study of Huntington Disease Agent Branaplam. Available from: <https://www.neurologylive.com/view/novartis-suspends-phase-2-study-huntington-disease-agent-branaplam>
- Hashemian SM, Farhadi T, Ganjparvar M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Des Devel Ther.* 2018 Jun;Volume 12:1759–67.
- Long KS, Vester B. Resistance to Linezolid Caused by Modifications at Its Binding Site on the Ribosome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Feb;56(2):603–12.
- Biochempeg [Internet]. 2023 [cited 2025 Jun 20]. FDA Approved Nucleic Acid Drugs. Available from: <https://www.biochempeg.com/article/410.html#:~:text=To%20date%2C%20there%20have%20been%2022%20FDA%2D,that%20have%20been%20withdrawn%20from%20the%20market.>