

ОБЗОР REVIEW

РНК ТЕРАПИИ И ЛЕКАРСТВА - ОБЩ ПРЕГЛЕД И ФАРМАКОЛОГИЧНИ ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА

*Иванка Мутаfoва^{1,2}, Теодора Ханджиева-Дърленска², Калоян Георгиев¹, Велко Минчев³,
Валентина Белчева⁴*

¹Факултет по фармация, Медицински университет – Варна

²Катедра по фармакология и токсикология, Медицински факултет, Медицински университет – София

³Отделение по медицинска онкология, УМБАЛ „Софиямед“ – София,

⁴Медицински колеж, Тракийски университет – Стара Загора

RNA THERAPIES AND MEDICINES – GENERAL OVERVIEW AND PHARMACOLOGICAL CHALLENGES

Ivanka Mutafova^{1,2}, Teodora Handjieva-Darlenska², Kaloyan Georgiev¹, Velko Minchev³, Vaelentina Belcheva⁴

¹Faculty of Pharmacy, Medical University of Varna

²Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, Medical University - Sofia

³Department of Oncology, Sofamed University Hospital, Sofia

⁴Medical College, Trakia University - Stara Zagora

РЕЗЮМЕ

Последните постижения на науката за получаването, пречистването и вътреклетъчното доставяне на РНК даде възможност за разработване на РНК фармакотерапевтични средства. РНК терапиите представляват една бързо разширяваща се категория лекарствени продукти, които ще променят стандартното лечение на много заболявания и ще позволят актуализиране на концепцията за персонализирана медицина. Научни проучвания показват, че те могат да имат голям терапевтичен потенциал при наследствени, онкологични и неврологични заболявания, болести на обмяната и др. РНК терапиите е възможно да предоставят по-добри възможности за насочване към патофизиологичните механизми на заболяванията, което от своя страна довежда до по-добри терапевтични резултати. Тези лекарства са рентабилни за създаване, сравнително лесни за производство и могат да бъдат използвани за много нелечими към настоящия момент заболявания. Напоследък те започват и активно да се прилагат в клиничната практика. В този обзор авторите обсъждат общите концепции на различните класове РНК лекарства и техните фармакологични свойства. Освен това е направен и общ преглед на вече одобрените от FDA и EMA РНК лекарства и тяхното място в съвременната медицина.

Ключови думи: РНК, ASO, аптамери, siRNA, miRNA

ABSTRACT

Recent advances in the science of RNA production, purification, and intracellular delivery have enabled the development of RNA therapeutics. RNA therapies represent a rapidly expanding category of medicinal products that will change the standard treatment of many diseases, redefining the concept of personalized medicine. They may have great therapeutic potential in hereditary, oncological, and neurological diseases, metabolic diseases, etc. RNA therapies may provide better opportunities to target the underlying pathophysiological mechanisms of diseases, which in turn may lead to better therapeutic results. These medications are cost-effective to develop, relatively easy to manufacture, and hold potential for many presently incurable conditions. They are rapidly gaining traction in clinical practice.

In this comprehensive review, we discuss the general concepts of the different classes of RNA drugs and their pharmacological properties. Furthermore, we provide an overview of RNA drugs that have already received approval from regulatory bodies such as the FDA and EMA, shedding light on their pivotal role in modern medicine.

Keywords: RNA, ASO, aptamers, siRNA, miRNA

ВЪВЕДЕНИЕ

Нуклеинови киселини са открити през 1868 г. от Фридрих Мишер (Johannes Friedrich Miescher), който нарича материала „нуклеин“, защото е открит в ядрото (1). Молекулата на мРНК е открита през 1961 г. от Бренер и сътр. и първоначално се е смятало, че е само посредник между ДНК и протеините (2). Впоследствие са установени много други видове РНК, които нямат кодиращи свойства. Откриването им и изучаването на свойствата и функциите на РНК като цяло довежда до разбирането, че това е една „универсална молекула“, действаща на много и различни клетъчни нива. Всичко това създава един нов път за лечение на различни заболявания. Терапиите, базирани на РНК, включително тези с РНК молекули като лекарства и малки молекули насочени към РНК, предлагат уникални възможности за разширяване на гамата от терапевтични цели (3). Първите РНК лекарства вече са одобрени и използвани в клиничната практика, а много други са в процес на разработка. РНК може да се използва и в терапията на онкологичните заболявания, предлагайки широк спектър от терапевтични стратегии базирани на нея (4).

Първоначално, нуклеиновите киселини не са се считали за подходящи терапевтични средства поради нестабилната им структура, техния отрицателен заряд и невъзможността да преминават пасивно през хидрофобната липидна мембрана на клетката, както и заради бързото им разграждане от рибонуклеазите (РНКази). Други опасения като потенциална токсичност, неспецифично имунно активиране и неизвестната ефективност също са се нуждали от допълнително изследване (5,6).

Тези препятствия са значително преодолени чрез напредъка в изучаването на биологията на РНК, развитието на биоинформатиката и нанотехнологиите, като по този начин се улеснява развитието на РНК терапиите. Предимствата на РНК лекарствата включват:

1. способността им да действат върху цели, които иначе са „нелекарствени“ за малките молекули или протеини;

2. тяхната бърза комерсиална разработка е икономически ефективна в сравнение с проучването и внедряването в практиката на малки молекули или рекомбинантни протеини;

3. способността бързо да се променя последователността на РНК конструкцията за персонализирани лечения или за адаптиране към еволюиращ патоген (5);

4. няма риск от генотоксичност.

При ДНК терапиите, ДНК молекулата се доставя на клетките чрез вирусен вектор и има възможност този вектор да се интегрира в генома на клетката и да причини мутации. Този потенциален риск може да бъде избегнат при използване на РНК вместо ДНК (7).

ЦЕЛ

Да представим различните РНК формати като нова терапевтична възможност при определени заболявания. Да сравним и анализираме основните характеристики на различните РНК терапии, механизма на тяхното действие и фармакологичните предизвикателствата за внедряването им в клиничната практика. Нашата цел е да представим одобрените от FDA и ЕМА РНК лекарства от фармакологична гледна точка, като се фокусираме върху показания, приложение и механизъм на действие.

Методология

В тази статия направихме систематичен преглед в научната литература на различните видове РНК молекули и подходи и предизвикателствата, които изникват в процеса на тяхното разработване като нов клас медикаменти и при клиничното им приложение. Направихме преглед на лекарствена информация, предоставена от притежателите на разрешенията за употреба на вече одобрените РНК лекарства.

РЕЗУЛТАТИ

Най-изследваните РНК формати в момента са: транскрибираща информационна РНК (mRNA), самоусилваща се РНК (SAM), антисенс олигонукле-

отиди (ASO), РНК аптамери, интерферираща РНК (RNAi), която включва малка интерферираща РНК (siRNA) и микроРНК (miRNA)⁸ (фиг. 1). Те могат се отнесат към две основни групи:

1. Кодираща РНК (**сrNA**), преобразуваща се в протеин, включва mRNA и SAM;

2. Некодираща РНК (**ncRNA**), която не се преобразува в протеини, а по-скоро регулира клетъчната физиология и функции. Включва ASO, аптамери, siRNA и miRNA (4). ASO, miRNAs и siRNA действат чрез насочване и инхибиране на специфични таргетни mRNA, докато аптамерите са 3D-структурирани олигонуклеотиди, служещи като лиганди с висок афинитет и потенциални антагонисти на протеини, асоциирани със заболяване. Въз основа на ролята, свързана с биологията на рака, ncRNA може да функционира и като онкогени или туморсупресорни гени и следователно, може да се прилага за лечение.

В допълнение наскоро са описани нов клас от малки, двойноверижни РНК (dsRNA), които могат да активират ендогенни гени чрез механизъм на

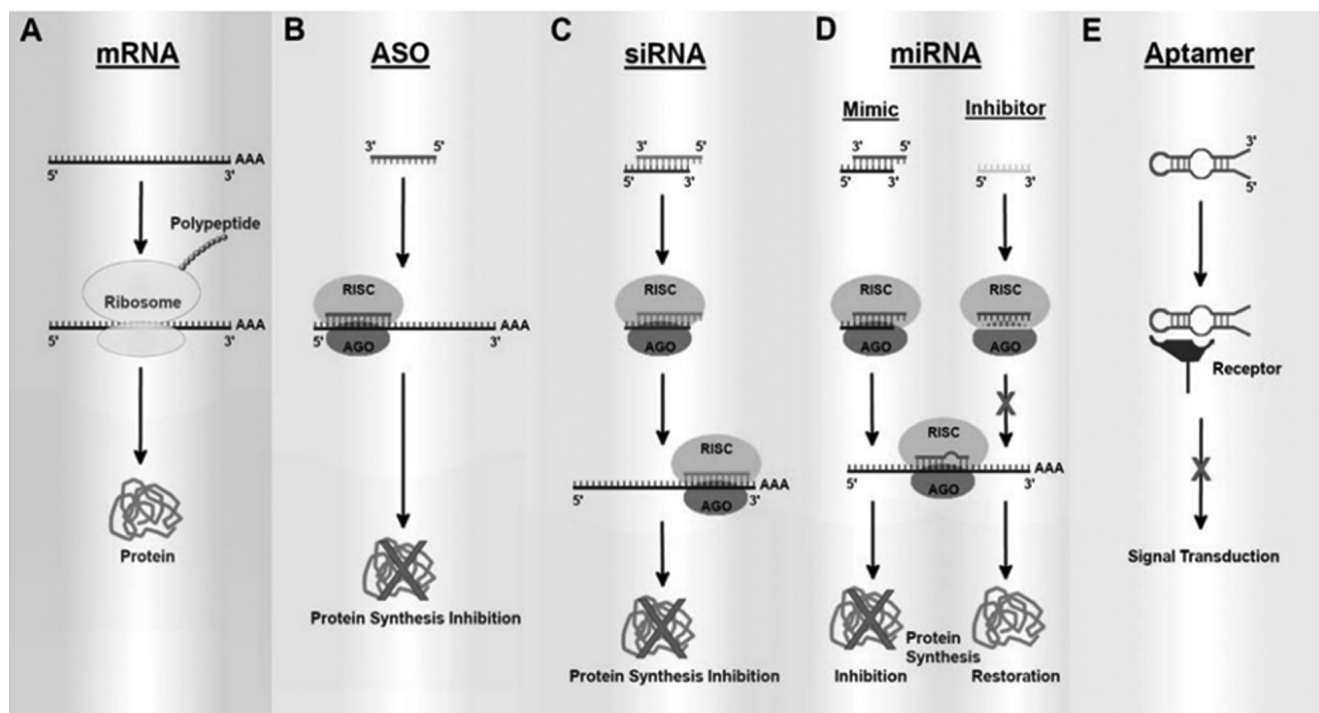
ген промотор, насочен към епигенетични модификации. Те са наречени малки активизиращи РНК (saRNA) (9). Отделен РНК формат е т. нар. единична направляваща РНК (sgRNA) за CRISPR/Cas9 системи в генната терапия.

Фиг. 1 представя схематично най-често изследваните РНК формати с техния механизъм на действие.

РНК ЛЕКАРСТВА

Транскрибираща информационна РНК (mRNA) и нейното място като РНК терапия

Концепцията за пренасяне на mRNA директно в клетките вместо пренасяне на ДНК съществува от няколко десетилетия. Тъй като mRNA се разгражда бързо, тя се смята за по-безопасна алтернатива при протеинова заместителна терапия отколкото използването на ДНК (11). Това от своя страна води до липса на опасения за потенциални неблагоприятни ефекти от дълготрайната експресия или геномна интеграция. Експресията на mRNA обаче е по-трудна



Фиг. 1. Схема на РНК терапевтичните подходи. (A) В рибозомите се транслират зрелите mRNA и се синтезират протеини. (B) ASO са малки едноверижни ДНК или РНК молекули, които имат точна комплементарност към таргетната mRNA. Веднъж свързани, те предизвикват посттранскрипционно заглушаване на гена чрез предотвратяване на транслацията на mRNA. (C) siRNA са малки двойноверижни РНК молекули, които имат точна комплементарност към таргетната mRNA. Веднъж свързани с RISC комплекса, siRNA се свързва с неговата таргетна mRNA и индуцира генно заглушаване чрез предотвратяване на транслацията на mRNA. (D) miRNA имитаторите са малки двуверижни РНК молекули, които се свързват и насочват RISC комплекса към неговата таргетна mRNA. miRNA имитаторът се свързва с непълна комплементарност към своята таргетна mRNA и транслацията ще бъде блокирана или mRNA ще се разгради, което ще доведе до заглушаване на гена. miRNA инхибиторите са малки едноверижни РНК, които се свързват и потискат тяхната таргетна miRNA. Това води до възстановяване на транслацията на mRNA. (E) Аптамерите са РНК, ДНК или РНК/ДНК хибриди, които образуват третични структури и се свързват с таргетната молекула, като потискат или подобряват пътя, в който участва таргетната молекула (10) (адаптирана по Hannah Zogg, Rajan Singh и Seungil Ro (10))

за регулиране от експресията на ДНК и може да възникне токсичност от експресията на mRNA в нетаргетните места и съответно - до нежелана експресия на протеини в нетаргетни органи. Стратегии, които обикновено се използват за пространствен контрол на експресията на ДНК (използване на транскрипционни фактори, включване на тъканно специфични промотори) и за времеви контрол (използването на транскрипционни превключватели за включване/изключване), не са налични за контрол на mRNA. Това, заедно с нестабилната природа на mRNA забавя възможността за *in vivo* приложение. Развитието на mRNA терапиите получи тласък, след като бяха създадени по-стабилни модифицирани нуклеотиди и бяха генерирани сложни системи за регулиране на експресията на mRNA. mRNA лекарствата могат да имат място в протеиновата заместителна терапия (доставяне на васкуларен ендотелен растежен фактор (VEGF)-А след миокарден инфаркт (12), ваксини за инфекциозни заболявания (напр. експресия на вирусни антигени в дендритни клетки (13) и ваксините срещу SARS-CoV-2 (14), противотуморни ваксини (рак на простатата, недребноклетъчен белодробен рак, меланом (14,15) или за *in vivo* производство на моноклонални антитела (16,17).

Антисенс олигонуклеотиди (ASO): Антисенс олигонуклеотидите са малки молекулни лекарства, които специфично се свързват с техните таргетни mRNA чрез правилото за комплементарно сдвояване на базите и по този начин пречат на етапите на разплитане на ДНК, репликация, транскрипция и сплайсинг на mRNA, транспорт и трансляция. Те са едноверижни ДНК или РНК с дължина от 15–25 нуклеотида. Поради слабата хидрофилност на единичните олигонуклеотиди обикновено са необходими химически модификации за подобряване на тяхната стабилност и лекарствена ефективност. След химическа модификация представителните ASO от първо, второ и трето поколение са тилолигонуклеотиди, олигонуклеотиди със смесен скелет и полипептидни нуклеинови киселини (18). Тези модификации увеличават афинитета на свързване с таргетната последователност, повишават устойчивостта към нуклеази и намаляват имунната активация. ASO често са конюгирани с различни молекули, включително холестерол, пептиди, захар и аптамери с цел специфично насочване или проникване в клетката. Въпреки това някои от тези наскоро разработени модификации на ASO показват по-висока токсичност (19). ASO действат или върху таргетните mRNA чрез активиране на РНКаза или инхибират трансляцията, като предотвратяват свързва-

нето с рибозомите чрез пространствен (стеаричен) ефект (20). Нещо повече, като затварят местата на снаждане, ASO могат селективно да насърчават експресията на определена алтернативна сплайсозома от протеини и да коригират грешния сплайсинг, да поправят дефектни РНК, да възстановят производството на някои протеини или да регулират надолу (down-regulation) експресията на определени гени (18).

Лекарства, използващи механизма на РНК интерференция

РНК интерференцията е клетъчен механизъм, чрез който малки, некодиращи РНК (ncRNA) като siRNA и miRNA контролират генната експресия чрез транскрипционно или посттранскрипционно заглушаване на гени. Докато ендогенните miRNA разпознават и се свързват с таргетните mRNA дори при ограничено комплементарно сдвояване на базите, което води до нейното разцепване или транслационна репресия, siRNA се правят от екзогенни прекурсори на двойноверижна РНК и се свързват с перфектна комплементарност.

Малка интерферираща РНК (siRNA): Едно от най-важните постижения в биологията е откритието, че siRNA е в състояние да регулира експресията на гени чрез феномен, известен като РНК интерференция или генно заглушаване (21). siRNKs са къси (20–25 нуклеотиди), двойноверижни РНК молекули, които използват пътя на РНК интерференция, за да разградят таргетната mRNA по начин, специфичен според последователностите. При попадане в цитоплазмата argonaute (AGO)2 разцепва пасажерската (сенс) верига и водещата (антисенс) верига на siRNA се зарежда в РНК-индуцирания заглушаващ комплекс (RISC). След това водещата (антисенс) верига насочва RISC към таргетната mRNA, която се разпознава и разцепва. RISC и водещата (антисенс) верига могат да бъдат рециклирани и следователно една siRNA молекула може да задвижи разцепването на множество mRNA молекули, което води до високоэффективно заглушаване на определен ген (17).

МикроРНК (miRNA): miRNA са къси (19–25 нуклеотида) некодиращи РНК, които участват в регулирането на генната експресия. miRNA терапевтиците могат да бъдат категоризирани в два вида: miRNA имитатори (miRNA mimics) и miRNAs инхибитори (miRNA inhibitors) (10).

miRNK имитатори се хибридизират към таргетни mRNA чрез сдвояване на антисенс бази, което води до инхибиране на трансляцията и разграждането на таргетната mRNA (22). Една или няколко молекули mRNA могат да бъдат мишена от всяка

miRNA. Изчислено е, че приблизително 60% от човешките mRNA са мишена и са регулирани до определена степен от miRNAs. Генното заглушаване, регулирано от miRNA имитаторите, се медира от взаимодействието на РНК дуплекса miRNA/mRNA с РНК-индуцирания заглушаващ комплекс (RISC) и от различни механизми, които водят или до трансляционна репресия, или разграждане на mRNA, в зависимост от степента на комплементарност на miРНК с таргетните mRNA последователности (23).

За разлика от това възстановяването на синтеза на протеини се постига чрез прилагане на miRNA инхибитор, едноверижна miRNA, която допълва таргетната miRNA. След като miRNA инхибиторът се свърже с miRNA, тя предотвратява свързването на miRNA с РНК-индуцирания заглушаващ комплекс (RISC). Следователно miRNA инхибиторите блокират способността за насочване на mRNA към miRNAs и възстановяват синтеза на протеини (10).

Идентифицирани са над 2500 човешки miRNA и се признава, че сложни мрежи от miРНК регулират генната експресия при бозайниците (24). Доказано е, че изменения в експресията на miRNA са свързани с множество патологични процеси, включително рак, където е доказано, че miRNAs участват в туморогенезата и туморната прогресия, което се дължи на стимулиращи тумора miRNAs (oncomiRNAs) или алтернативно като туморни супресорни miRNAs (25). miRNA имитаторите са показали активност в предклинични модели на рак, а няколко са в клинични изпитвания (26). Доказано е, че miRNA могат ефективно да регулират резистентността на туморните клетки към химиотерапия и използването на miRNA в комбинация с химиотерапия за постигане на по-добър терапевтичен ефект е обещаващо (27).

РНК аптамери

Аптамерните олигонуклеотиди са едноверижни ДНК или РНК олигонуклеотиди, които свързват мишени с висок афинитет въз основа на техните триизмерни структури (28). РНК аптамерите се отнасят до РНК олигонуклеотиди. Чрез процес, наречен Систематична еволюция на лиганди чрез експоненциално обогатяване (SELEX), са идентифицирани редица РНК аптамери срещу различни цели, включително органични съединения, нуклеотиди, протеини и дори цели клетки и организми (29). Аптамерите често се използват като система за доставяне на химиотерапевтици, РНК лекарства и лекарства, съдържащи наночастици, чрез специфично свързване към клетъчни и туморно специфични клетъчни повърхностни рецептори. Аптамерите могат също да действат като терапевтици, като блокират основ-

ните взаимодействия между мишената и други молекули (30). В допълнение аптамерите могат да се използват като антагонисти на имунните контролни точки като PD-1 и PD-L1 за ремоделиране на имунни отговори или като агонисти на ко-стимулиращи рецептори за активиране на свързани пътища (31). Аптамерите са селектирани да таргетират повърхностни маркери за рак като нуклеолин и MUC1 или метастатични клетъчни линии за откриване на различни видове рак или ракови метастази (32). Немодифицираните РНК аптамери са чувствителни към нуклеаза с лоша серумна стабилност *in vivo*. При модифициране на захарния пръстен и фосфодиестерната връзка се повишава резистентността към нуклеаза. Освен това модификациите на 5' и 3' края (end capping) и използването на L-енантиомерни форми на нуклеиновите киселини осигурява допълнителни възможности за защита на аптамерите от нуклеазна деградация. За да се увеличи полуживотът в системното кръвообращение, прикрепяването на 5' край, включително холестерол, диалкил липиди и PEG, намаляват бъбречната филтрация и удължават циркулаторното време (33). Въпреки че показват обещаващи резултати *in vitro*, повечето аптамери са в предклинични фази, тъй като терапевтиците за рак са насочени към рецептори на клетъчната повърхност, включително CD28, CD40 и 4-1BB (CD137), и все още не са влезли в клинични изпитвания (34).

Фармакологични предизвикателства

Някои от предизвикателствата пред разработването на РНК лекарствата са уникални за този клас медикаменти, като например факта, че РНК терапевтиците разчитат на специфични знания за идентичността и механизма на действие на мутациите на заболяванията. Генетичното тестване и геномното секвениране и анализ са важни за идентифициране на целите на РНК терапиите. Нарастващия брой биобанки и увеличаване на индивидуалното архивиране и извличане на данни улесняват анализа и разработването на РНК лекарства. Предклиничното тестване при животински модели все още е стандарт на много програми за развитие на лекарства.

Някои от по-важните предизвикателства за *in vivo* прилагане на РНК лекарствата са възможността за стимулиране на имунната система, липсата на специфично прицелване на зоната на лезията, избягване на бъбречния клирънс и ретикуло-ендотелния тъканен клирънс, създаването на подходящи носители за доставяне в прицелните органи и избягване на ендозомите (35,36,37).

Табл. 1. Сравнителна характеристика на лекарства неорганични съединения, нискомолекулни лекарства органични съединения, лекарства протеини и РНК лекарства (адаптирана по Ai-Ming Yu, Young Hee Choi, and Mei-Juan Tu (3))

Показател	Лекарства неорганични съединения	Нискомолекулни лекарства, органични съединения	Лекарства протеини	РНК лекарства
Химична характеристика	Молекулно тегло <200 Da; йонни съединения	Молекулно тегло <500 Da; хидрофобни съединения	молекулно тегло >100 kDa; положително заредени (отрицателно заредени) неутрални съединения	Молекулно тегло >7 kDa; отрицателен заряд
Дозов режим	Предимно орално; често ежедневно	Предимно орално; често ежедневно	Основно венозно и подкожно; седмично до месечно	Интравенозно, подкожно, интратекално, интравитреално; седмично до веднъж на всеки 3–6 месеца
ADME/PK свойства	Орална бионаличност	Орална бионаличност	Няма орална бионаличност	Няма орална бионаличност
	Разпределя се във всички органи и тъкани, навлиза в клетките	Разпределя се във всички органи и тъкани, навлиза в клетките	Разпределя се основно в плазмата или извънклетъчните течности, не навлиза в клетките	Разпространява се екстензивно в бъбреците и черния дроб, не навлиза в клетките
	Обикновено не се метаболизира	Метаболизира се от ензими	Катаболизира се екстензивно до пептиди или аминокиселини	Катаболизира се екстензивно от нуклеази до (олиго) нуклеотиди
	Екскретира се предимно в урината	Екскретира се главно в жлъчката и урината	Ограничена екскреция	Ограничена екскреция
Молекулни цели	Протеини	Основно протеини	Протеини	Главно РНК, освен протеините и ДНК
Място на действие и ФД	Екстрацелуларно/интрацелуларно	Екстрацелуларно/интрацелуларно	Екстрацелуларно/мембрани	Предимно интрацелуларно
	Пряка или непряка връзка с ФК в кръвта	Пряка или непряка връзка с ФК в кръвта	Директни или индиректни модели, свързани с ФК в кръвта	По-подходящо за тъканната ФК, докато ФД може да бъде свързана с ФК в кръвта
Безопасност/токсичност	Риск от ефекти извън таргетните места	Риск от ефекти извън таргетните места	Риск от имуногенност	Риск от имуногенност

1. Фармакокинетични предизвикателства

Подобряването на фармакокинетичните свойства на РНК лекарствата има за цел да гарантира, че те са достатъчно стабилни да достигнат до таргетните клетки, преди да бъдат разградени или екскретирани, могат да навлязат в таргетните клетки, да се свържат с вътремолекулните цели и да упражнят своите ефекти (18).

Повишаване на стабилността

Едно от най-важните съображения за успешното прилагане на РНК лекарствата е *in vivo* стабилността на РНК. Тя е доста стабилна в среда без рибонуклеаза (RNase) и в подходящи условия може да се

съхранява при стайна температура в продължение на месеци. Въпреки това непротектираните РНК са силно податливи на разграждане, медирано от RNase в *in vivo* среда, което е ограничение на терапевтичните приложения на РНК молекулите. Съобщава се, че непротектираните siRNA имат кратък полуживот от 6 минути и бърз плазмен клирънс веднага след интравенозно приложение, което води до загуба на тяхната активност (38). Има няколко стратегии за преодоляване на този проблем. При късите РНК химическата модификация е най-често използваният метод за подобряване на стабилността. Най-често се използват 2' нуклеотидни модификации,

които повишават устойчивостта към RNase. Къси РНКи, съставени от 2'-модифицирани нуклеозиди, като 2'-О-метил (2'-ОМе) или 2'-флуоро-2'-дезоксиди (2'-F) нуклеозиди, имат удължен полуживот чрез придобиване на резистентност към ендонуклеазите. Вкарването на фосфоротиоатен гръбнак също подобрява стабилността на РНК, като намалява разграждането и клирънса, медирано от екзонуклеаза. В проучвания са използвани и други модификации на РНК като конюгиране с холестерол или модификации по типа заключена нуклеинова киселина (locked nucleic acid, LNA) за удължаване на серумния полуживот на късите РНК. От друга страна, стратегиите за подобряване на стабилността на IVT mRNA са фокусирани предимно върху структурната модификация на нуклеиновата киселина. Добре известно е, че дължината на поли(а) опашката (poly(A) tail) и включване на 5'- и 3'-UTR, включително и регулаторни последователности, имат важна роля за вътреклетъчната стабилност на mRNA. Също така покриването на РНК с фосфоротиоат може да допринесе за засилване на общата молекулна стабилност (8).

Достигане на РНК лекарствата до целевите клетки

За да се преодолеят бариерите пред безопасното и ефективно доставяне на РНК са разработени т. нар. системи за доставка. Те могат да бъдат с използването на вирусни вектори, така и невирусни системи за доставяне, които предпазват РНК от разграждане, максимизират доставянето до целевните клетки и минимизират експозицията на клетки извън целта. Редица фактори ограничават използването на вирусните генни терапии като съществуващ имунитет, индуцирана от вирусите имуногенност, нежелана геномна интеграция, ограничения на размера на полезния товар, невъзможност за повторно дозиране, усложнения, свързани с увеличаване на размера, и скъпо векторно производство. Едновременният напредък в разработването на синтетични материали, които капсулират РНК, като полимери, липиди и липидни наночастици (ЛНЧ), даде тласък на изследванията на невирусни базирани системи за доставяне. Това доведе до одобрението от FDA за подкожно приложение на N-ацетилгалактозамин (GalNAc)-siRNA конюгати, които са насочени към хепатоцитите, интравенозно прилагани ЛНЧ-базирани siRNA лекарства, които са насочени към хепатоцитите, и разрешение за спешна употреба и одобрение от FDA за интрамускулно прилагани ЛНЧ-базирани mRNA COVID ваксини (39). ЛНЧ са едни от най-широко използваните системи за доставка

на РНК лекарствата. Поради добрата си биосъвместимост и същата структура като на клетъчната мембрана те могат да удължат времето на действие на лекарството, да намалят токсичността и да подобрят неговата стабилност (18,40). Одобрените от FDA ЛНЧ съдържат вариации на четири основни компонента: катионен или йонизиращ се липид, холестерол, помощен липид и поли(етилен гликол) (PEG)-липид (39). Но ЛНЧ често са хетерогенни по отношение на натоварването и състава на частиците и поради това могат да станат нестабилни и да се дезинтегрират, причинявайки токсичен имунен отговор в организма. Също така ЛНЧ се натрупват в големи количества в черния дроб, което не им позволява да достигнат до други органи. Следователно от решаващо значение е да се подобри системата на ЛНЧ и да се разработят нови средства и начини за доставка до целевните органи (18).

Избягване на РНК лекарствата от разграждането от ендозомите

Клетъчната мембрана е основна бариера за прилагането на РНК лекарствата. В резултат на това избягването на ендозомите се превръща в голямото предизвикателство, което терапията с РНК лекарства трябва да преодолее (18). За разлика от лекарствата с малки молекули, които пасивно дифундират през липидния двоен слой на клетъчната мембрана, РНК лекарствата са твърде големи, твърде заредени и/или твърде хидрофилни, за да дифундират пасивно през клетъчната мембрана и вместо това се поемат в клетките чрез ендоцитоза (41). Носителят на РНК терапевтика и част от клетъчната мембрана се сглобяват в ендозоми, които след това прерастват в зрели лизозоми, които имат голям брой ензими и киселини, с което ще разрушат РНК лекарствата и ще ги инактивират (18). Това води до т. нар. ендозомално улавяне и задържане на 99% от РНК терапевтиците и 1% или по-малко навлизане в цитоплазмата (т. нар. ендозомално бягство) (41). Въпреки много ниското ниво ендозомалното бягство се оказва достатъчно при лечението на чернодробни заболявания и някои нарушения на ЦНС, но е недостатъчно за терапевтичен ефект при по-голямата част от екстрахепаталните заболявания. Няколко подхода са предложени за преодоляване на проблема с ендозомалното бягство като: използване на ендолитични вещества, които ще разрушат ендозомите; включване на катионни пептиди и свързани с тях синтетични пептидомиметици за подобряване на ендозомалното освобождаване на РНК лекарствата; използването на производни на токсини от насекоми и вируси. За съжаление понастоящем няма приемливи решения на

проблема с ендозомалното бягство. Следователно, преди РНК терапевтиците да могат да се използват за лечение на широко разпространени заболявания, проблемът с ендозомалното бягство трябва да бъде решен (41).

2. Фармакодинамични предизвикателства

РНК лекарствата трябва да преодолеят и предизвикателства като таргетна специфичност, РНК активност извън желаната цел, имуногенност и токсичност. Извършени са множество изследвания за подобряване на таргетната специфичност, включително конюгиране на антитела към siRNAs, свързване на GalNAc към края на прекурсорните siRNAs, за да се улесни тяхното точно доставяне към черния дроб (42,43). Свързани с CRISPR Marinitoga piezophila Argonaute-gRNA комплекси (MrAgo RNP), възстановени in vitro с помощта на 5-бромометил-2'-дезоксигуанидин (BrdU), до голяма степен повишават специфичността и афинитета на лекарствата към таргетните тъкани (44).

Наблюдава се два вида токсичност на РНК лекарствата. Едната е фармакодинамична токсичност, която се причинява от неправилно насочване и действие върху нетаргетни гени. Другият вид е резултат от взаимодействие на лекарствата с други молекули, например протеини. Те генерират повечето нежелани ефекти, главно активиране на комплекса, имунна стимулация, удължаване времето на

коагулация, чернодробна и бъбречна токсичност и летални хемодинамични промени (18).

Кандидатите за siRNA медикаменти, конюгирани с GalNAc, са показали в много клинични проучвания, че са токсични за черния дроб. Златев и сътр. са създали девет полимера от пет заключени нуклеинови киселини (LNA), наречен REVERSIR, който повишава терапевтичния ефект на дълго действащите GalNAc-siRNA и намалява тяхната хепатотоксичност (45).

Присъщата имуногенност на mRNA, въпреки че повишава ефикасността, когато се използва като ваксина, възпрепятства използването ѝ като терапевтично средство, което изисква много по-високо ниво на протеинова експресия. Едно от предизвикателствата при хроничното дозиране на mRNA е как да се поддържа стабилно производството на протеин с всяка доза, доставена в продължение на няколко години. Повечето хронични протеинови терапии губят ефикасност с прогресивно нарастване на антителата срещу протеина или срещу доставящото средство. При проучвания върху мишки на mRNA доставяна с PEG-LNPs, се наблюдава слабо или никакво намаление на протеиновите нива след 3–6-месечно хронично лечение. Някои проучвания обаче откриват антитела срещу лекарствата след многократно дозиране, което показва необходимостта от внимателен избор на режима на прилагане (46).

Табл. 2. Одобрени от FDA и ЕМА лекарства (източници: www.fda.gov и www.ema.europa.eu)

Лекарство	Показания и приложение	Механизъм на действие	Одобрение от FDA / ЕМА
ASO			
Fomivirsen (Vitravene) (47,48)	Цитомегаловирусен (CMV) ретинит при имунокомпрометирани пациенти, вкл. СПИН. Първо одобрено антисенс лекарство. Прилага се интравитреално	Блокира транслацията на вирусна mRNA чрез свързване към комплементарната последователност на mRNA, транскрибирана от сегмент на ключов CMV ген UL123, който кодира CMV протеина IE2	Одобен от FDA през август 1998 г. Novartis го оттегля в ЕС (2002) и в САЩ (2006), тъй като първоначално е имало голяма нужда от лекарства за лечение на CMV при СПИН, развитието на HAART драстично намалява броя на случаите на CMV
Mipomersen (Kynamro) (49,50)	Хомозиготна фамилна хиперхолестеролемия. Прилага се подкожно	Свързва се с mRNA, кодираща аполипопротеин В-100 (APOB-100), основен компонент на липопротеините с ниска плътност (LDL) и липопротеините с много ниска плътност (VLDL). В резултат на това mRNA се разгражда от ензима рибонуклеаза H, а APOB-100 не се транслира. Достига най-високи нива в плазмата след 3 до 4 часа. Натрупва се в черния дроб, което е удобно, тъй като аполипопротеин В действа предимно там. Свързва се с плазмените протеини над 90%. Бавно се разгражда от ендонуклеази и впоследствие от екзонуклеази. След 24 часа по-малко от 4% от метаболитите се откриват в урината, а общият полуживот е от 1 до 2 месеца.	Отхвърлен от ЕМА през 2012 г. и отново през 2013 г. поради опасения за чернодробни и сърдечносъдови нежелани ефекти. FDA одобрява Mipomersen през януари 2013 г.

<p>Nusinersen (Spinraza) (51,52)</p>	<p>Спинална мускулна атрофия (SMA), нервно-мускулно заболяване, свързано с мутация в SMN1 гена. Прилага се директно в централната нервна система чрез интратекално инжектиране</p>	<p>При SMA липсва протеин, наречен протеин на „моторен неврон за оцеляване“ (SMN), който е необходим за нормалното функциониране на моторните неврони. SMN протеинът се кодира от два гена, SMN1 и SMN2. При SMA липсва генът SMN1, но е налице генът SMN2, който произвежда предимно към SMN протеин, който не работи така добре, както протеинът с пълна дължина. Spinraza позволява на SMN2 гена да произвежда протеин с пълна дължина, който е в състояние да работи нормално. Той заменя липсващия протеин и по този начин облекчава симптомите на SMA. В клиничните изпитвания лекарството спира прогресията на заболяването при ~60% от бебетата, засегнати от SMA тип 1, като подобрява двигателната функция. Има полуживот от 135 до 177 дни в цереброспинална течност и 63 до 87 дни в плазмата. Метаболизира се чрез екзонуклеаза (3'- и 5'-) медирана хидролиза и не взаимодейства с ензимите CYP450. Основният път на елиминиране вероятно е чрез отделяне с урината</p>	<p>Одобрен от FDA през декември 2016 г. и от ЕМА през май 2017 г.</p>
<p>Eteplirsen (Exondys 51) (53,54)</p>	<p>Някои форми мускулна дистрофия тип Дюшен (DMD). Eteplirsen е насочен само към специфични мутации и може да се използва за лечение на 14% от случаите на DMD. Прилага се чрез интравенозна инфузия веднъж седмично</p>	<p>DMD се наблюдава, когато при мутация в DMD гена се променя DMD mRNA, така че тя вече не кодира функционалния протеин дистрофин и се въвежда преждевременен стоп кодон в tRNA. Ако екзонът с подходящ брой бази се намира в близост до мутацията, чрез отстраняване на дефектния екзон рамката за четене надолу по веригата може да бъде коригирана и да се възстанови производството на частично функционален протеин. Eteplirsen задейства изрязването на екзон 51 по време на сплайсирането на пре-mRNA на протеина и води до производство на функционален (макар и модифициран чрез вътрешна делеция, състояща се както от първоначалния дефект на пациента, така и от терапевтично пропуснатия екзон) протеин дистрофин. Има неутрален заряд, който го прави устойчив на разграждане. Чрез увеличаване на количеството на модифициран, но потенциално функционален протеин дистрофин, целта е да се забави или предотврати прогресията на DMD. Не се метаболизира от чернодробните микrozоми. Около две трети се екскретира чрез бъбреците в рамките на 24 часа след интравенозно приложение. Елиминационен полуживот (T1/2) е 3 до 4 часа</p>	<p>През 2016 г. FDA одобрява Eteplirsen, но ЕМА отказва да разреши употреба в ЕС</p>
<p>Inotersen (Tegsedi) (55)</p>	<p>Полиневропатия стадий 1 или 2 при възрастни с наследствена транстиретинова амилоидоза (hATTR). Прилага се подкожно, веднъж седмично</p>	<p>Inotersen е 2'-O -2-метоксиетил (2'-МОЕ) фосфоротиоат антисенс олигонуклеотид (АСО) инхибитор на производство на човешкия транстиретин (ТТР). Свързва се селективно към TTR mRNA и води до разграждането както на мутантната, така и на див тип (нормална) TTR mRNA. Това предотвратява синтеза на TTR протеин в черния дроб, което води до значително намаляване на нивата на мутиралния и дивия тип TTR протеин, секретирани от черния дроб в кръвообращението. Свързва се в голяма степен с човешкия плазмен протеин (>94%). Не подлежи на метаболизъм като субстрат на CYP450 и се метаболизира в тъканите чрез ендонуклеази. Елиминирането включва както метаболизма в тъканите, така и екскрецията в урината. След подкожно приложение елиминационният полуживот е приблизително 1 месец</p>	<p>През 2018 г. е одобрен за употреба от FDA и ЕМА</p>

Golodirsen (Vyondys 53) (56)	DMD при пациенти с потвърдена мутация на гена за протеина дистрофин с пропускане на екзон 53. Прилага се веднъж седмично чрез венозна инфузия	Свързва се с екзон 53 на пре-m-RNA за дистрофин, което води до изключване на този екзон по време на транслацията на mRNA при пациенти с генетични мутации. Пропускането на екзон 53 води до производството на променен дистрофинов протеин. В плазмата или урината не са открити метаболити. Екскретира се непроменен с урината. Елиминационният полуживот е 3–4 часа	Одобрен от FDA през декември 2019 г., не е одобрен за употреба от EMA
Milasen (57)	Болестта на Batten	Миласен „остава лекарство в процес на изпитване и не е подходящо за лечение на други пациенти с болестта на Batten“, тъй като е персонализиран за специфична мутация на един пациент. Това е пример за индивидуализирана терапевтична интервенция на геномната медицина	Индивидуализирано лекарство, одобрено от FDA през 2019 г.
Casimersen (Amondys 45) (58)	DMD Прилага се веднъж седмично чрез венозна инфузия	Свързва се с екзон 45 на пре-m-RNA за дистрофин, което води до изключване на този екзон по време на транслацията на mRNA. Пропускането на екзон 45 води до производството на променен дистрофинов протеин. Метаболитно стабилен, не са открити метаболити в плазма или урина. Екскретира се непроменен в урината (90%)	Одобрено от FDA през 2021 г.
siRNA			
Patisiran (Onpattro) (59)	Наследствена транстретин-свързана амилоидоза (hATTR амилоидоза) при възрастни с полиневропатия стадий 1 или стадий 2. Прилага се чрез интравенозна инфузия веднъж на всеки 3 седмици	siRNA, специфично насочена към генетично запазена секвенция в 3' нетранслирания участък на всички TTR mRNA - вариантни и от „див“ тип. Patisiran е включен в липидни наночастици за доставяне на siRNA до хепатоцитите. Чрез естествен процес, наречен РНК интерференция (RNAi), Patisiran причинява каталитично разграждане на TTR mRNA в черния дроб, което води до намаляване на серумния TTR. Свързва се в ниска степен с плазмените протеини, метаболизира се чрез нуклеази до нуклеотиди с различна дължина. Не е инхибитор или индуктор на цитохром P450 изоензимите или транспортерите, с изключение на CYP2B6	Одобрен за употреба от FDA и EMA през август 2018 г.
Givosiran (Givlaari) (60)	Остра чернодробна порфирия (acute hepatic porphyria, AHP) при пациенти ≥ 12 години. Прилага се подкожно веднъж месечно	siRNA, която разгражда аминоклевулинова киселина синтазата 1 (ALAS1) на информационна рибонуклеинова киселина (mRNA) в хепатоцитите чрез РНК интерференция и води до намаляване на индуцираната чернодробна ALAS1 mRNA към нормални стойности. Това води до намаляване на нивата на невротоксичните междинни вещества аминоклевулинова киселина и порфобилиноген, които са ключови за пристъпите и болестните прояви на AHP. Да се внимава по време на употреба на лекарства субстрати на CYP1A2 или CYP2D6, тъй като Givosiran може да увеличи или удължи техния терапевтичен ефект или да промени профилите им на безопасност. След подкожно приложение се абсорбира бързо до максималната плазмена концентрация 0,5 до 2 часа. Свързва се над 90% с плазмените протеини. Метаболизира се от нуклеази до олигонуклеотиди с по-малка дължина	Одобрен за приложение от FDA (2018) и EMA (2020)

Lumasiran (Ox-lumo) (61)	Първична хипероксалурия тип 1 (PH1) във всички възрастови групи. Прилага се подкожно, с натоварващи дози, прилагани веднъж месечно за 3 дози, последвани от поддържаща доза всеки месец	siRNA, която понижава нивата на ензима гликолат оксидаза (GO) чрез насочване срещу информационната рибонуклеинова киселина (mRNA) на гена на хидрокси киселата оксидаза 1 (HAO1) в хепатоцитите чрез РНК интерференция. Понижените нива на GO намаляват количеството на наличния глиоксилат - субстрат за производството на оксалати. Това води до понижаване на нивата на оксалатите в урината и плазмата. Тъй като GO се синтезира вследствие на дефицита на ензима аланин-глиоксилат аминотрансфераза (AGT), който причинява PH1, механизмът на действие на Lumasiran е независим от основната мутация на гена AGXT. Свързва се с протеините в умерена до висока степен (77 до 85%), метаболизира се чрез ендо- и екзонуклеази и се елиминира от плазмата предимно чрез чернодробен ъптейк. Не е субстрат или инхибитор на цитохром P450 ензимите	Одобрен за употреба от ЕМА и FDA през ноември 2020 г.
Inclisiran (Leqvio) (62)	Възрастни с първична хиперхолестеролемия (хетерозиготна фамилна и нефамилна) или смесена дислипидемия. Прилага се като еднократна подкожна инжекция: начална доза, отново на 3-тия месец, след което на всеки 6 месеца.	siRNA, конюгирана по кодиращата верига с триантенен N-ацетилгалактозамин (N-acetylgalactosamine, GalNAc) за улесняване на ъптейка от хепатоцитите. В хепатоцитите Inclisiran използва РНК интерференция механизъм и насочва каталитичното разпадане на mRNA, кодираща пропротеин конвертаза субтилизин/кексин тип 9 (PCSK9). Това увеличава рециклирането и експресията на LDL-C рецепторите върху повърхността на хепатоцитите, което повишава ъптейка на LDL-C и понижава нивата на LDL-C в кръвообращението. Свързва се 87% с протеини, привидният обем на разпределение е приблизително 500 литра. Inclisiran има висок ъптейк и селективност по отношение на черния дроб, който е прицелният орган при понижаване на холестерола. Метаболизира се предимно чрез нуклеази до неактивни нуклеотиди. Не е субстрат на обичайните лекарствени транспортери и на цитохром P450	Одобрен за приложение от ЕМА (2020) и FDA (2021)
Vutrisiran (Amvuttra) (63)	Наследствена транстиретин-свързана амилоидоза (hereditary transthyretin-mediated amyloidosis, hATTR) при възрастни с полиневропатия стадий 1 или стадий 2. Прилага се подкожно веднъж на всеки 3 месеца	siRNA специфично насочена към вариантен и див тип транстиретин (TTR) информационна РНК (mRNA) и е ковалентно свързана с лиганд-съдържащи три N - ацетилглюкозаминови (GalNAc) остатъка, за да позволи доставяне на siRNA до хепатоцитите. Чрез РНК интерференция (RNAi) води до каталитично разграждане на TTR mRNA в черния дроб, което води до намаляването на серумните нива на TTR протеина от вариантен и див тип. Абсорбира се бързо с T _{max} 3 часа. Свързва се с плазмените протеини в над 80%. Метаболизира се чрез ендо- и екзонуклеази до къси нуклеотидни фрагменти. Няма циркулиращи метаболити.	Одобрен за употреба от FDA през юни 2022 г. и от ЕМА през септември 2022 г.
Аптамери			
Pegaptanib (Macugen) (64)	Неоваскуларна (влажна) възрастово-обусловена дегенерация на макулата (ВДМ). Прилага се интравитреално.	Пегилиран модифициран олигонуклеотид, който се свързва във висока степен на специфичност и афинитет с екстрацелуларния съдов ендотелен растежен фактор (VEGF165), инхибирайки неговата активност. VEGF е секреторен протеин, който индуцира ангиогенезата, съдовия пермеабилитет и възпалението, които допринасят за прогресията на ВДМ	Първоначално е одобрен от FDA (2004) и ЕМА (2005), но през 2022 г. е оттеглен от пазара

mRNA ваксини			
Pfizer–BioNTech COVID-19 ваксина tozinameran, търговско име Comirnaty (65)	За активна имунизация за превенция на COVID-19, причинено от SARS-CoV-2, на лица на възраст 12 и повече години	Едноверижна, 5'-кепирана mPHK, произведена с използване на безклетъчна <i>in vitro</i> транскрипция от съответните ДНК-матрици, кодиращи вирусния S (spike) протеин на SARS-CoV-2. Нуклеозидно модифицираната mRNA е под формата на липидни наночастици, което позволява доставянето на нереплицираща се RNA в клетките гостоприемници, за да насочи преходната експресия на S антигена на SARS-CoV-2. mRNA кодира мембранно закотвен, пълноверижен S протеин с две точкови мутации в централната част на спиралата. Мутацията на тези две аминокиселини до пролин стабилизира S протеина в антигенно предпочитана префузионна структура. Ваксината предизвиква както производство на неутрализиращи антитела, така и клетъчен имуноен отговор към S антигена, което може да допринесе за защита срещу COVID-19 (65)	Emergency use authorization FDA - ноември 2020 г., EMA – декември 2020 г.
Moderna COVID-19 ваксина elasmomeran, търговско име Spikevax (66)	За активна имунизация за превенция на COVID-19, причинен от SARS-CoV-2, при лица на 6 и повече месеца. Интрамускулно приложение	mRNA, включена в липидни наночастици. mRNA кодира пълноверижен шипов протеин на SARS-CoV-2, модифициран с 2 пролинови замествания в областта на хептадното повторение 1 (S-2P), за стабилизиране на шиповия протеин в префузионна конформация. След приложение клетките на мястото на инжектиране и дрениращите лимфни възли поемат липидните наночастици, като ефективно доставят mRNA секвенцията в клетките за транслация във вирусен протеин. Доставената mRNA не навлиза в клетъчното ядро и не взаимодейства с генома, не се репликира и се експресира временно основно в дендритни клетки и макрофаги в субкапсуларните синуси. Експресираният, свързан с мембраната шипов протеин на SARS-CoV-2 се разпознава след това от имунните клетки като чужд антиген. Това предизвиква както Т-клетъчен, така и В-клетъчен отговор с образуване на неутрализиращи антитела, което може да допринесе за защитата срещу COVID-19	Emergency use authorization FDA - декември 2020 г., EMA - януари 2021 г.

PHK лекарства, одобрени от Администрацията по храните и лекарствата на САЩ (FDA) и Европейската агенция за лекарства (EMA)

В табл. 2 по-долу правим кратък преглед на вече одобрените от FDA и EMA лекарства, които се използват в клиничната практика, като се фокусираме на индикациите и фармакологичните характеристики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

PHK терапията могат да имат терапевтичен потенциал при наследствени, онкологични, неврологични заболявания и болести на обмяната. PHK терапията могат да предоставят по-добри възможности за насочване към патофизиологичните механизми на тези заболявания, което може да доведе до по-добри резултати за пациентите. Към настоящия момент няколко PHK лекарства вече са одобрени от FDA и EMA и се използват в клиничната практика.

Много повече са кандидат-лекарствата в различни фази на клинични изпитвания, демонстриращи потенциала на такива PHK терапии за различни заболявания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dahm R, Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol.* 2005;278(2):274-288. doi:10.1016/j.ydbio.2004.11.028
2. Cobb M. Who discovered messenger RNA? *Curr Biol.* 2015;25(13):R526-R532. doi:10.1016/j.cub.2015.05.032
3. Yu A-M, Choi YH, Tu M-J. RNA Drugs and RNA Targets for Small Molecules: Principles, Progress, and Challenges. *TOUYZ RM*, ed. *Pharmacol Rev.* 2020;72(4):862-898. doi:10.1124/pr.120.019554
4. De Mey W, Esprit A, Thielemans K, Breckpot K, Franceschini L. RNA in Cancer Immunotherapy: Unlocking the Potential of the Immune System. *Clin Cancer Res.* 2022;28(18):3929-3939. doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-3304
5. Damase TR, Sukhovshin R, Boada C, Taraballi F, Pettigrew RI, Cooke JP. The Limitless Future of RNA Therapeutics. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9. doi:10.3389/fbioe.2021.628137

6. Dammes N, Peer D. Paving the Road for RNA Therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* [Internet] 2020 Oct;41(10):755–75. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614720301851>nds *Pharmacol Sci*. 2020;41(10):755-775. doi:10.1016/j.tips.2020.08.004
7. Kim Y-K. RNA therapy: rich history, various applications and unlimited future prospects. *Exp Mol Med*. 2022;54(4):455-465. doi:10.1038/s12276-022-00757-5
8. Shin H, Park S-J, Yim Y, et al. Recent Advances in RNA Therapeutics and RNA Delivery Systems Based on Nanoparticles. *Adv Ther*. 2018;1(7):1800065. doi:10.1002/adtp.201800065
9. Ghanbarian H, Aghamiri S, Eftekhary M, Wagner N, Wagner K-D. Small Activating RNAs: Towards the Development of New Therapeutic Agents and Clinical Treatments. *Cells*. 2021;10(3):591. doi:10.3390/cells10030591
10. Zogg H, Singh R, Ro S. Current Advances in RNA Therapeutics for Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022;23(5):2736. doi:10.3390/ijms23052736
11. Youn H, Chung J-K. Modified mRNA as an alternative to plasmid DNA (pDNA) for transcript replacement and vaccination therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(9):1337-1348. doi:10.1517/14712598.2015.1057563
12. Magadum A, Kaur K, Zangi L. mRNA-Based Protein Replacement Therapy for the Heart. *Mol Ther*. 2019;27(4):785-793. doi:10.1016/j.ymthe.2018.11.018
13. Versteeg L, Almutairi MM, Hotez PJ, Pollet J. Enlisting the mRNA Vaccine Platform to Combat Parasitic Infections. *Vaccines*. 2019;7(4):122. doi:10.3390/vaccines7040122
14. Qin S, Tang X, Chen Y, et al. mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):166. doi:10.1038/s41392-022-01007-w
15. Sahin U, Oehm P, Derhovanessian E, et al. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature*. 2020;585(7823):107-112. doi:10.1038/s41586-020-2537-9
16. Van Hoecke L, Roose K. How mRNA therapeutics are entering the monoclonal antibody field. *J Transl Med*. 2019;17(1):54. doi:10.1186/s12967-019-1804-8
17. Dammes N, Peer D. Paving the Road for RNA Therapeutics. *Trends Pharmacol Sci*. 2020;41(10):755-775. doi:10.1016/j.tips.2020.08.004
18. Liang X, Li D, Leng S, Zhu X. RNA-based pharmacotherapy for tumors: From bench to clinic and back. *Biomed Pharmacother*. 2020;125:109997. doi:10.1016/j.biopha.2020.109997
19. Dhuri K, Bechtold C, Quijano E, et al. Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *J Clin Med*. 2020;9(6):2004. doi:10.3390/jcm9062004
20. Crooke ST. Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther*. 2017;27(2):70-77. doi:10.1089/nat.2016.0656
21. Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, et al. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci*. 2017;13(2):48-57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28824341>
22. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9):597-610. doi:10.1038/nrg2843
23. Chekulaeva M, Filipowicz W. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(3):452-460. doi:10.1016/j.ceb.2009.04.009
24. Cammaerts S, Strazisar M, De Rijk P, Del Favero J. Genetic variants in microRNA genes: impact on microRNA expression, function, and disease. *Front Genet*. 2015;6. doi:10.3389/fgene.2015.00186
25. Palmero EI, Campos SGP de, Campos M, et al. Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. *Genet Mol Biol*. 2011;34(3):363-370. doi:10.1590/S1415-47572011000300001
26. MacLeod AR, Crooke ST. RNA Therapeutics in Oncology: Advances, Challenges, and Future Directions. *J Clin Pharmacol*. 2017;57:S43-S59. doi:10.1002/jcph.957
27. Si W, Shen J, Zheng H, Fan W. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clin Epigenetics*. 2019;11(1):25. doi:10.1186/s13148-018-0587-8
28. Sun H, Zhu X, Lu PY, Rosato RR, Tan W, Zu Y. Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2014;3:e182. doi:10.1038/mtna.2014.32
29. Germer K, Leonard M, Zhang X. RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications. *Int J Biochem Mol Biol*. 2013;4(1):27-40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638319>
30. Sheng L, Rigo F, Bennett CF, Krainer AR, Hua Y. Comparison of the efficacy of MOE and PMO modifications of systemic antisense oligonucleotides in a severe SMA mouse model. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(6):2853-2865. doi:10.1093/nar/gkaa126
31. Pastor F. Aptamers: A New Technological Platform in Cancer Immunotherapy. *Pharmaceuticals*. 2016;9(4):64. doi:10.3390/ph9040064
32. Han J, Gao L, Wang J, Wang J. Application and development of aptamer in cancer: from clinical diagnosis to cancer therapy. *J Cancer*. 2020;11(23):6902-6915. doi:10.7150/jca.49532
33. Ni S, Yao H, Wang L, et al. Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1683. doi:10.3390/ijms18081683
34. Kumar Kulabhusan P, Hussain B, Yüce M. Current Perspectives on Aptamers as Diagnostic Tools and Therapeutic Agents. *Pharmaceutics*. 2020;12(7):646. doi:10.3390/pharmaceutics12070646
35. Dowdy SF. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. *Nat Biotechnol*. 2017;35(3):222-229. doi:10.1038/nbt.3802
36. Titze-de-Almeida R, David C, Titze-de-Almeida SS. The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. *Pharm Res*. 2017;34(7):1339-1363. doi:10.1007/s11095-017-2134-2
37. Li K, Luo H, Huang L, Luo H, Zhu X. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int*. 2020;20(1):16. doi:10.1186/s12935-019-1091-8
38. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 2004;432(7014):173-178. doi:10.1038/nature03121
39. Paunovska K, Loughrey D, Dahlman JE. Drug delivery systems for RNA therapeutics. *Nat Rev Genet*. 2022;23(5):265-280. doi:10.1038/s41576-021-00439-4
40. Ickenstein LM, Garidel P. Lipid-based nanoparticle formulations for small molecules and RNA drugs. *Expert Opin*

- Drug Deliv. 2019;16(11):1205-1226. doi:10.1080/17425247.2019.1669558
41. Dowdy SF. Endosomal escape of RNA therapeutics: How do we solve this rate-limiting problem? RNA. 2023;29(4):396-401. doi:10.1261/rna.079507.122
 42. Matsuda S, Keiser K, Nair JK, et al. siRNA Conjugates Carrying Sequentially Assembled Trivalent N-Acetylgalactosamine Linked Through Nucleosides Elicit Robust Gene Silencing In Vivo in Hepatocytes. ACS Chem Biol. 2015;10(5):1181-1187. doi:10.1021/cb501028c
 43. Rajeev KG, Nair JK, Jayaraman M, et al. Hepatocyte-Specific Delivery of siRNAs Conjugated to Novel Non-nucleosidic Trivalent N-Acetylgalactosamine Elicits Robust Gene Silencing in Vivo. ChemBioChem. 2015;16(6):903-908. doi:10.1002/cbic.201500023
 44. Lapinaite A, Doudna JA, Cate JHD. Programmable RNA recognition using a CRISPR-associated Argonaute. Proc Natl Acad Sci. 2018;115(13):3368-3373. doi:10.1073/pnas.1717725115
 45. Zlatev I, Castoreno A, Brown CR, et al. Reversal of siRNA-mediated gene silencing in vivo. Nat Biotechnol. 2018;36(6):509-511. doi:10.1038/nbt.4136
 46. Rohner E, Yang R, Foo KS, Goedel A, Chien KR. Unlocking the promise of mRNA therapeutics. Nat Biotechnol. 2022;40(11):1586-1600. doi:10.1038/s41587-022-01491-z
 47. Perry CM, Barman Balfour JA. Fomivirsen. Drugs. 1999;57(3):375-380. doi:10.2165/00003495-199957030-00010
 48. Vitravene. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vitravene>
 49. Kynamro Prescribing information.pdf. Published 2013. https://www.kynamro.com/media/pdfs/Kynamro_Prescribing_information.pdf
 50. Refusal of the marketing authorisation for Kynamro (mipomersen). Published 2013. https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop-initial/questions-answers-refusal-marketing-authorisation-kynamro-outcome-re-examination_en.pdf
 51. Spinraza nusinersen Резюме на EPAR за обществено ползване. Published 2017. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/spinraza-epar-summary-public_bg.pdf
 52. Spinraza КРАТКА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПРОДУКТА. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/spinraza-epar-product-information_bg.pdf
 53. EXONDYS 51 (eteplirsen) Prescribing information. Published 2020. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/206488s019lbl.pdf
 54. Anthony K, Feng L, Arechavala-Gomez V, et al. Exon Skipping Quantification by Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction in Duchenne Muscular Dystrophy Patients Treated with the Antisense Oligomer Eteplirsen. Hum Gene Ther Methods. 2012;23(5):336-345. doi:10.1089/hgtb.2012.117
 55. Tegsedi Кратка характеристика. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tegsedi-epar-product-information_bg.pdf
 56. VYONDYS 53 (golodirsen) prescribing information. Published 2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/211970s002lbl.pdf
 57. Kim J, Hu C, Moufawad El Achkar C, et al. Patient-Customized Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease. N Engl J Med. 2019;381(17):1644-1652. doi:10.1056/NEJMoa1813279
 58. AMONDYS 45 (casimersen) prescribing information. Published 2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/213026lbl.pdf
 59. Onpattro КРАТКА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПРОДУКТА. Published 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/onpattro-epar-product-information_bg.pdf
 60. Givlaari КРАТКА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПРОДУКТА. Published 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/givlaari-epar-product-information_bg.pdf
 61. Oxlumo КРАТКА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПРОДУКТА. Published 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/oxlumo-epar-product-information_bg.pdf
 62. Leqvio КРАТКА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПРОДУКТА. Published 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/leqvio-epar-product-information_bg.pdf
 63. Amvuttra КРАТКА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПРОДУКТА. Published 2022. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/amvuttra-epar-product-information_bg.pdf
 64. Macugen КРАТКА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПРОДУКТА. Published 2015. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/macugen-epar-product-information_bg.pdf
 65. Comirnaty КРАТКА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПРОДУКТА. Published 2022. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/comirnaty-epar-product-information_bg.pdf
 66. Spikevax КРАТКА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПРОДУКТА. Published 2022. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-product-information_bg.pdf

✉ **Адрес за кореспонденция:**
 д-р Иванка Мутаfoва
 Факултет по фармация
 бул. „Цар Освободител“ 150
 Варна, 9002
 e-mail: dr.vmutafova@gmail.com

ORCID: 0000-0001-6464-2828