

**PROPOSTA PROGETTUALE**  
**DOTTORATO IN RNA therapeutics and gene therapy**  
**CICLO XLI\***

**Tutor: Prof.ssa Michela Varra**

**Co-tutor: Prof. Aldo Galeone**

**TITOLO DEL PROGETTO: Nuovi fosforamiditi building block e loro utilizzo per l'ottenimento di aptameri modificati**

**Descrizione del progetto**

Il presente progetto di dottorato ha come obiettivo la sintesi di nuove molecole e la loro derivatizzazione a building block da utilizzare quali analoghi nucleosidici nella sintesi in fase solida automatizzata di acidi nucleici modificati tra cui RNA terapeutici, DNA-aptameri, o chimere DNA/RNA. Gli aptameri saranno in parte selezionati per bersagliare proteine funzionali della matrice o della membrana extracellulare<sup>1,2</sup> coinvolte nello sviluppo e/o nell'eziologia di patologia oncologiche<sup>3,4</sup>, virali<sup>5</sup>, neurodegenerative<sup>6</sup> o infiammatorie<sup>7</sup> (quale esempio l'aptamero bersagliante c-Met, poiché la formazione del complesso c-Met-Aptamero causa una cascata di eventi che si completa con la degradazione di c-Met da parte del proteosoma<sup>4,8,9</sup>).

Gli aptameri modificati conterranno analoghi nucleosidici posizionati strategicamente per: i) modulare la risposta immunitaria innata associata alla somministrazione di acidi nucleici terapeutici<sup>10,11</sup>, attraverso l'analisi delle correlazioni tra la risposta cellulare e le modifiche introdotte; ii) favorire la conformazione bioattiva<sup>12</sup> nel riconoscimento della proteina bersaglio.

A tal fine, il piano sperimentale, articolato in differenti stadi prevede: i) la sintesi di diverse molecole razionalmente progettate per avere specifiche proprietà (ad esempio la fotosensibilità a specifiche radiazioni) e ii) la loro conversione in "phosphoramidite building block", da utilizzare nella sintesi in fase solida automatizzata di acidi nucleici iii) la sintesi di diverse varianti per ciascuno degli aptameri selezionati, ottenute sostituendo residui nucleosidici in specifiche posizioni con i "building block" ottenuti; iv) la caratterizzazione strutturale e biologica delle varianti di ciascun aptamero. Le varianti aptameriche che presenteranno il profilo farmacologico migliore tra quelle della stessa serie saranno selezionate per la preparazione di chimere DNA/RNA. L'utilizzo di opportuni spaziatori permetterà di distanziare propriamente le due sezioni di ac. nucleici, mentre differenti strategie chimiche, inclusa la click-chemistry, consentiranno l'unione tra le due sezioni. Tutte le specie sintetizzate saranno caratterizzate mediante tecniche spettroscopiche (UV, CD, 1 e 2D NMR) e spettrometriche (MS, HRMS) per determinarne la struttura tridimensionale e testate *in vitro* per le loro proprietà biologiche.

## BIBLIOGRAFIA

1. AI, Lili, et al. Tools and techniques for the discovery of therapeutic aptamers: recent advances. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2023, 18.12: 1393-1411.
2. JIANG, Lanyu et al. Aptamer (AS1411)-conjugated liposome for enhanced therapeutic efficacy of miRNA-29b in ovarian cancer. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2020, 20.4: 2025-2031
3. XIANG, Dongxi, et al. Aptamer-mediated cancer gene therapy. *Current gene therapy*, 2015, 15.2: 109-119.
4. CHEN, Kun, et al. Aptamer Inhibits Tumor Growth by Leveraging Cellular Proteasomal Degradation System to Degrade c-Met in Mice. *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 2023, 62.2: e202208451.
5. GOTO, Kaku, et al. Generation of RNA aptamers against chikungunya virus E2 envelope protein. *Journal of Virology*, 2025, e02095-24.
6. LEE, Jung Hoon; LEE, Min Jae. Isolation and Characterization of RNA Aptamers against a Proteasome-Associated Deubiquitylating Enzyme UCH37. *ChemBioChem*, 2017, 18.2: 171-175.
7. IBRAHIM, Sherif Abdelaziz et al. MicroRNA-dependent targeting of the extracellular matrix as a mechanism of regulating cell behavior. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2014, 1840.8: 2609-2620.
8. DI DATO, Antonio, et al. Electrostatic map of proteasome  $\alpha$ -rings encodes the design of allosteric porphyrin-based inhibitors able to affect 20S conformation by cooperative binding. *Scientific reports*, 2017, 7.1: 17098.
9. PERSICO, Marco, et al. Modulation of the 20S Proteasome Activity by Porphyrin Derivatives Is Steered through Their Charge Distribution. *Biomolecules*, 2022, 12.6: 741.
10. NELSON, Jennifer, et al. Impact of mRNA chemistry and manufacturing process on innate immune activation. *Science advances*, 2020, 6.26: eaaz6893.
11. WU, Kai, et al. Variant SARS-CoV-2 mRNA vaccines confer broad neutralization as primary or booster series in mice. *Vaccine*, 2021, 39.51: 7394-7400.
12. ROSENBERG, J. E., et al. (2014). A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma. *Invest New Drugs*, 32, 178-187, doi: 10.1007/s10637-013-0045-6.

## FONDI

PRIN 2022 “Modulating conformational Equilibria of prion protein and proteasome to tune proteostasis network (RESET)”-

\*Per il dottorato *in RNA Therapeutics and gene therapy* selezionare anche una delle seguenti aree tematiche):

- Mechanisms of Diseases and Drug Target Identification
- Design and Delivery of New Gene Therapy and RNA-Based Medicines
- Validation and Safety In Preclinical and Clinical Studies