

DERLEME

RNA Temelli Terapötik Yaklaşımlar

İsmail KORKMAZ, Serdal ARSLAN

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye.

ÖZET

RNA temelli terapötikler, RNA moleküllerinin hücresel süreçlerdeki etki mekanizmalarının aydınlatılması ve gelişen teknoloji ile oldukça yüksek potansiyele sahip terapötik stratejileri oluşturmaktadır. Bu stratejiler, birçok hastalığın mekanizması, patofizyolojik süreçleri, teşhisi, tedavisi ve hastalığın önlenmesi konusunda yeni alternatifler sunmaktadır. Ayrıca daha önce "hedeflenemez" olarak bilinen birçok patofizyolojik yollara yeni kapılar açmaktadır. RNA bazlı terapötiklerin sağladığı çeşitli moleküler bazlı ajanlar sayesinde tedavisi yeterli düzeyde olmayan hastalıklara umut verici yeni tedavi yöntemleri geliştirilebilecektir. Günümüzde bilinen 16 adet FDA onaylı RNA terapötik ilaç klinikte kullanılmaktadır. Bunun yanında çok sayıda RNA terapötüğü geliştirilme aşamasındadır ve bu durum yakın gelecekte birçok hastalık için yeni tedavi yöntemlerine kapı açacaktır. Bu derleme makalesinde kullanılan RNA terapötik stratejilerinin mekanizması, sentezlenmesi, paketlenmesi, hedefe iletimi gibi konular araştırılmıştır ve bunun yanında aday terapötik stratejilere de değinilmiştir.

Anahtar Kelimeler: ASO. Oligonükleotid. RNA. SiRNA. Terapötik.

RNA-Based Therapeutic Approaches

ABSTRACT

RNA-based therapeutics constitute therapeutic strategies with very high potential, thanks to the elucidation of the mechanisms of action of RNA molecules in cellular processes and developing technology. These strategies offer new alternatives regarding the mechanisms, pathophysiological processes, diagnosis, treatment and prevention of many diseases. It also opens new doors to many pathophysiological pathways previously known as "untargetable". Thanks to the various molecular-based agents provided by RNA-based therapeutics, promising new treatment methods can be developed for diseases for which treatment is inadequate. Today, 16 known FDA-approved RNA therapeutic drugs are used in clinics. In addition, many RNA therapeutics are under development, which will open the door to new treatment methods for many diseases in the near future. In this review article, topics such as the mechanism, synthesis, packaging, and target delivery of currently used RNA therapeutic strategies are investigated, and candidate therapeutic strategies are also mentioned.

Keywords: ASO. Oligonucleotide. RNA. SiRNA. Therapeutic.

İnsan genomunun en az %75'i RNA'lara kopyalanır.¹ RNA'lar çok çeşitlidir ve karmaşık birçok fonksiyonları vardır. Bu RNA'lar üç kategoride sınıflandırılırlar (Tablo I). (I) Protein sentezinde görev alan RNA'lar. (II) Düzenleyici RNA'lar, (III) Parazitik RNA'lar. Bazı RNA'lar ise birden fazla kategoride yer alabilir; çünkü tanımlandıkları sınıftan başka bir sınıfta da üstlendikleri roller olduğu görülmüştür.^{2,3} Birçok kodlamayan RNA'nın

(ncRNA) kesin rolleri hala tam olarak bilinmemekte ve aktif olarak araştırılmaktadır.³ Bu ncRNA'ların işlevselliklerinin çeşitli türleri, büyük ölçüde her iki etkileşim ortağının dizisi ve yapısal özellikleri tarafından belirlenen makromoleküllerle etkileşimlerine bağlıdır.³

RNA biyolojisi gelişen teknolojiyle birlikte önemli düzeyde ilerleme göstermiştir ve hala göstermektedir. RNA biyolojisinin bu gelişimi, RNA'nın kimyasal ve biyolojik alanlardaki önemini göstermiş ve tıpta devrim yaratmıştır. Tarih boyunca bu bilimsel keşifler için çok sayıda Nobel ödülü araştırmacılara verilmiştir.⁴⁻¹⁴ RNA biyolojisinde yaşanan devrim, beklenmedik fonksiyonlara, yeni RNA modifikasyon tiplerine, beklenmedik sayıda alternatif transkriptlere, ekstrasenik bölgelerin yaygın transkripsiyonuna ve patofizyolojik süreçlerde önemli rollere sahip yeni RNA sınıflarının tanımlanmasıyla doruk noktasına ulaşmıştır. Bu yeni RNA'ların işlevini taklit eden veya antagonize eden yeni terapötik stratejiler önemli ölçüde artmaktadır.¹⁵ Yakın tarihte keşfedilen ve

Geliş Tarihi: 29.Ocak.2024
Kabul Tarihi: 23.Mayıs.2024

Dr. İsmail KORKMAZ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
Mersin, Türkiye.
Tel: 0534 308 31 58
E-posta: ismailkrkmazz@gmail.com

Yazarların ORCID Bilgileri:
İsmail KORKMAZ: 0000-0003-4631-7786
Serdal ARSLAN: 0000-0002-3921-8061

oldukça ilgi çeken ncRNA'ların tanımlanması, karakterize edilmesi ve mekanizmalarının aydınlatılması ile çok eşsiz fonksiyonlara sahip oldukları anlaşılmaktadır (Tablo I).¹⁶ ncRNA'ların ve özellikle uzun kodlamayan RNA (lncRNA) ve dairesel RNA'ların (circRNA) ortaya çıkardığı zenginlik, RNA bazlı ilaçlar için yeni bir moleküler araç rezervuarı sağlamaktadır.

Son yıllarda yeni tür terapötikler üretmek için RNA tabanlı stratejilerde yeni bir çağ yaşanmaktadır. Bu doğrultuda RNA terapötikleri, geniş bir hastalık yelpazesini önlemek veya tedavi etmek için yeni ve hızla gelişen bir ilaç sınıfıdır.¹⁷ Ayrıca genomdaki ilaç verilebilir hedeflerin aralığını genişletmektedir. RNA yollarını terapötik olarak kullanma girişimleri günümüzde hızla artmakta ve daha önce "hedeflenemez" ya da "ulaşamaz" olarak kabul edilen yollara yeni kapılar açmaktadır.^{14,18} Yeni etkili terapötiklerin geliştirilmesi, bu karşılanmamış büyük ihtiyacı karşılamayı vaat etmektedir.¹⁸ Bunun yanında RNA terapötiklerinin en büyük avantajlarından birisi ise DNA terapötikleri gibi nükleer membrandan geçmek ve konak genomuna entegre olma riski bulundurmamasıdır.¹⁹

RNA terapötikleri genellikle 2 kategoride sınıflandırılmaktadır. Bunlar genleri veya gen ekspresyonunu manipüle ederek, bir mRNA'nın hücrelere istenilen proteinleri üretmesi için verildiği "mRNA terapileri" ve hastalıkların patofizyolojik süreçlerinde rol oynayan hücre RNA'ları, proteinleri veya çeşitli makromolekülleri düzenlemek için hedefe güdümlü sentetik nükleik asitlerin kullanıldığı "Oligonükleotid terapileri"dir.²⁰

mRNA Terapötikleri

mRNA, şablon olarak genomik DNA kullanarak, RNA polimeraz II tarafından kopyalanan ve proteinleri kodlamaya hizmet eden bir RNA'dır.^{21,22} DNA'dan proteine bilgi akışında taşıyıcı görevi gören santral dogmanın orta kısmında yer alır.²³ mRNA'lar tipik olarak ~2 kb uzunluğundadır ve karakteristik olarak 5'CAP, 5'UTR, kodlama bölgesi, 3'UTR ve poly (A) kuyruk içerir. (24) mRNA'nın bir ilaç olarak kullanılmasının arkasındaki kavram, belirli bir hastalık durumunu önleme veya değiştirme amacı için tanımlanmış bir genetik mesajın bir hastanın hücrelerine aktarılmasıdır. mRNA terapileri bilinen bir genetik bileşene sahip hastalıkların tedavisi için mükemmel adaylardır. Geleneksel olarak mRNA'lar belirli bir proteinin ekspresyonundaki eksiklikten kaynaklı hastalıklara replasman tedavisi için kullanılmıştır.²⁵ Terapötik uygulamalar için sentetik mRNA, 1990 yılında in vivo olarak fare kas dokusuna doğrudan enjeksiyon ile uygulanmıştır ve ilgili dokuda eksprese edilebildiği ilk kez gösterilmiştir.²⁶ Bunun ardından mRNA terapötik uygulamaları hem

akademiden hem de endüstriden büyük ilgi görmektedir.²³ Günümüzdeki mRNA uygulamaları enfeksiyon hastalıkları için geliştirilen aşılara, kanser immünoterapisine, genetik mühendisliğine, protein replasman tedavilerine ve mRNA tabanlı gen düzenlemeye kadar genişletilmiştir.^{23,27-34} Gelişen teknolojiyle beraber mRNA terapötiklerinin RNA kararsızlığı, yüksek immünojenite, hedefli teslimat gibi karşılaştığı zorluklar azaltıla bilmektedir ve bu sayede mRNA terapötikleri son yıllarda oldukça ivme kazanmaktadır. Günümüzde az da olsa etkisi devam eden COVID-19 pandemisinde milyarlarca doz uygulanan lipid nanopartikül (LNP) teknolojisi ile hedefe gönderilen mRNA aşılara güvenilirliğini ispatlayarak insanlığa büyük fayda sağlamıştır. Şu anda ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı iki mRNA aşısı bulunmaktadır bu aşılar Pfizer ve BioNTech iş birliğiyle üretilen BNT162b2 ve Moderna tarafından üretilen mRNA-1273 aşısıdır.^{35,36}

İn Vitro Transkript mRNA (İVT mRNA) ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında doğal olarak oluşan olgun ve işlenmiş mRNA'ya yapısal olarak benzeyecek şekilde tasarlanmaktadır. İVT mRNA tek sarmallıdır, 5'CAP ve 3'Poly (A) kuyruğa sahiptir. İlgili proteini kodlayan açık okuma çerçevesi (ORF), start ve stop kodonları tarafından işaretlenir ve UTR bölgeleri tarafından kuşatılır.³⁷ İVT mRNA, doğrusallaştırılmış bir plazmit veya bir PCR ürünü gibi bir DNA şablonundan in vitro transkripsiyon yoluyla hücrede bir sistemde sentezlenir. 5'CAP hariç, bu DNA şablonu, işlevsel bir mRNA'nın tüm yapısal öğelerini kodlar. İn vitro transkripsiyon, nükleotitlerin varlığında T7 veya SP6 RNA polimeraz ile gerçekleştirilir ve ardından mRNA, enzimatik olarak CAPlenir. Şablon DNA daha sonra DNazlar tarafından parçalanır ve mRNA'lar izole edilir. Bu işlem için geleneksel olarak kullanılan mRNA izolasyon yöntemleri kullanılabilir.^{32,37,38}

Çekirdekte üretilen ve nükleer transfer yoluyla sitoplazmaya giren doğal mRNA'nın aksine, İVT mRNA'nın hücre dışı matriksten sitoplazmaya girmesi gerekir. İVT mRNA'nın hücrelere in vitro veya in vivo iletilmesinden bağımsız olarak, sitoplazmik biyoyararlanımını iki temel faktör belirler. Biri, hücre dışı matrikste oldukça bol miktarda ve aktif olarak bulunan RNazlar tarafından hızlı degradasyondur. Diğeri, negatif yüklü büyük mRNA molekülünün sitoplazmaya pasif difüzyonunu engelleyen hücre membranıdır. Prensip olarak, ökaryotik hücreler aktif olarak çıplak mRNA'yı fagosite etme yeteneğine sahiptir. Bununla birlikte, çoğu hücre tipinde alım hızı ve sitoplazmik transfer minimumdur. Hücrelerin transfeksiyonu, İVT mRNA'yı, ve mRNA'yı RNazlar tarafından bozunmaya karşı koruyan ve aynı zamanda hücre alımı için kolaylaştırıcılar olarak işlev gören kompleks oluşturucu maddelerle formüle ederek geliştirilebilir. İVT mRNA sitoplazmaya girdikten

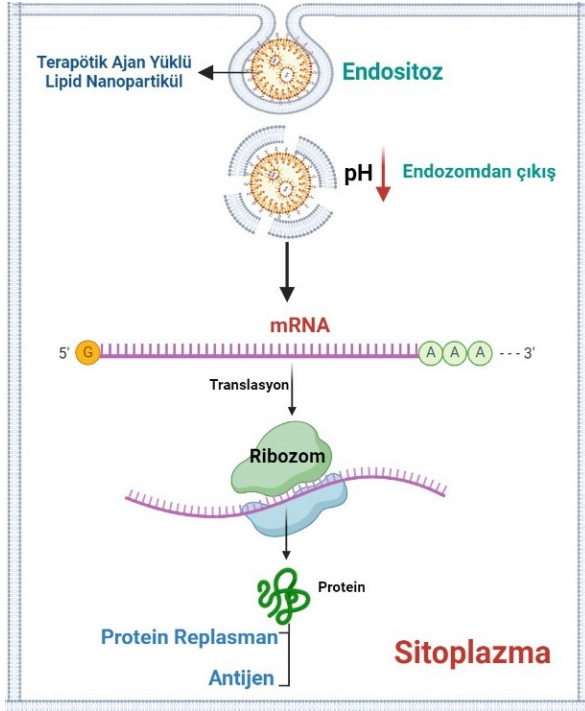
Tablo I. Günümüzde bilinen RNA'ların sınıflandırılması ve işlevleri. (3)

Kategori	RNA Adı	Alt Kategori	İşlevleri
Protein Sentezinde Görev Alan RNA'lar	Mesajcı RNA (mRNA)	Protein sentezi	Genetik bilgiyi DNA'dan RNA ve RNA'ya iletir.
	Taşıyıcı RNA (tRNA)	Protein sentezi	Genetik bilgiyi mRNA'dan proteine iletir.
	Ribozomal RNA (rRNA)	Protein sentezi	Protein sentezinin gerçekleştirilmesini sağlar.
	Küçük nükleer RNA (snRNA)	RNA olgunlaşması	Çekirdekte pre-mRNA işlenmesi, intron splyası, lezner bakımı ve transkripsiyon faktörleri düzenlenmesi.
	Ribonükleaz P (RNase P)	RNA olgunlaşması	rRNA ve tRNA olgunlaşması.
	Ribonükleaz MRP (RNase MRP)	RNA olgunlaşması	rRNA olgunlaşması ve mitokondriyal DNA replikasyonu.
	Küçük nükleolar RNA (snoRNA)	RNA olgunlaşması	rRNA ve snRNA modifikasyonu, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, diğer RNA'ları kovalent modifikasyonları, RNA splyası, stres tepkisi ve metabolik homeostaz.
	Mikro RNA (miRNA)	Kısa kodlamayan RNA	Post-transkripsiyonel mRNA'yı degrade ederek gen ekspresyonuna müdahale etmek, RNA susturma, Hücre çoğalması ve ölümü, immün sistemin gelişimi ve işlevi, hematopoetik farklılaşma ve püsanetal gelişim.
	Kısa ifrikale RNA (siRNA)	Kısa kodlamayan RNA	Post-transkripsiyonel mRNA'yı degrade ederek gen ekspresyonuna müdahale etmek ve RNA susturma.
	Küçük entererans yapan RNA (siRNA)	Kısa kodlamayan RNA	Post-transkripsiyonel mRNA'yı degrade ederek gen ekspresyonuna müdahale etmek ve RNA susturma.
Düzenleyici RNA'lar	Piwi ilişkili RNA (piRNA)	Kısa kodlamayan RNA	Germline hücrelerinde retrotranspozonları ve diğer genetik elementleri susturma, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, genom bütünlüğünün korunması.
	Zantisens RNA (aRNA)	Kısa kodlamayan RNA	Çoklu bilyojik enjeksiyonları gerçekleştirme için çeşitli transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel gen düzenleyici mekanizmaları kullanan diğer transkriptlere eşlenme özelliğine sahip endojen RNA'lar.
	Enhancer RNA (eRNA)	Nispeten kısa kodlamayan RNA	Enhancer bölgelerinde kopulanan kısa ncRNA molekülleri, transkripsiyonel düzenlemeye aktif olarak rol oynar.
	Rekabete eden endojen RNA (ceRNA)	Uzun kodlamayan RNA	Paylaşılan miRNA'lar için rekabet ederek mRNA transkriptlerini düzenler.
	Uzun kodlamayan RNA (lncRNA)	Uzun kodlamayan RNA	Kromatin remodelling komplekslerini spesifik genomik lokuslara yeniden toplayarak epigenetik değişikliklere aracılık eder. Gen ekspresyonunun transkripsiyonel, post-transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel seviyelerde düzenlenmesi. Hücre farklılaşması, alternatif splyası ve hücre döngüsü düzenlenmesi. Hastalık gelişimini ve ilerlemesini modüle edebilir.
	Retrotanspozon	Retrotanspozon	Kendilerinin bir genoma çoğalabilen ve birçok ökaryotik organizmanın DNA'sının birçok yerinde bulunan genetik elementlerdir.
	RNA virüsü	Virüs	Genetik materyali RNA olan virüs.
	Viroid	Viroid	Bikileri etkileye eden dairesel kodlamayan RNA'lar.
	CRISPR RNA (crRNA)	Faj	Ças proteininin eksogen DNA'yı tanıyıp, kesmesine yardımcı olarak prokaryotik bağışıklık sistemini oluşturur.
	Dairesel RNA (dsRNA)	-	Bazıları düzenleyici, bazıları ise protein kodlayan RNA'dır, transkripsiyonun düzenlenmesi, alternatif splyası, seleksiyon yoluyla miRNA ve protein inhibisyonu, ribonükleoprotein kompleks oluşumu için protein iskeleti, 5'-cap ten bağışmaz transasyon.
Sınıflandırılmamış RNA'lar	Sno-türevli RNA (sRNA)	-	RNA susturma ve snoRNA aracılı RNA işleme sistemleri arasındaki etkileşim sırasında varsayımsal rolere sahiptir.
	miRNA-özet RNA (moRNA)	-	İnsan miRNA özetlerinden üretilir ancak karşılık gelen miRNA'lardan önemli ölçüde daha düşük ekspresyon seviyelerine sahiptir.

Tablo II. Klinikte kullanılan FDA onaylı RNA terapötikleri (22).

Terapötik Ürün	Teslimat Yolu	Hedefi	Aktivasyon Mekanizması	Hastalık / Klinik Sonuç	Şirket	Onay Durumu
ASO						
Fomiviren	Intravitreal (göz içi)	Sitomegalovirüs mRNA	IE2'yi downregüle eder.	Sitomegalovirüs (CMV) retinitisi	İyon ilaçları, Novartis	FDA (1998)
Mipomersen	Subkütan (Deri altı)	apo-B-100 mRNA	ApoB'yi downregüle eder.	Homozigot ailesel hiperkolesterolemi	Kasite Terapötikler, İonis ilaç, Genzyme	FDA (2013)
Nusinersen	Intratekal	SMN2 pre-mRNA	Splyas modülasyonu	Omurilikçe bağlı kas atrofisi	İonis ilaç, Biogen	FDA (2016)
Eteplirsen	Intravenöz (Damar içi)	Exon 51 of DMD	Splyas modülasyonu	Duchenne kas distrofisi	Sarepta Tedavileri	FDA (2016)
Inclisiran	Subkütan (Deri altı)	TTR mRNA	Transkriptin mRNA'sını baskılar	Ailesel amiloid polinöropati	İyon ilaçları	FDA (2018)
Golodirsen	Intravenöz	Exon 53 of DMD	Splyas modülasyonu	Duchenne kas distrofisi	Sarepta Tedavileri	FDA (2019)
Milasen	Intratekal	CLN7	Splyas modülasyonu	Mila Makovec'in Batten hastalığı ile ilişkili CLN7 geni	Boston Çocuk Hastanesi	FDA (2018)
Casimersen	Intravenöz	Exon 45 of DMD	Splyas modülasyonu	Duchenne kas distrofisi	Sarepta Tedavileri	FDA (2021)
siRNA						
Palisiran	Intravenöz (Damar içi)	TTR mRNA	Transkriptin downregülasyonu	hATTR amiloidozunun neden olduğu polinöropati	Ailylam	FDA (2018)
Givosiran	Subkütan (Deri altı)	ALS1 mRNA	ALS1'in downregülasyonu	Akut hepatik porfiri	Ailylam	FDA (2020)
Lumasiran	Subkütan (Deri altı)	HAO1 mRNA	Glikoliz oksidazın downregülasyonu	Birincil hiperoksalüri tipi 1	Ailylam	FDA (2020)
Incisiran	Subkütan (Deri altı)	PCSK9	Proteinin dönüştürücü sübtilin/keksin tipi 9'un downregülasyonu	Aterosklerotik kardiyovasküler hastalık	Novartis	FDA (2021)
Aptamer						
Pegaptanib	Intravitreal (Göz içi)	VEGF-165'in heparin bağlayıcı alanı	VEGF-165'i Engelleme	Neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasyonu	OSI ilaçları	FDA (2004)
Debio019	Intravenöz (Damar içi)	Adenozin A1/A2 reseptörü	Adenozin A1/A2 reseptörünün etkileşimini	Karaciğerde veno-ilekayıcı hastalık	Çaz ilaçları	FDA (2020)
mRNA						
BNT162b2	Intramusküler (Kas içi)	SARS-CoV-2 S antijenlerine karşı immünojenleştirme ve antikor yanıtı	SARS-CoV-2 S antijenlerinin ifadesi	COVID-19	BioNTech & Pfizer	FDA (2020)
mRNA-1273	Intramusküler (Kas içi)	SARS-CoV-2 S antijenlerine karşı immünojenleştirme ve antikor yanıtı	SARS-CoV-2 S antijenlerinin ifadesi	COVID-19	Moderna	FDA (2020)

sonra, farmakolojisi, doğal mRNA'nın stabilitesini ve translyasyonunu düzenleyen aynı karmaşık hücresel mekanizmalar tarafından yönetilir. İVT mRNA'dan üretilen protein ürünü, post-translyasyonel modifikasyona uğrar ve bu protein, terapötik biyoaktif bileşiktir. Hem İVT mRNA şablonunun hem de protein ürününün yarı ömürleri, mRNA bazlı terapötiklerin farmakokinetiğinin kritik belirleyicileridir. Kodlanmış protein üretildikten sonra, gideceği yer sinyal peptitleri tarafından belirlenir. Bunlar ya doğal protein sekansına özgü olabilir ya da proteini konakçı hücre içindeki istenen hücre bölmesine yönlendirmek için rekombinant olarak tasarlanabilir (Şekil 1).³⁷



Şekil 1:

Endositoz yoluyla hücreye girdikten sonra terapötik mRNA'nın etki mekanizması (Biorender kullanılarak tasarlanmıştır).

Oligonükleotid Bazlı Terapötikler

Bu kategori, doğrudan etkileşim yoluyla bir hedefi susturabilen, bloke edebilen veya baskılayabilen, in vitro üretilmiş tek veya çift sarmallı oligonükleotitleri içermektedir. Oligonükleotid terapötikleri ilk olarak 1978'de Zamecnik ve Stephenson, civciv embriyo fibroblastlarında Rous sarkoma virüsünün üretimini engellemek için bir antisens oligonükleotid kullanımıyla ortaya çıktı.³⁹ Ardından yirmi yıl sonra, ilk oligonükleotid ajan, FDA tarafından sitomegalovirüsün neden olduğu korioretiniti tedavi etmek için onaylandı.⁴⁰

Oligonükleotitlerin terapötik potansiyeli, stabiliteyi, dağıtımları, hızlı bozunmaları ve immünojenlikleri

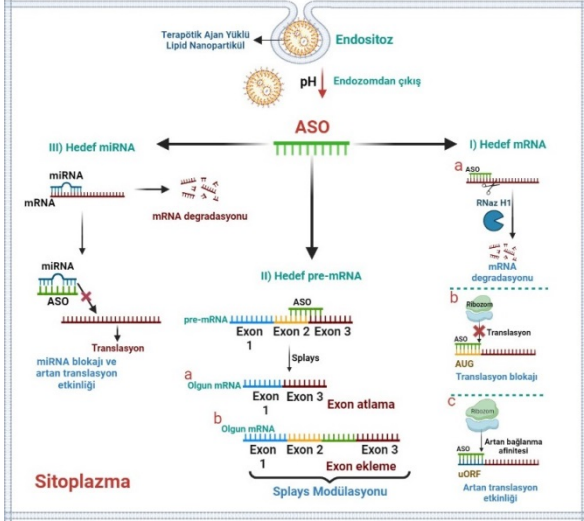
ile ilgili dezavantajlar gelişen teknolojiyle birlikte azalmaya başladı.⁴¹ Bununla birlikte, oligonükleotidlerin omurga yapılarına kimyasal modifikasyonların eklenmesi, oligonükleotid terapötiklerin etkisini iyileştirmiştir.^{42,43} Son yıllarda, RNA interferans (RNAi) yolağının keşfedilmesiyle, hücrede bu mekanizmayı taklit eden moleküller, ile ilgili çalışmalarda istikrarlı bir artış olmuştur. Bu duruma ek olarak RNA aptamerlerini kullanan terapötiklerde oldukça yüksek bir terapötik potansiyel taşımaktadır. RNA aptamerleri, hedeflerine yönelik üç boyutlu afiniteleri ve özgüllükleri nedeniyle sınırsız olanaklar sağlayabilen önemli bir oligonükleotid terapötik sınıfını oluşturmaktadır.⁴⁴⁻⁴⁶

Antisens Oligonükleotid Terapötikler (ASO)

Antisens Oligonükleotid Terapötikler (ASO); kısa, tek sarmallı, tipik olarak 8-50 nükleotit uzunluğunda, sentetik RNA (veya DNA) oligonükleotitleridir. Bu oligonükleotidler tamamlayıcı Watson-Crick baz eşleşmesi yoluyla, hedef mRNA, pre-mRNA veya ncRNA'lara bağlanırlar. Hedeflerine bağlandıktan sonra çoğunlukla endonükleaz aracılı transkript yıkımına ve sonuç olarak transkript seviyelerinin azalmasına yol açarak işlev yapmaktadırlar.^{40,47} Bu terapötiklerin hücredeki etki mekanizmaları çeşitlidir ve bu mekanizmalar beş kategoride sınıflandırılır (Şekil 2). (I) DNA tabanlı ASO'lar, bir RNA hedefine bağlanarak DNA:RNA hibriti oluşturur. Bu hibrit yapı RNaz H tarafından substrat olarak iş görür ve bu hibritin degradasyona uğratılmasını sağlarlar. (II) ASO'lar, ribozomal alt birimlerin birleşmesini bloke eden açık okuma çerçevesinin (ORF), AUG başlangıç bölgesine bağlanan mRNA hedeflerinin translyasyonunu durdurur. (III) RNA bağlayıcı proteinlere sterik olarak müdahale ederek translyasyonu düzenler. (IV) Pre-mRNA'nın splays bölgelerindeki ekzonik veya intronik sekanslara bağlanarak belirli bir ekzonun yok sayılmasına, atlanmasına veya dahil edilmesine yol açarak pre-mRNA splaysını düzenler. (V) 5'UTR bölgesinde bulunan uORF dizisine bağlanarak, bu uORF'nin aşağı yönlü (negatif) akışında bulunan, ana ORF'nin etkinliğini destekleyerek translyasyonu artırabilir.^{40,46,48,49}

Bugüne kadar, tümü nadir hastalıkları tedavi eden, ticari kullanım için onaylanmış dokuz ASO bazlı terapötik ilaç vardır. Bununla birlikte, şu anda geliştirilmekte olan ASO'lar, diğer yaygın hastalıkların tedavisine yönelik uygulamalarının gelecek potansiyelini göstermektedir. Antisens teknolojisindeki ilerlemeler, ASO bazlı ilaçları çok yönlü ve güvenli bir terapötik yaklaşım olarak göstermiştir. Yaygın hastalıkları tedavi eden çok sayıda ASO adayı, yakın gelecekte anlamlı sonuçlar vermesi beklenen klinik geliştirme aşamasındadır.¹⁴

RNA Terapötikler



Şekil 2:

Terapötik ASO'nun hedef hücredeki etki mekanizması:

I. durumda ASO, mRNA molekülüne hedef olarak bağlanır ve tasarlanma şekline bağlı olarak 3 farklı aktivite gösterebilir. II. durumda pre-mRNA'ya hedef olarak bağlanan ASO'nun splicing modülasyonu üzerindeki etkileri gösterilmiştir. III. Durumda ise ASO, hedef olarak miRNA'ya bağlanır ve miRNA'nın aktivasyonunu bloke eder (Biorender kullanılarak tasarlanmıştır).

siRNA Terapötikleri

siRNA'lar, 3' uçlarında asimetrik 2 nükleotid sarkıntıları içeren ve doğrudan hücrelerin sitoplazmasına girebilen kısa, çift sarmallı, sentetik, 20-25 nükleotid duplekslerdir. Çıplak siRNA'lar negatif bir yük tutarlar ve bu nedenle siRNA'ların hücre zarından verimli bir şekilde iletilmesi, lipozomlar gibi dağıtım araçlarında kapsüllemeyi veya hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanan ve bunların alımını artıran ligandlara oligonükleotid duplesinin konjugasyonunu gerektirir.^{50,51} siRNA'lar, bir hücrel savunma mekanizması olan RNAi gen susturma yolağından yararlanan RNA oligonükleotitleridir.⁵² Bu RNA'lar, endojen, uzun, çift zincirli RNA'lardan (dsRNA), bir endoribonükleaz Dicer enzimi tarafından kesilerek üretilir. siRNA hücre içine girdikten sonra, siRNA kaynaklı susturma kompleksini (siRISC) oluşturmak için endonükleaz Argonaute (AGO) ile birleşir. Daha sonra sens iplikçik (yolcu) serbest bırakılır ve antisens iplikçik (kılavuz) RISC'e yüklenir. Kılavuz sarmalın rehberliğinde, RISC aktive edilir ve hedef mRNA'ya tamamen baz eşleşmesi ile bağlanarak hedefin degradasyonuna yol açar, dolayısıyla gen ekspresyonu inhibe olur ve gen susturulur (Şekil 3).⁴⁶

siRNA'nın hedefine bağlanması oldukça seçicidir ve tek bir nükleotid ile farklılık gösteren diziler arasında bile ayırım yapabilir.⁵³ Bağlanmadaki bu özgüllük, siRNA'yı uygun terapötik araçlar haline getirmiştir.

Ayrıca RISC ve kılavuz siRNA, geri dönüştürülebilir ve bu nedenle bir siRNA molekülü, çok sayıda mRNA molekülünün degradasyonunu sağlayabilir bu da yüksek verimli gen susturma ile sonuçlanır.^{54,55}

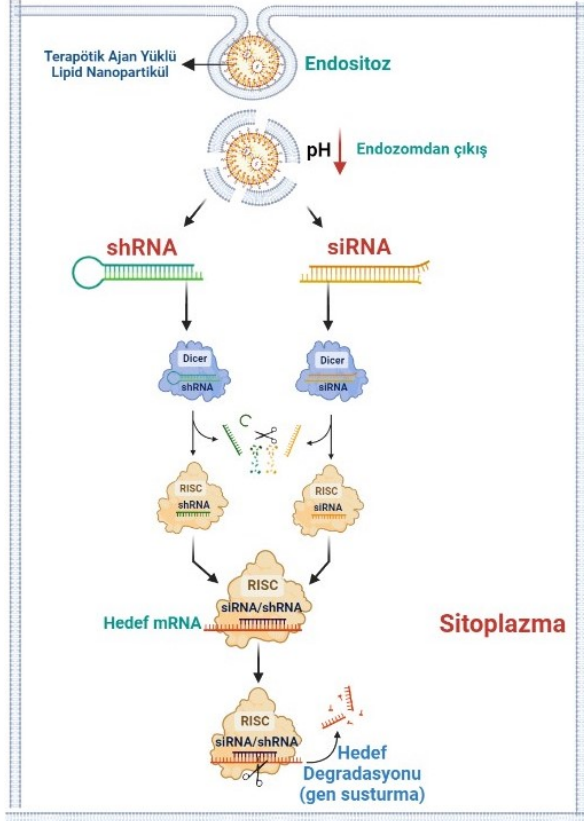
İnsanlarda ve diğer memelilerde RNAi yolağı doğal olarak bulunmamaktadır. Endojen olarak eksprese edilen insan AGO proteinleri doğal olarak miRNA moleküllerine bağlanarak gen düzenlemesinde temel işlevleri olan RISC'i oluşturur. Bu sebeple RNAi ve miRNA yolağı AGO proteinini paylaşmak durumunda kalır. Bu durum tüm siRNA ilaçlarının bir sınırlaması olmuştur. Çünkü; siRNA ilaçları, AGO proteinine bağlanırken, miRNA'larla rekabet eder ve RISC mekanizmasının kullanılması, halihazırda kullanılan düzenleyici işlevleri engelleyebilmektedir. Bu sebeple siRNA terapötiklerinin konsantrasyonunun dikkatli bir şekilde optimize edilmesi şarttır.^{56,57} Bu riske rağmen, RNAi yolağı insanlarda başarılı bir şekilde indüklenebilir. Günümüzde yaklaşık yirmi siRNA bazlı terapötik ilaç geliştirilmektedir ve klinik deney aşamalarına ulaşmışlardır.⁵⁸ siRNA bazlı terapötiklerin, gen ekspresyonunu düzenlemek ve enfeksiyonları tedavi etme potansiyeli, ilaç geliştirme hattındaki çoğu, enflamatuar bozukluklar, kanserler ve nöropatiler dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklar için patolojiye neden olan genleri ve gen varyantlarını hedefler.^{58,59}

shRNA Terapötikleri

shRNA'lar, bir saç tokası yapısı oluşturmak için 7-9 nükleotidlik küçük bir eşleşmemiş halka ile ayrılan, bir dizi tamamlayıcı eşleşmiş 19-22 nükleotid dizisinden oluşur. Tipik olarak, transfeksiyon veya viral transdüksiyon yoluyla hedef hücrelerin çekirdeğine dahil edilmiş bir plazmit vektöründen tasarlanmış promotörlerin kontrolü altında kopyalanırlar. shRNA, yukarıda kısaca açıklandığı gibi hücrel RNA-i mekanizması tarafından işlenerek hedef RNA degradasyonu için kılavuz ipliği AGO'ya ekler. Ardından oluşan RISC kompleksi ile hedef RNA'nın degradasyonu gerçekleşir (Şekil 3).^{60,61}

Bir plazmid yapısı üzerinde iletilen shRNA, çift sarmallı DNA'nın hücrel degradasyona karşı daha büyük direnci nedeniyle, önemli ölçüde daha uzun süreli RNA-i avantajı sunar. Çeşitli modaliteler kullanılarak hedef hücrelerine iletilen shRNA vektörleri, çekirdekte epizomlar olarak stabil bir şekilde bulunur ve terapötik RNA-i dizisinin sürekli bir kaynağını sağlar. Bu, bireyin yaşamı boyunca bir mutant transkriptin sürekli olarak azaltılmasını gerektiren hastalıklar için özellikle önemlidir. Üstelik, shRNA bazlı RNA-i terapötiklerinin ek bir avantajı, hücre tipine özgü promotörler kullanarak shRNA'nın ekspresyonunu yönlendirerek gen hedefini yalnızca hastalıkla ilgili hücre tiplerinde seçici olarak azaltma yeteneğidir.⁶¹ Hücre tipine özgü ifade, aynı zamanda, daha düşük seviyelerde shRNA kullanılarak hedef

transkriptlerin etkili bir şekilde parçalanmasına izin verebilir. Bu, yüksek oranda ifade edilen terapötik shRNA'lar ve endojen miRNA'lar arasındaki RNA-i hüresel mekanizmasının kullanımına yönelik rekabetten kaynaklandığı varsayılan hüresel toksisite olasılığını azaltabilir.^{52,60}



Şekil 3:

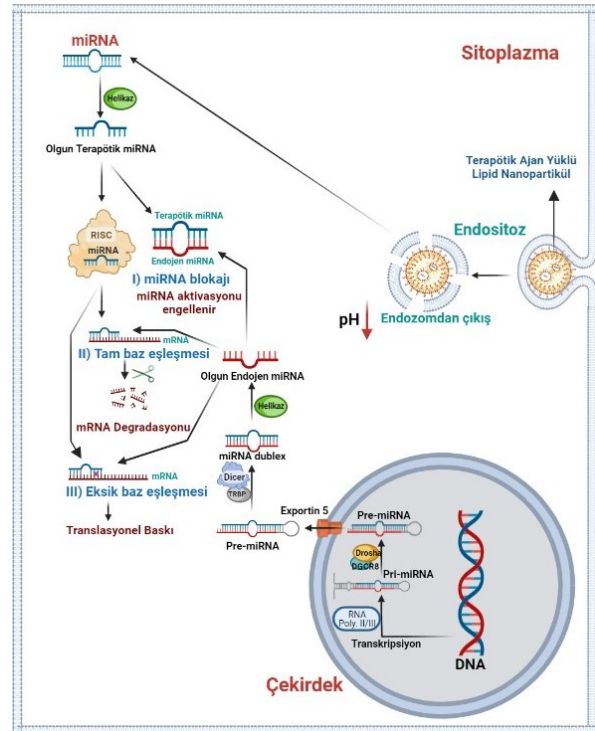
siRNA ve shRNA terapötiklerinin etki mekanizmaları (Biorender kullanılarak tasarlanmıştır).

miRNA Terapötikleri

miRNA'lar, gen düzenleyiciler olarak işlev gören, yüksek oranda korunmuş, küçük, 17-25 nükleotidlik, tek sarmallı ncRNA'lardır. miRNA biyogenezini dört aşamada gerçekleştirir. Birincisi, RNA polimeraz II ve III tarafından pri-miRNA'nın üretilmesidir. İkincisi, üretilen bu pri-miRNA'ların nükleer ribonükleaz Drosha ve DGCR8 tarafından pre-miRNA işlenmesidir. Üçüncüsü, pre-miRNA'ların Exportin 5 ve Ran-GTPaz ile çekirdekte sitoplazmaya transferidir. Dördüncüsü ise sitoplazmaya çıkan pre-miRNA'ların Dicer endonükleazı tarafından kesilip, çift sarmallı bir miRNA'ya dönüşmesi ile gerçekleşir. Endojen olarak oluşan miRNA'lar, mRNA'ların 3'UTR'sine bağlanır ve bunların proteine çevrilmesini önleyerek aktivite gösterir.⁶²

miRNA'nın terapötik uygulamaları için iki yaklaşım vardır: (Şekil 4) miRNA inhibisyonu ve miRNA replasmanı. miRNA inhibisyonu, hedef miRNA'nın aktif sarmalına tamamlayıcı hale getirilen sentetik tek

sarmallı RNA analoglarını kullanır ve yapısal olarak antisens oligonükleotidlere benzer olan endojen miRNA'ları inhibe etmek için miRNA antagonistleri (anti-miR'ler veya antagomiR'ler) olarak işlev görür. İkinci yaklaşım ise, hedef miRNA'ların işlevini taklit etmek için sentetik miRNA'lar (miRNA mimikleri) kullanır ve mRNA inhibisyonuna neden olur.^{14,52} siRNA ve miRNA anlamlı gen susturma araçlarıdır. siRNA ve miRNA terapötikleri arasındaki en önemli fark, etki mekanizmalarıdır. siRNA'lar hedeflerini susturmak için tam komplementer bağlanır, hedeflerine özgüllüğü yüksektir. Buna karşılık, miRNA'ların hücrede birçok hedefi olabilir. Bir miRNA yüzlerce veya binlerce geni düzenleyebilir. Bu nedenle, belirli bir geni düzenlemek için doğru miRNA'yı belirlemek zordur ve beklenmedik yan etkilere neden olabilir.¹⁴ Bunun yanında ise miRNA tabanlı terapötiklerin kullanımının iki avantajı vardır. Birincisi, miRNA'lar sentetik ASO'ların aksine insan hücrelerinde doğal olarak bulunan moleküllerdir ve bu nedenle işlenmesi ve hedef seçimi için tüm mekanizmalara sahiptir. İkinci olarak, miRNA'lar bir yol içinde birden fazla geni hedefleyerek hareket eder, böylece daha geniş ama spesifik bir tepkiye neden olabilirler.⁶²⁻⁶⁴



Şekil 4:

miRNA terapötiklerinin hedef üzerindeki etki mekanizmaları. I. durumda terapötik miRNA, endojen miRNA'ya bağlanır ve onu bloke eder. II. durumda terapötik miRNA, RISC'e bağlanır ve hedef mRNA'yı degrade eder. III. durumda ise terapötik miRNA, eksik baz eşleşmesi ile mRNA'ya bağlanabilir ve onu baskılayabilir (Biorender kullanılarak tasarlanmıştır).

RNA Terapötikler

Doğal olarak oluşan miRNA'ların kullanımı veya hedeflenmesi, mevcut RNA bazlı terapilere umut verici bir alternatif oluşturabilir ve yalnızca tek bir hedef geni etkileyen sentetik siRNA'lar veya ASO'lara kıyasla terapötik etkileri potansiyel olarak artırabilir. Bugüne kadar, klinik denemeler altında olan birkaç miRNA terapötüğü vardır. Ancak bilindiği kadarıyla hiçbiri faz 3 deneylerine girememiştir. siRNA ve miRNA terapötikleri gibi RNA-i tabanlı terapiler, sürekli gelişen bir alandır ve birçok hastalık için büyük terapötik umut vaat etmektedir.^{14,62}

saRNA Terapötikleri

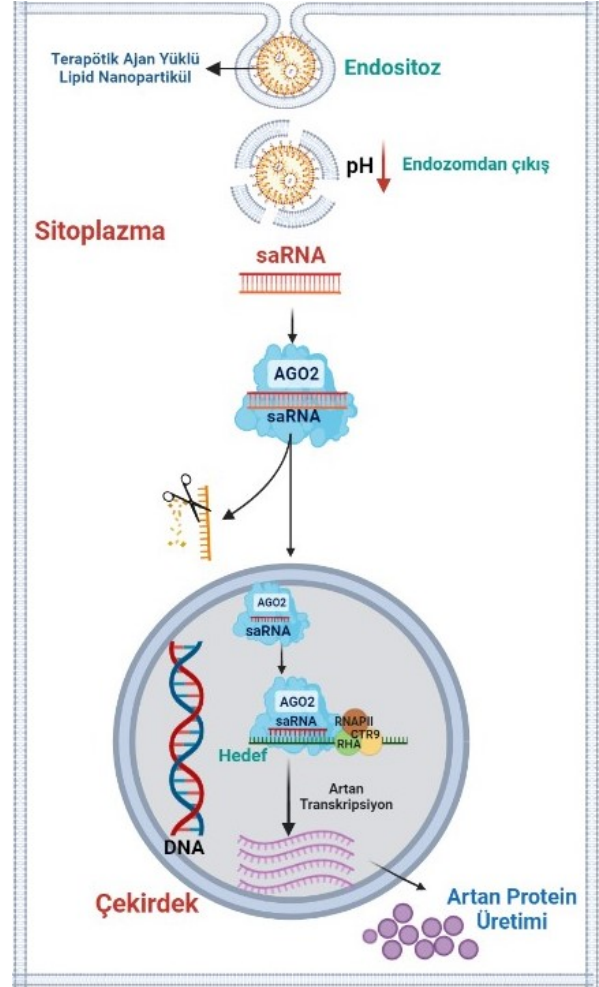
saRNA'lar, her iki uca iki nükleotit sarkıntısına sahip olan 21 nükleotitlik, çift sarmallı, ncRNA'dır. saRNA'lar hücre içine girdikten sonra ilk olarak, passenger (yolcu) ipliğin ayrıldığı AGO2 proteinine yüklenir. Daha sonra saRNA-AGO2 kompleksi çekirdeğe girer ve transkripsiyonu artırmak için genlerin promotör bölgelerine bağlanarak aktivite gösterir.⁴⁵

saRNA, RNAi mekanizmasına benzeyen RNA aktivasyonu (RNAa) mekanizmasını kullanır. RNAa, RNA kaynaklı transkripsiyonel aktivasyon (RITA) kompleksini oluşturmak için saRNA'ların AGO2 proteinine yüklenmesi ile oluşur. RITA kompleksi transkripsiyon başlangıcını ve üretken uzamayı tetiklemek için RNA Polimeraz II ile etkileşime giren RNA helikaz A ve RNA Polimeraz ilişkili Protein CTR9'dan oluşur. RNAa, moleküler kinetiği, genom hedefleme yetenekleri ve çekirdekte hedef gen transkripsiyon uzamasının aktivasyonu bakımından farklıdır. RNAa'nın keşfi ve saRNA'nın rolü, seçici gen aktivasyonu araştırmalarına yeni bakış açıları sunmaktadır (Şekil 5). Ayrıca saRNA, bastırılmış transkripsiyonel veya translasyonel aktiviteye sahip hastalıklarda gen ekspresyonunu upregüle etmek için yeni bir terapötik stratejidir.⁴⁵

Düşük immünojeniklik ve spesifik gen transkripsiyon aktivasyonu dahil olmak üzere terapötik olarak saRNA'ları geliştirmenin çeşitli avantajları vardır; bununla birlikte, RNaz bozulma hassasiyeti ve hedef dışı etkiler gibi dezavantajları da kritik zorluklardır.¹⁴

RNA Aptamerleri

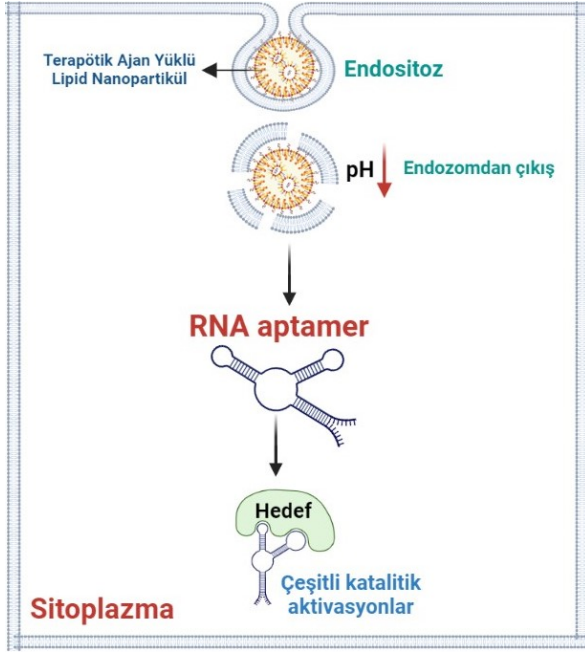
Aptamerler, kompleks yapılar oluşturan, proteinleri bağlayabilen ve çoklu protein komplekslerini bozma veya fonksiyonlarını inhibe etme kapasitesine sahiptir. Hem DNA hem de RNA'dan oluşabilen kısa, 25-80 nükleotitlik, tek sarmallı oligonükleotitlerdir.⁴⁵ Aptamerler: Genellikle nanomolar veya subnanomolar aralıkta moleküler ligandlara yüksek afiniteli bağlanma için seçim avantajından yararlanır. Nükleik asit antikorları olarak düşünülebilirler ve geleneksel protein antikorlarının birçok avantajına sahiptirler. İki işlevli hedefleme için bağlantılı ve diğer RNA'lara, küçük moleküllü ilaçlara, toksinlere veya peptitlere konjuge edilmiş agonistler veya antagonistler olabilirler.¹⁵



Şekil 5:

Hedef hücrelerde saRNA terapötiklerinin etki mekanizması (Biorender kullanılarak tasarlanmıştır).

RNA aptamerleri, üç boyutlu yapısı sayesinde hedeflerine uygun bir etkileşim yoluyla bağlanarak aktivite gösterirler (Şekil 6). DNA aptamerleri ile karşılaştırıldığında, RNA aptamerleri daha çeşitli yapılara katlanarak proteinler, nükleotidler, peptidler, antibiyotikler, küçük moleküller ve hücreler dahil olmak üzere çeşitli hedef molekül tiplerini inhibe etmeye olanak tanır.^{65,66} RNA aptamerlerinin hedefleri RNA molekülleri olduklarında, hedef RNA molekülü ile tamamlayıcı nitelikte olmamaları gerekir. Hedefleri ile üçüncül ve dördüncül yapılarını kullanarak etkileşim kurabilirler.⁴⁵ Aptamerlerin hedeflerine bağlanma şeklinin bağışıklık sistemine benzerliği nedeniyle, "kimyasal antikorlar" olarak kabul edilirler. Bu durum; özel kimyasal sentez sayesinde ölçeklenebilirlik, gruplar arası değişkenlik oranının az olması, sentez sonrası modifikasyon kolaylığı ve düşük immünojenite gibi avantajlar sağlamaktadır.⁴⁶



Şekil 6:

RNA aptamerlerinin terapötik etki mekanizması örneği gösterilmiştir (Biorender kullanılarak tasarlanmıştır).

Aptamerler terapötik olarak ilk 1990 yılında, “Üstel Zenginleştirme Yoluyla Ligandların Sistemik Evrimi” (SELEX) kullanılarak üretildi. SELEX kullanılarak, küçük moleküler ligandları veya proteinleri yüksek afinite ve yüksek özgüllük ile seçici olarak bağlayan aptamerler bir kütüphaneden seçilmektedir.^{67,68}

Bugüne kadar sadece bir RNA aptamer FDA onayı almıştır. FDA onaylı bu terapötik RNA aptameri, yaşa bağlı makula dejenerasyonunun tedavisinde kullanılan Pegabtanib’tir (Macugen, Eyeteck Pharmaceuticals/Pfizer).⁴³ Günümüzde ise bazı aptamerler klinik deneylerde araştırılmaktadır. RNA aptamerlerinin terapötik potansiyelinin yanı sıra aptamerler, siRNA gibi diğer RNA paketlerinin iletilmesine yardımcı olmak için yalnızca hedefleme parçaları olarak da kullanılabilir.⁴⁵

Oligonükleotid Terapötiklerin Sentezlenmesi ve Modifikasyonu

Oligonükleotidler, daha büyük biyomoleküllerin parçalanmasıyla veya hedeflenen kimyasal sentezle yapılabilir. İkinci durumda, oligonükleotid sentezi, reaktif grupları korunmuş analog nükleotidler (ribozdaki hidroksi grupları veya nükleik bazlardaki ekzosiklik amino grupları) olan nükleosid fosforamiditler kullanılarak kimyasal bir işlemle gerçekleştirilir. Zorlu kısım, ribozun 2'-OH fonksiyonu için koruyucu grubu seçmektir. Bu haliyle, RNA oligonükleotidleri, peptitlerin katı faz sentezine

benzer şekilde, katı faz sentezi yoluyla sentezlenebilir. Sentez, pompa tahrikli bir sistemle akışlı bir kolon reaktöründe gerçekleştirilir. Birinci nükleosid katı desteğe bağlanır ve ardından kolon reaktörüne doldurulur. Tipik olarak, ikinci nükleositin birincinin üzerine eklenmesi için dört adım söz konusudur: (I) Detritilasyon: 5'-dimetoksitritil koruma grubu, desteğe bağlı nükleositten çıkarılır. (II) Bağlama: Uygun fosforamidit monomeri (A, G, U, C) bir aktivatör yardımıyla bağlanır. (III) Tiyolasyon/oksidasyon: yeni oluşan fosfit tryter nükleotit arası bağ, tiyolasyon veya oksidasyon ajanları tarafından fosforotiyoat veya fofodiester dönüştürülür. (IV) Kapatma: reaksiyona girmemiş 5'-hidroksil grupları, kapatma maddeleriyle kapatılır. Bu dört adımdan sonra bir döngü tamamlanır ve yeni bir döngü başlatılır. Her adımda %99'a varan verime ulaşılsa da nihai ürünün saflığı, oligonükleotidin uzunluğuna bağlı olarak sadece %70-80 olmaktadır. Bu nedenle, HPLC ile saflaştırma kullanılmalıdır.⁴⁶

Bunun yanında siRNA'lar müteakip bir DNaz işlemi ve kolon saflaştırması ile in vitro transkripsiyon yoluyla da enzimatik olarak sentezlenebilir.^{69,70} RNA aptamerlerinin üretilmesi durumunda ise, önceden bir tasarım gereklidir (SELEX yöntemi).^{67,68}

RNA molekülleri, bir 2'-OH grubuna sahip oldukları için doğal olarak oldukça kararsızdır.⁷¹ Sentezlenmiş bir RNA molekülünün bazı, şekerini veya omurgasını kimyasal olarak modifiye etmek stabiliteye yardımcı olur, nükleazlara karşı dirençlerini artırır, etkinliği ve hedef özgüllüğünü geliştirir veya bir hücreye verilmesine yardımcı olur.^{72,73} 2'-O-metil (2'OMe) modifikasyonlarının, bir oligonükleotid dupleksinin passenger strandına (yolcu iplik) seçici üridin veya guanozin nükleozitlerinde dahil edilmesi, sitokin indüksiyonunu, toksisiteyi ve modifiye edilmemiş oligonükleotidlerde ortaya çıkabilen hedef dışı etkileri ortadan kaldırır.⁷⁴ Bununla birlikte, aşırı modifiye edilmiş oligonükleotidler, toksik etkilere sahip olabilir veya molekülü daha az verimli hale getirebilir.⁷⁵

Sentetik RNA bazlı oligonükleotidler genellikle fosforotiyoat, 2'OMe, 2'-floro, 2'-O-metoksietil (2'MOE) veya 2'4'-metilen (LNA) riboz şekerleri içerir.⁷⁶⁻⁷⁸ Bu modifiye edilmiş RNA bazlı oligolar, in vivo olarak hedeflerine bağlanmak ve onları inhibe etmek için artan bir afiniteye sahiptir, degradasyona karşı daha dirençlidir ve artan biyoyararlanıma sahiptir.⁷⁹ Örneğin, fosforotiyoat ikamelerini içeren ASO'lar sistematik uygulamadan sonra geniş bir şekilde dağılır. Tek sarmallı fosforotiyoat ikameli ASO'lar, amfipatiktir ve serumdaki, hücre yüzeyindeki ve hücre içindeki proteinlere bağlanır. Bu etkileşimler hücre içine alımını ve dağıtımını kolaylaştırır, öyle ki bu tip ASO'lar salin içinde hemen hemen tüm uygulama yolları ile verilebilir ve vücuttaki çoğu dokuya dağılabilir. Bunun karşılık,

RNA Terapötikler

polianyonlar ve hidrofilik olan çift sarmallı siRNA'lar serum proteinlerine bağlanamaz ve hızla atılırlar; bu nedenle ya lipidlerle ya da diğer nanopartikül türleri içinde formüle edilmeli ya da etkili doku iletimi için yüksek kapasiteli bir hücre yüzeyi reseptörü ile etkileşime giren bir aptamer ile modifiye edilmelidir.⁸⁰

Ayrıca RNA oligonükleotidlerinin, nükleazlara karşı stabilitesini arttırmak için N-asetilgalaktozamin (GalNAc) ile modifiye edilmesi, tipik olarak 4 ila 12 fosforotioat ikamesine, 2'-floro ve 2'-metpksi ikamesine sahip olması gerekir.⁸⁰⁻⁸²

circRNA Terapötikleri

Açıklanan RNA terapilerine ek olarak, ortaya çıkan başka bir RNA terapötik adayı son yıllarda dikkat çekmiştir. Ökaryotik hücrelere endojen olan circRNA, 5'CAP ve 3'Poly (A) kuyukları gibi uç motiflerin bulunmadığı, halkasal yapıya sahiptir.⁸³ circRNA'lar, mRNA'nın spliceosome-aracılı splayı ile üretilen, kovalent olarak kapalı RNA molekülleridir. circRNA'nın biyogenezi, kovalent bağ yoluyla 3' kuyruğu 5'CAP'e bağlayan eksonların geri splayını içerir. Bu kovalent bağ oluşumu, circRNA'nın degradasyona karşı doğal direncini artırır.^{84,85} Doğal circRNA'ların biyolojik fonksiyonları uzun süredir büyük ölçüde bilinmemekle birlikte, araştırmalar doğal circRNA'ların protein ve gen süngerleri, hücre aktivite modülatörleri ve protein translasyon şablonlarına kadar çok sayıda biyolojik fonksiyonunu ortaya çıkarmıştır.⁸⁵

circRNA'ların dairesel karakteri nedeniyle, çeşitli RNA ekzonükleazları tarafından bozunmaya karşı dirençli oldukları için stabiliteyi, lineer RNA'lardan üstündür.⁸⁶ Ayrıca modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş lineer RNA'lara kıyasla her ikisinden de daha uzun süreler için sağlam protein ekspresyonunu göstermiştir.⁸⁵ Bu nedenle, circRNA'ların stabiliteyi ve ökaryotik hücrelerde ekspresyon için modifikasyonlara ihtiyaç duymamaları nedeniyle umut verici terapötik adaylardır.^{2,85} Çoğu lineer RNA'dan farklı olarak, diğer RNA terapötikleri gibi, circRNA'da gen ekspresyonunu düzenlemek veya modüler etkiler taşımak için potansiyel bir terapi olarak ortaya çıkar. Sentetik circRNA'ların ökaryotik hücrelerde güçlü ve kararlı bir translasyona sahiptir.⁸⁴

Tasarlanmış circRNA'lara ek olarak, circRNA terapötiklerine başka bir yaklaşım, dayanıklı aşırı ekspresyon için twisteroptimized RNA olarak adlandırılan bir ekspresyon sisteminin RNA daireselleştirmesi yaptığı ve protein bağlama yeteneğine sahip RNA aptamerleri ürettiği circRNA bazlı aptamerlerin kullanılmasıdır.⁸⁷ circRNA'ların araştırılması ve uygulanmasında kayda değer ilerleme kaydedilmiş olsa da adayların çoğu şu anda keşif aşamasında veya klinik öncesi geliştirme aşamasındadır. Günümüzde henüz hiçbir circRNA terapötik adayı klinik deneylere girmemiştir.^{14,88}

lncRNA Terapötikleri

Uzunluğu 200 baz çiftinden büyük olan ncRNA'lar, lncRNA'lar olarak tanımlanır. Bununla birlikte, bu RNA'lar zayıf protein kodlama kapasitesine sahiptir ve intergenik, intronik veya intronik/ekzonik DNA bölgelerinden sens veya antisens olarak transkribe olurlar.⁸⁹ lncRNA'lar, genomik bağamlarına veya işlevlerine göre kategorilere ayrılırlar. Örneğin, genler arası veya araya giren lncRNA'lar, genler arasında yer alır ve birden fazla genden kökenlenebilir; intragenik lncRNA'lar, intronlar gibi tanımlanmış genler içinde bulunabilir; antisens lncRNA'lar, protein kodlama genlerine zıt genomik DNA sarmalında (antisens) kodlanır ve enhancer veya promotör kodlu lncRNA'lar, enhancer lncRNA'lar olarak bilinir.¹⁸ Proteinlerden farklı olarak lncRNA'lar, işlevlerini düzenleyen ve belirleyen daha yüksek dereceli yapılar ve tanımlanmış yapısal motifler oluşturabilir.^{18,90} Genomik yapı ve bağlamda, lncRNA'lar büyük ölçüde mRNA'lara benzer. mRNA'lar gibi; RNA polimeraz II tarafından transkribe edilirler, promotör ve enhancer bölgeleri vardır, 5' ve 3' UTR'lere benzeyen sekanslara sahiptirler, intronları ve eksonları vardır ve çoğu Poly (A) kuyruk içerir. Birçoğunun miRNA bağlanma bölgeleri vardır ve N6-metiladenozin gibi RNA modifikasyonlarına maruz kalabilir. Bu özellikler sayesinde, lncRNA'lar, tıpkı mRNA'lar gibi, farklı RNA teknolojileri ve modaliteleri tarafından modülasyona uygundur.¹⁸

Son yıllarda, patofizyolojik koşullarda yer alan birkaç lncRNA'nın tanımlanması⁹¹⁻⁹⁴ sadece olası hedefler olarak değil, aynı zamanda terapötik RNA'lar olarak da bu molekül sınıfına büyük ilgi uyandırdı. İşlevsel olarak karakterize edilen birkaç lncRNA'nın aktiviteleri, DNA, RNA ve proteinlerle etkileşimine dayanır ve hem çekirdekte hem de sitoplazmada meydana gelebilir. lncRNA'lar, epigenetik düzenlemeler yapabilir, miRNA'ları ve proteinleri süngerleyebilir, delokalle edebilir, parçalayabilir ve bu moleküllerle birlikte kompleks oluşturarak farklı biyolojik roller üstlenebilir.^{95,96}

Çeşitlendirilmiş rollerine bağlı olarak, lncRNA'lar, terapötik amaçla kullanılmak üzere uygun adaylardır. lncRNA ekspresyonunu tanıyabilen ve antagonize edebilen ncRNA bazlı terapötik moleküllerin bir örneği, siRNA'ların ve ASO'ların kullanımıyla temsil edilir.⁹⁷ Ek olarak, lncRNA'ların terapötik moleküller olarak potansiyeli oldukça yüksektir. Örneğin, belirli mRNA'ları lncRNA'lar yoluyla hedeflemeye yönelik bir yaklaşım, belirli mRNA'ların translasyonunu artıran yeni bir antisens lncRNA sınıfı olan SINEUP'lerin kullanımına dayanır.⁸⁹ Bu moleküller iki ana alanla karakterize edilir: biri, translasyon aktivitesindeki artış için efektör alan olan SINE elemanıdır; diğeri ise baz eşleşmesi yoluyla spesifik mRNA'yı hedefleyebilen antisens bölgesidir.^{96,98} SINEUP'lar ile ilgili olarak hem doğal hem de

sentetik lncRNA'ların bu sınıfı, terapötik yaklaşımlarda önemli bir uygulanabilirlik gösterir ve güçlü bir strateji olarak tanımlanmıştır.⁹⁶

lncRNA'lar, farklı patolojilerin gelişiminde önemli unsurlardır. Bu sebeple, lncRNA temelli terapötiklerin geliştirilmesi, ortaya çıkan bir zorunluğu temsil ediyor. Hedef dışı etkileri sınırlayan lncRNA ile yarışan moleküllerin tasarımı ve karakterizasyonunun yanı sıra daha spesifik gen düzenleme yaklaşımlarının geliştirilmesi, lncRNA tabanlı terapötik yaklaşımlar perspektifinde değerlendirilmelidir.⁹⁶ Şu ana kadar hiçbir lncRNA hedefli terapötik klinik geliştirmeye girmemiştir ama yakın gelecekte lncRNA'ların yeni terapötik yaklaşımları temsil etmesi beklenmektedir.⁹⁹

İlaç Dağıtım Sistemleri (Paketleme ve Teslimat)

Farklı RNA kargoları, farklı biyokimyasal etki mekanizmalarına sahiptirler. Ancak, hepsinin hedef dışı organlar tarafından kaçınması, doğru dokuya erişmesi, karmaşık bir doku mikroçevresinde istenen hücre tipiyle etkileşime girmesi, endositoz tarafından alınması ve zararlı bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarmadan endozomdan çıkması gereklidir. RNA terapötiklerinin yalnızca ilgili organ ve hücre tipine değil, aynı zamanda hücre içi işlevlerini yerine getirmek için hücre zarı boyunca verimli bir şekilde iletilmesi, çok önemlidir ve alandaki en büyük zorluklardan biridir.^{44,45,99}

Terapötik RNA'ların hemen hemen her türü, etkili bir şekilde hedefe iletilmesi için kimyasal modifikasyon gerektirir. Kimyasal modifikasyonun gerekli olmasının 3 temel nedeni vardır: (I) stabilizasyon, yani her yerde bulunan RNazlara direnç; (II) geliştirilmiş farmakokinetik ve dağıtım; (III) immünojenik potansiyelin azaltılması.¹⁸ Kararsızlıkları, negatif yükleri ve hücre zarları yoluyla difüzyonu önleyen hidrofilik yapıları nedeniyle, oligonükleotitlerin verimli şekilde iletilmesi zordur. Birinci ve ikinci nesil kimyasal modifikasyonlar, nükleaz bozunmasına karşı direnci indükleyerek ve proteinlerle etkileşimi artırarak kararlılığı ve hücre içine alımı geliştirir. Ancak, hücresel alımda hala zorluklarla karşılaşır ve yüksek dozlarda uygulanması gerektirir.¹⁰⁰ Teslimat alternatifleri olarak RNA terapötiklerinde lipit ve polimer bazlı vektörler bunun yanında ligand-oligonükleotid konjugat dağıtım sistemleri dahil olmak üzere çok farklı dağıtım sistemleri kullanılmaktadır. Bu dağıtım sistemleri, farklı endositoz mekanizmaları yoluyla alınır ve sonuç olarak, lizozomal bozulmasını önlemek için RNA terapötiklerinin endozomal kaçışını kolaylaştırır. Katyonik lipitlerin, viral veya bakteriyel ajanların veya hücreye nüfuz eden peptitlerin kullanımı gibi çok sayıda strateji kullanılmakta ve geliştirilmektedir.^{96,99}

Sonuç

RNA'ların çok yönlü rollerine ilişkin artan bilgiler, yeni RNA bazlı ilaç sınıflarının geliştirilmesini tetikledi. Geliştirilmekte olan ilaçlar, gen ekspresyonunu inhibe etmek, fonksiyonel proteinler üretmek, splayı değiştirmek, gibi birçok yoldan aktivite gösteren mekanizmalar ile kullanılmaktadır. Bu mekanizmaları kullanmak ve RNA'ları ilaca dönüştürmek zor olsa da ilaç geliştirmede bir devrimin eşiğindediriz. RNA tabanlı terapötiklerin başarılı bir şekilde uygulanması, moleküler biyoloji, immünoloji, farmakoloji, kimya ve nanoteknolojideki teknik ilerlemeler dahil olmak üzere benzeri görülmemiş bir disiplinler arası yaklaşım gerektirir. Hedeflenen hücre ve doku aralığını genişletmek, plazma zarından ve endozomdan çıkış engellerinin üstesinden gelmek ve sitozolik dağıtım için yeni stratejiler geliştirilmektedir. Bu adımları optimize etmek ve terapötik RNA'ların ilaç hedefli özelliklerini geliştirmeye günümüzde oldukça ilgi duyulmaktadır. RNA tasarımının esnekliği, birden fazla etki moduna sahip olan ve gelecekte ilaç kokteyllerinin yerini alabilecek birden fazla hedefi bozan güçlü çok işlevli ilaçların kolay bir şekilde oluşturulmasına izin vermektedir. Ayrıca, diğer RNA türlerini hedef alma ve işlevlerini bozma gibi büyük ölçüde keşfedilmemiş bir potansiyel de vardır. Bu çalışmanın yapıldığı tarihte 16 adet RNA bazlı tedavi, yasal onay almıştır ve en son klinik gelişmelere ulaşmıştır (Tablo II). Son yıllarda teslimat, stabilite ve immünojenisite gibi RNA terapilerinin temel zorlukları güncel araştırma konularında ele alındığından, RNA ilaçlarının gelişimi hızla artmaktadır. Yakın gelecekte, RNA bazlı ilaçlar, farmakopenin giderek artan bir bileşeni haline geleceği beklenmektedir. Bu sayede tedavi edilemeyen hastalıkların tedavisini sağlamak ve potansiyel olarak genetik hastalıkları iyileştirmek için "ilaç uygulanabilir" hedefler evrenini büyük ölçüde genişletme potansiyeli taşımaktadır. Özellikle kanser immünoterapisinde mRNA bazlı aşılarda, standart kanser tedavilerine ve geleneksel aşılara umut verici bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır.¹⁰¹ Bunun yanında birçok hastalık içinde RNA terapötikleri potansiyeli çok yüksek tedavi stratejileri olarak gelişen teknolojiyle birlikte ilerlemektedir.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

İlgili derleme makale için etik kurul onayına gerek yoktur.

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: S.A., İ.K.; Veri toplama ve işleme: İ.K.; Analiz ve verilerin yorumlanması: İ.K., S.A.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: İ.K.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Bu çalışmada finansal destek kullanılmamıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

- Djebali S, Davis CA, Merkel A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nat*. 2012; 489(7414): 101-108.
- Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, et al. Translation of circRNAs. *Mol Cell*. 2017; 66(1): 9-21.
- Dai X, Zhang S, Zaleta-Rivera K. RNA: interactions drive functionalities. *Mol Biol Rep*. 2020; 47(2): 1413-1434.
- Brenner S, Jacob F, Meselson M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nat*. 1961; 190(4776): 576-581.
- Gros F, Hiatt H, Gilbert W, Kurland CG, Risebrough RW, Watson JD. Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of *Escherichia coli*. *Nat*. 1961; 190(4776): 581-585.
- Chow LT, Gelinis RE, Broker TR, Roberts RJ. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*. 1977; 12(1): 1-8.
- Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*. 1982; 31(1): 147-157.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5): 843-854.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nat*. 1998; 391(6669): 806-811.
- Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*. 2000; 289(5481): 905-920.
- Schluzen F, Tocilj A, Zarivach R, et al. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell*. 2000; 102(5): 615-623.
- Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM, et al. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nat*. 2000; 407(6802): 327-339.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012; 337(6096): 816-821.
- Zhang C, Zhang B. RNA therapeutics: updates and future potential. *Sci China Life Sci*. 2023. 66(1): 12-30.
- Lieberman J. Tapping the RNA world for therapeutics. *Nat Struct Mol Biol*. 2018; 25(5): 357-364.
- Qadir MI, Bukhat S, Rasul S, Manzoor H, Manzoor M. RNA therapeutics: Identification of novel targets leading to drug discovery. *J Cell Biochem*. 2020; 121(2): 898-929.
- Bejar N, Tat TT, Kiss DL. RNA Therapeutics: the Next Generation of Drugs for Cardiovascular Diseases. *Curr Atheroscler Rep*. 2022; 24(5): 1-15.
- Robinson EL, Port JD. Utilization and Potential of RNA-Based Therapies in Cardiovascular Disease. *JACC Basic Transl Sci*. 2022; 7(9): 956-969.
- Shin H, Park SJ, Yim Y, et al. Recent advances in RNA therapeutics and RNA delivery systems based on nanoparticles. *Adv Ther*. 2018; 1(7): 1800065.
- Agrawal S. RNA therapeutics are stepping out of the maze. *Trends Mol Med*. 2020; 26(12): 1061-1064.
- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol*. 2002; 3(3): 1-10.
- Zogg H, Singh R, Ro S. Current Advances in RNA Therapeutics for Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(5): 2736.
- Gao M, Zhang Q, Feng XH, Liu J. Synthetic modified messenger RNA for therapeutic applications. *Acta Biomater*. 2021; 131: 1-15.
- Leppik K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018; 19(3): 158-174.
- Da Silva Sanchez A, Paunovska K, Cristian A, Dahlman JE. Treating cystic fibrosis with mRNA and CRISPR. *Hum Gene Ther*. 2020; 31(17-18): 940-955.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 1990; 247(4949): 1465-1468.
- Weng Y, Li C, Yang T, et al. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotechnol Adv*. 2020; 40: 107534.
- Verbeke R, Lentacker I, De Smedt SC, Dewitte H. Three decades of messenger RNA vaccine development. *Nano Today*. 2019; 28: 100766.
- Warren L, Lin C. mRNA-based genetic reprogramming. *Mol Ther*. 2019; 27(4): 729-734.
- Maruggi G, Zhang C, Li J, Ulmer JB, Yu D. mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases. *Mol Ther*. 2019; 27(4): 757-772.
- Kwon H, Kim M, Seo Y, et al. Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. *Biomaterials*. 2018; 156: 172-193.
- Hajj KA, Whitehead KA. Tools for translation: non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nat Rev Mater*. 2017; 2(10): 1-17.
- Sergeeva OV, Kotliansky VE, Zatsepin TS. mRNA-based therapeutics—Advances and perspectives. *Biochemistry (Mosc)*. 2016; 81(7): 709-722.
- Vallazza B, Petri S, Poleganov MA, Eberle F, Kuhn AN, Sahin U. Recombinant messenger RNA technology and its application in cancer immunotherapy, transcript replacement therapies, pluripotent stem cell induction, and beyond. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2015; 6(5): 471-499.
- Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov*. 2021; 20(11): 817-838.
- Zhu Y, Zhu L, Wang X, Jin H. RNA-based therapeutics: An overview and prospectus. *Cell Death Dis*. 2022; 13(7): 1-15.
- Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13(10): 759-780.
- Nelson J, Sorensen EW, Mintri S, et al. Impact of mRNA chemistry and manufacturing process on innate immune activation. *Sci Adv*. 2020; 6: 26.
- Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1978; 75(1): 280-284.
- Rinaldi C, Wood MJ. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018; 14(1): 9-21.
- Glazier DA, Liao J, Roberts BL, et al. Chemical synthesis and biological application of modified oligonucleotides. *Bioconjug Chem*. 2020; 31(5): 1213-1233.
- Misra A. Challenges in delivery of therapeutic genomics and proteomics. *Elsevier London United Kingdom*. 2010; pp: 671.
- Kim YK. RNA therapy: current status and future potential. *Chonnam Med J*. 2020; 56(2): 87.
- Zhou J, Bobbin ML, Burnett JC, Rossi JJ. Current progress of RNA aptamer-based therapeutics. *Front Genet*. 2012; 3: 234.
- Dammes N, Peer D. Paving the road for RNA therapeutics. *Trends Pharmacol Sci*. 2020; 41(10): 755-775.

46. Mollocana-Lara EC, Ni M, Agathos SN, Gonzales-Zubieta FA. The infinite possibilities of RNA therapeutics. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2021; 48: 9-10.
47. Quemener AM, Bachelot L, Forestier A, Donnou-Fournet E, Gilot D, Galibert MD. The powerful world of antisense oligonucleotides: From bench to bedside. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2020; 11(5): e1594.
48. Havens MA, Hastings ML. Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(14): 6549-6563.
49. Bennett CF, Krainer AR, Cleveland DW. Antisense oligonucleotide therapies for neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci.* 2019; 42: 385.
50. Hirunagi T, Sahashi K, Tachikawa K, et al. Selective suppression of polyglutamine-expanded protein by lipid nanoparticle-delivered siRNA targeting CAG expansions in the mouse CNS. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2021; 24: 1-10.
51. Brown KM, Nair JK, Janas MM, et al. Expanding RNAi therapeutics to extrahepatic tissues with lipophilic conjugates. *Nat Biotechnol.* 2022; 40(10): 1500-1508
52. Germain ND, Chung WK, Sarmiere PD. RNA interference (RNAi)-based therapeutics for treatment of rare neurologic diseases. *Mol Aspects Med.* 2022; 91: 101148.
53. Schwarz DS, Ding H, Kennington L, et al. Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. *PLoS Genet.* 2006; 2(9): e140.
54. McCullough SD, Dolinoy D. Toxicoeugenetics: Core principles and applications. *Academic Press London United Kingdom.* 2018; pp: 326.
55. Xu JZ, Zhang JL, Zhang WG. Antisense RNA: the new favorite in genetic research. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2018; 19(10): 739-749.
56. Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(1): 57-67.
57. Grimm D. The dose can make the poison: lessons learned from adverse in vivo toxicities caused by RNAi overexpression. *Silence.* 2011; 2(1): 1-6.
58. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Doss CGP, Lee SS. Therapeutic miRNA and siRNA: moving from bench to clinic as next generation medicine. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017; 8: 132-143.
59. Bajan S, Hutvagner G. RNA-based therapeutics: from antisense oligonucleotides to miRNAs. *Cells.* 2020; 9(1): 137.
60. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nat.* 2006; 441(7092): 537-541.
61. Powell SK, Rivera-Soto R, Gray SJ. Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov Med.* 2015; 19(102): 49.
62. Winkle M, El-Daly SM, Fabbri M, Calin GA. Noncoding RNA therapeutics—Challenges and potential solutions. *Nat Rev Drug Discov.* 2021; 20(8): 629-651.
63. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science.* 2004; 304(5670): 594-596.
64. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet.* 2015; 16(7): 421-433.
65. Shigdar S, Ward AC, De A, Yang CJ, Wei M, Duan W. Clinical applications of aptamers and nucleic acid therapeutics in haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2011; 155(1): 3-13.
66. Zhu Q, Liu G, Kai M. DNA aptamers in the diagnosis and treatment of human diseases. *Molecules.* 2015; 20(12): 20979-20997.
67. Missailidis S, Hardy A. Aptamers as inhibitors of target proteins. *Expert Opin Ther Pat.* 2009; 19(8): 1073-1082.
68. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(7): 537-550.
69. Leirdal M, Sioud M. Gene silencing in mammalian cells by preformed small RNA duplexes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 295(3): 744-748.
70. Sioud M. Ribozymes and siRNA protocols. Springer, Vol. 252. *Methods Mol Biol, Humana Press, Totowa NJ,* 2004; pp: 277.
71. Haussecker D. Current issues of RNAi therapeutics delivery and development. *J Control Release.* 2014; 195: 49-54.
72. Shukla S, Sumaria CS, Pradeepkumar PI. Exploring chemical modifications for siRNA therapeutics: a structural and functional outlook. *Chem Med Chem.* 2010; 5(3): 328-349.
73. Egli M, Manoharan M. Re-engineering RNA molecules into therapeutic agents. *Acc Chem Res.* 2019; 52(4): 1036-1047.
74. Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther.* 2006; 13(3): 494-505.
75. Jackson AL, Burchard J, Schelter J, et al. Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *Rna,* 2006; 12(7): 1179-1187.
76. Davis S, Lollo B, Freier S, Esau C. Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(8): 2294-2304.
77. Esau C, Davis S, Murray SF, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 2006; 3(2): 87-98.
78. Ørom UA, Kauppinen S, Lund AH. LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function. *Gene.* 2006; 372: 137-141.
79. Lennox KA, Behlke MA. A direct comparison of anti-microRNA oligonucleotide potency. *Pharm Res.* 2010; 27(9): 1788-1799.
80. Croke ST, Witztum JL, Bennett CF, Baker BF. RNA-targeted therapeutics. *Cell Metab.* 2018; 27(4): 714-739.
81. Dowdy SF. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. *Nat Biotechnol.* 2017; 35(3): 222-229.
82. Roberts TC, Langer R, Wood MJ. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2020; 19(10): 673-694.
83. Shi Y, Jia X, Xu J. The new function of circRNA: translation. *Clin Transl Oncol.* 2020; 22(12): 2162-2169.
84. Zganiacz D, Milanowski R. Characteristics of circular ribonucleic acid molecules (circRNA). *Postepy Biochem.* 2017; 63(3): 221-232.
85. Liu CX, Chen LL. Circular RNAs: Characterization, cellular roles, and applications. *Cell.* 2022; 185(12): 2016-2034
86. Zhang Y, Xue W, Li X, et al. The biogenesis of nascent circular RNAs. *Cell Rep.* 2016; 15(3): 611-624.
87. Litke JL, Jaffrey SR. Highly efficient expression of circular RNA aptamers in cells using autocatalytic transcripts. *Nat Biotechnol.* 2019; 37(6): 667-675.
88. Lavenniah A, Luu TDA, Li YP, et al. Engineered circular RNA sponges act as miRNA inhibitors to attenuate pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Mole Ther.* 2020; 28(6): 1506-1517.
89. Espinoza S, Bon C, Valentini P, et al. SINEUPs: a novel toolbox for RNA therapeutics. *Essays Biochem.* 2021; 65(4): 775-789.
90. Uszczyńska-Ratajczak B, Lagarde J, Frankish A, Guigó R, Johnson R. Towards a complete map of the human long non-coding RNA transcriptome. *Nat Rev Genet.* 2018; 19(9): 535-548.

RNA Terapötikler

91. Battistelli C, Cicchini C, Santangelo L, et al. The Snail repressor recruits EZH2 to specific genomic sites through the enrollment of the lncRNA HOTAIR in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2017; 36(7): 942-955.
92. Fazi B, Garbo S, Toschi N, et al. The lncRNA H19 positively affects the tumorigenic properties of glioblastoma cells and contributes to NKD1 repression through the recruitment of EZH2 on its promoter. *Oncotarget*. 2018; 9(21): 15512.
93. Battistelli C, Sabarese G, Santangelo L, et al. The lncRNA HOTAIR transcription is controlled by HNF4 α -induced chromatin topology modulation. *Cell Death Differ*. 2019; 26(5): 890-901.
94. Andresini O, Rossi MN, Matteini F, Petrai S, Santini T, Maione R. The long non-coding RNA Kcnq1ot1 controls maternal p57 expression in muscle cells by promoting H3K27me3 accumulation to an intragenic MyoD-binding region. *Epigenetics Chromatin*. 2019; 12(1): 1-16.
95. Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nat*. 2014; 505(7483): 344-352.
96. Garbo S, Maione R, Tripodi M, Battistelli C. Next RNA therapeutics: the mine of non-coding. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(13): 7471.
97. Amodio N, Stamato MA, Juli G, et al. Drugging the lncRNA MALAT1 via LNA gapmeR ASO inhibits gene expression of proteasome subunits and triggers anti-multiple myeloma activity. *Leukemia*. 2018; 32(9): 1948-1957.
98. Zucchelli S, Cotella D, Takahashi H, et al. SINEUPs: A new class of natural and synthetic antisense long non-coding RNAs that activate translation. *RNA Biol*. 2015; 12(8): 771-779.
99. Liu X, Zhang Y, Zhou S, Dain L, Mei L, Zhu G. Circular RNA: An emerging frontier in RNA therapeutic targets, RNA therapeutics, and mRNA vaccines. *J Control Release*. 2022; 348: 84-94.
100. Dzierlega K, Yokota T. Optimization of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *Gene Ther*. 2020; 27(9): 407-416.
101. Senti ME, Del Valle LG, Schifflers RM. mRNA delivery systems for cancer immunotherapy: Lipid nanoparticles and beyond. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2024; 115190.

