

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000022610
Data Deposito	31/08/2021
Data Pubblicazione	28/02/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N	15	113

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	7088

Titolo

Complesso chimerico e suoi usi terapeutici
--

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

"Complesso chimerico e suoi usi terapeutici"

Di: Università degli Studi di Torino, nazionalità italiana, via Verdi 8, 10124, Torino, Italia

Inventori designati: TAVERNA, Daniela; QUIRICO, Lorena; ORSO, Francesca.

Depositata il: 31 agosto 2021

* * *

DESCRIZIONE

La presente invenzione rientra nel campo dei trattamenti terapeutici delle patologie tumorali, in particolare dei tumori solidi, più particolarmente dei tumori solidi che esprimono l'oncogene *axl*.

Le patologie tumorali sono tipicamente caratterizzate dalla progressione attraverso stadi successivi di crescente gravità. In una fase iniziale, le cellule normali, a seguito di modifiche genetiche, iniziano a proliferare in maniera anomala in un microambiente costituito da cellule stromali incorporate in una matrice extracellulare rimodellata e infiltrata da cellule immunitarie. Allorché alcune cellule tumorali acquisiscono la capacità di invadere i tessuti adiacenti, intravasare, muoversi attraverso il sistema vascolare, arrestarsi nei capillari, extravasare nel

parenchima tissutale circostante, si assiste alla formazione di metastasi a distanza. Poiché la diffusione metastatica è responsabile di oltre il 90% dei decessi associati alle patologie tumorali, un notevole sforzo nel campo della ricerca clinica e farmacologica è volto all'individuazione di terapie appropriate che consentano di bloccare o almeno rallentare lo sviluppo metastatico.

Negli ultimi anni è stato messo in luce il coinvolgimento nella biologia dei tumori dei miRNA, piccoli RNA non codificanti che operano come regolatori post-trascrizionali negativi dei loro geni bersaglio. In particolare, è stato osservato che in una vasta maggioranza di casi la formazione e la progressione della malattia tumorale è associata ad un'espressione aberrante di determinati miRNA, e tale osservazione è supportata da una crescita continua di nuovi dati. Il primo articolo sul ruolo dei miRNA nel cancro è apparso nel 2002 e riguardava le conseguenze della delezione dei miR-15 e miR-16 nella leucemia linfatica cronica (CLL) (Calin, GA, et al., (2002) "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia"; Proc Natl Acad Sci 99: 15524-15529). Da allora sono stati

pubblicati oltre 32.500 studi. Tra la pluralità di miRNA sinora individuati, per i miRNA let-7, la famiglia del miR-29, miR-34 e miR-148b è stata dimostrata un'attività di soppressori di "tumori o metastasi", mentre per il cluster miRNA 17-92, miR-21, miR-10b e miR-214 è stato dimostrato un ruolo di promozione della crescita o della disseminazione del tumore a seconda del contesto tumorale. In particolare, studi recenti hanno dimostrato che il miR-148b controlla la progressione del cancro al seno coordinando un numero elevato di molecole bersaglio, tra le quali l'integrina ITG α 5, i suoi attori a valle ROCK1 e PIK3CA/p110 α (Cimino, D, et al. (2013) "miR148b is a major coordinator of breast cancer progression in a relapse-associated microRNA signature by targeting ITGA5, ROCK1, PIK3CA, NRAS, and CSF1", FASEB J 27: 1223-1235) e la molecola di adesione cellulare ALCAM (Penna, E, et al. (2013) "miR-214 coordinates melanoma progression by upregulating ALCAM through TFAP2 and miR-148b downmodulation", Cancer Res 73: 4098-4111). Inoltre, è stato osservato che l'espressione del miR-148b viene regolata negativamente dal miR-214 prometastatico, suggerendo pertanto che il miR-148b operi in modo antagonistico nel controllo della

diffusione del cancro al seno e del melanoma (Orso, F, et al. (2016) "miR-214 and miR-148b Targeting Inhibits Dissemination of Melanoma and Breast Cancer"; Cancer Res 76: 5151-5162).

A causa del ruolo dei miRNA nella progressione del cancro, sono state sviluppate terapie oncologiche basate sul loro impiego.

Dettori D, Orso F, Penna E, et al.(2018) "Therapeutic Silencing of miR-214 Inhibits Tumor Progression in Multiple Mouse Models". Mol Ther.;26(8):2008-2018 propone il miR-214 come un promettente target per terapie anti-metastatiche e descrive un oligonucleotide anti-miR-214 capace di inibire le funzioni pro-metastatiche del miR-214.

La domanda di brevetto internazionale WO2012/049108 descrive un aptamero nucleotidico capace di legarsi al recettore tirosina chinasi *axl* e di inibirlo. Come è noto, questo recettore è espresso ad alti livelli da diversi tipi di tumori, fra cui il melanoma e il tumore alla mammella, mentre è poco espresso nelle cellule normali.

La domanda di brevetto internazionale WO2021/044282 descrive un complesso chimerico formato dall'aptamero nucleotidico anti- *axl* di

WO2012/049108 associato con un miRNA per il tramite di sequenze adesive complementari.

Tuttavia, nel settore delle terapie antitumorali è estremamente sentita la necessità di sviluppare costantemente nuovi strumenti terapeutici che consentano di incrementare l'efficacia e/o la specificità e/o di ridurre gli effetti collaterali delle terapie esistenti.

Vi è inoltre la costante necessità di mettere a disposizione nuove strategie terapeutiche atte a contrastare in maniera mirata la progressione delle patologie tumorali, consentendo in tal modo di prevenire, rallentare e/o inibire la comparsa delle metastasi tumorali e sfavorendo al contempo l'insorgenza di possibili effetti avversi secondari.

La necessità di mettere a disposizione strategie terapeutiche alternative, che viene avvertita come di fondamentale importanza nel settore delle terapie anti-tumorali, è altresì causata dal fatto che taluni pazienti possono sviluppare una resistenza nei confronti di certe terapie antitumorali, come ad esempio la chemioterapia. Tale problema è particolarmente sentito nel caso dei tumori che esprimono il recettore tirosina-chinasico *axl*, la cui presenza

sulla superficie delle cellule tumorali non di rado determina appunto l'insorgenza di resistenze.

Per soddisfare queste ed altre necessità, la presente invenzione mette a disposizione il complesso chimerico come definito nell'annessa rivendicazione 1 e la composizione farmaceutica che lo comprende.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi dell'invenzione sono definiti nelle rivendicazioni dipendenti, che formano parte integrante della descrizione.

Come risulterà chiaramente dalla descrizione dettagliata che segue, la presente invenzione mette a disposizione un complesso chimerico che è definito da una combinazione di caratteristiche atte a conferirgli un'efficace attività antitumorale, in particolare anti-metastatica, accompagnata da una significativa selettività di azione.

Nel contesto della presente descrizione, il termine "complesso chimerico" si riferisce ad un complesso macromolecolare che comprende: i) un aptamero diretto contro il recettore tirosina-chinasi *axl* (denominato per brevità "aptamero anti-*axl*"), in cui l'aptamero è un aptamero di RNA oppure un aptamero di DNA, e ii) una sequenza sponge a DNA

diretta contro il miR-214 (denominato per brevità "miR-214sponge"), in cui i suddetti due componenti sono capaci di esercitare azioni differenti.

Nel seguito, il complesso chimerico dell'invenzione viene talvolta indicato come "axl-miR-214sponge".

In generale, il termine "aptamero" indica una molecola oligonucleotidica a singolo filamento capace di legarsi ad una determinata molecola bersaglio, ad esempio una proteina cellulare transmembrana, con elevata affinità e selettività. Il recettore *axl*, bersaglio dell'aptamero anti-*axl* del complesso chimerico secondo l'invenzione, è noto per essere espresso in maniera aberrante sulla superficie di una larga prevalenza di cellule tumorali diverse, dove esplica un'attività oncogenica.

L'aptamero anti-*axl* del complesso chimerico secondo l'invenzione comprende, dall'estremità 5' all'estremità 3':

(i) una sequenza di acido nucleico (RNA o DNA) a singolo filamento atta a legarsi al recettore tirosina-chinasi *axl*;

(ii) un elemento linker consistente di una catena alchilica lineare non sostituita contenente da 4 a 20 atomi di carbonio; e

(iii) una prima sequenza adesiva, consistente in una sequenza di acido nucleico (RNA o DNA) a singolo filamento di 15 a 20 basi di lunghezza.

L'elemento linker è una catena alchilica lineare non sostituita contenente da 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 atomi di carbonio. È preferita una catena alchilica lineare non sostituita contenente da 6 a 18 atomi di carbonio, ancor più preferibilmente 12 atomi di carbonio.

In una forma di realizzazione dell'invenzione, la sequenza di acido nucleico a singolo filamento atta a legarsi all'aptamero axl è la sequenza di RNA "GL21.T" descritta in WO2012/049108 (SEQ ID NO:1).

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, la prima sequenza adesiva di acido nucleico a singolo filamento dell'aptamero anti-axl è la sequenza di RNA di SEQ ID NO:2.

Con riferimento ad entrambe le forme di realizzazione sopra indicate, la sequenza di RNA di SEQ ID NO:1 e/o la sequenza di RNA di SEQ ID NO:2 possono essere sostituite dalla rispettiva sequenza

di DNA modificato in cui ciascuna U (uridina) di SEQ ID NO:1 e/o SEQ ID NO:2 è sostituita da una dU (desossiuridina).

È infatti noto da WO2020124095A1 e dall'articolo Amero P. et al. (2021), J. Am. Chem. Soc. 143, 20, 7655-7670 che la conversione di un aptamero di RNA in un aptamero di DNA modificato fornisce una stabilità prolungata e un'attività antitumorale migliorata.

Il complesso chimerico secondo l'invenzione comprende altresì un secondo elemento, costituito da un oligonucleotide contenente una sponge a DNA diretta contro miR-214 (designato per brevità "miR-214sponge"). Questo comprende, dall'estremità 5' all'estremità 3':

(iv) una sequenza di legame costituita da un singolo filamento di DNA contenente una pluralità di regioni di legame per il miR-214 inframmezzate da una o più regioni di collegamento, e

(v) una seconda sequenza adesiva di DNA a singolo filamento avente la medesima lunghezza in basi della prima sequenza adesiva di acido nucleico a singolo filamento sopra identificata in (iii) e ad essa complementare.

In una forma di realizzazione dell'invenzione, la sequenza di legame sopra identificata in iv) è la SEQ ID NO:3. Tuttavia, in altre forme di realizzazione dell'invenzione, la sequenza di legame SEQ ID NO:3 è modificata, per quanto riguarda la sequenza nucleotidica delle regioni di legame per il miR-214, il numero di regioni di legame per il miR-214 (ad esempio 2, 3 o 4), e/o la lunghezza delle regioni di collegamento.

Esempi non limitativi di sequenze di legame modificate sono le sequenze SEQ ID NOs:7-28 illustrate nel seguito.

In una forma di realizzazione dell'invenzione, la seconda sequenza adesiva del miR-214sponge identificata sopra in v) è la sequenza SEQ ID NO:4.

Come menzionato, la prima e la seconda sequenza adesiva, rispettivamente dell'aptamero anti-axl e del miR-214sponge, hanno la medesima lunghezza in termini di basi e sono complementari l'una all'altra. Di conseguenza, l'appaiamento di queste due sequenze nucleotidiche consente l'associazione tra l'aptamero e l'oligonucleotide e la formazione in tal modo del complesso chimerico.

La presente invenzione è basata sui risultati ottenuti dagli inventori nelle attività di

sperimentazione e ricerca descritte nella parte sperimentale che segue.

In breve, studi *in vitro* condotti dai presenti inventori con cellule di cancro del seno e melanoma esprimenti *axl*, hanno rivelato che l'impiego del complesso chimerico secondo l'invenzione comporta una significativa riduzione della migrazione, invasione e migrazione transendoteliale delle cellule tumorali, provocando allo stesso tempo l'incremento dei bersagli diretti del miR-214 TFAP2 γ e ITG α 3 e il decremento dei bersagli indiretti del miR-214 ALCAM e ITG α 5, dimostrandosi quindi in grado di colpire, da un punto di vista terapeutico, l'asse formato dal miR-214 e miR-148b. Infatti, il miR-148b è un piccolo RNA anti-metastatico che viene inibito dal miR-214, capace di silenziare ALCAM e ITG α 5. Inoltre, il trattamento con il complesso chimerico dell'invenzione permette di inibire la formazione e la crescita di mammosfere da cellule di tumore del seno *in vitro*. Gli effetti sopra menzionati sono presenti soltanto nelle cellule che esprimono *axl* sulla loro superficie cellulare e non sono presenti nelle cellule che non esprimono questo recettore. Inoltre, gli inventori hanno osservato che, benché anche l'aptamero anti- *axl* da solo sia in grado di

bloccare le caratteristiche metastatiche delle cellule tumorali esprimenti *axl*, il complesso chimerico dell'invenzione dimostra un effetto significativamente superiore rispetto all'aptamero anti-*axl* da solo, suggerendo un'attività combinata dell'aptamero anti-*axl* e di miR-214sponge.

Infine, è stata rilevata una forte capacità del complesso chimerico secondo l'invenzione di bloccare il processo metastatico *in vivo*, se iniettato all'interno di una massa tumorale primaria o iniettato sistemicamente nella vena della coda in topi.

Alla luce di quanto sopra descritto, il complesso chimerico secondo l'invenzione rappresenta uno strumento terapeutico innovativo nel campo oncologico, particolarmente efficace nel contrastare (ossia, inibire o ridurre) l'invasività tumorale e la progressione metastatica, e caratterizzato al contempo da una notevole riduzione degli effetti secondari avversi grazie alla particolare selettività di azione dell'aptamero che è capace di mediare il legame specifico di detto complesso alla cellula tumorale bersaglio *axl* positiva e la sua internalizzazione. Inoltre, la presenza del miR-214sponge incrementa ulteriormente la selettività di

azione, rendendo il complesso chimerico dell'invenzione particolarmente efficace nei confronti dei tumori solidi in cui si ha al contempo una sovraespressione di *axl* e del miR-214, come ad esempio il melanoma, il tumore del pancreas, il tumore dello stomaco, il tumore della prostata, il tumore del polmone, il tumore del seno (in particolare il tumore del seno triplo negativo), il tumore ovarico.

Preferibilmente, il complesso chimerico secondo l'invenzione è resistente all'azione delle nucleasi.

A tale scopo, una o più basi pirimidiniche del complesso chimerico secondo l'invenzione sono preferibilmente sostituite con la corrispondente 2'-fluoropirimidina (è particolarmente preferita la sostituzione di tutte le basi pirimidiniche con la corrispondente 2'-fluoropirimidina). È altresì preferibile che una o più basi puriniche del complesso chimerico siano sostituite con la corrispondente 2'-O-metilpurina. La sostituzione delle purine con la corrispondente 2'-O-metilpurina è particolarmente preferita nelle due sequenze adesive.

In una forma di realizzazione dell'invenzione, in aggiunta alle sostituzioni nucleotidiche

precedentemente descritte, o in alternativa ad esse, al fine di incrementare la resistenza alle nucleasi, nel complesso chimerico dell'invenzione l'estremità 3' della prima sequenza adesiva (ad esempio, SEQ ID NO: 2) e/o l'estremità 3' della seconda sequenza adesiva (ad esempio, SEQ ID NO: 4) sono bloccate mediante coniugazione con una molecola di biotina.

Ulteriori modifiche delle sequenze nucleotidiche idonee a conferire resistenza alle nucleasi includono ad esempio, ma non esclusivamente, l'aggiunta di 2'ammino (2'-NH₂) ribosio, monotiofosfati o tiofosfati, modifiche al legame fosfodiesterico (fosforotioati e metilfosfonati), l'impiego di fosforoamidati, 2'-O-alchilribonucleotidi, sostituzione con locked nucleic acids (LNA) o peptidic nucleic acids (PNA).

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, il complesso chimerico dell'invenzione comprende in aggiunta polietilenglicole (PEG) o colesterolo allo scopo di diminuire la *clearance* renale.

Le forme di realizzazione dell'invenzione sopra descritte possono essere combinate l'una con l'altra e le varie combinazioni ottenibili rientrano nell'ambito dell'invenzione.

Grazie alla sua attività anti-tumorale mirata, in particolare anti-metastatica, il complesso chimerico secondo l'invenzione è idoneo all'uso nel trattamento terapeutico di patologie tumorali, preferibilmente di patologie tumorali caratterizzate da un'attività alterata del recettore tirosina-chinasico *axl*, più preferibilmente di tumori in cui si ha al contempo una sovraespressione di *axl* e del miR-214.

Tra le patologie tumorali si citano ad esempio, ma non esclusivamente, il melanoma, il tumore del pancreas, il tumore dello stomaco, il tumore della prostata, il tumore del polmone, il tumore del seno (in particolare il tumore del seno triplo negativo), il tumore ovarico.

Nell'ambito dell'invenzione rientra inoltre una composizione farmaceutica comprendente il complesso chimerico dell'invenzione come definito in precedenza, in combinazione con almeno un veicolo, eccipiente e/o diluente farmaceuticamente accettabile.

Secondo l'invenzione, la composizione farmaceutica è idonea ad essere impiegata nelle applicazioni mediche terapeutiche sopra indicate con riferimento al complesso chimerico.

La composizione farmaceutica della presente invenzione può essere formulata in qualsivoglia forma di dosaggio idonea, ad esempio, per la somministrazione per via sottocutanea, endovenosa, intraarteriosa, intraperitoneale, intramuscolare, intranasale o inalatoria.

In una forma di realizzazione alternativa, la composizione farmaceutica secondo l'invenzione può essere formulata in una forma di dosaggio idonea per la somministrazione locale intra-tumorale, ad esempio mediante iniezione sotto guida tomografica computerizzata.

Naturalmente la scelta dei veicoli, eccipienti e/o diluenti idonei è effettuata in dipendenza della forma di somministrazione desiderata e tale scelta rientra nelle capacità del tecnico medio del settore. Anche la scelta della dose di principio attivo e del regime di dosaggio rientrano nelle capacità del tecnico medio del settore, e la loro selezione dipende da svariati fattori quali ad esempio l'età e il peso del paziente, il tipo di tumore, il grado di progressione della malattia, nonché le dimensioni della massa tumorale da trattare.

L'invenzione è ulteriormente descritta negli esempi che seguono, facendo riferimento ai disegni allegati in cui:

La Figura 1 mostra la struttura del complesso chimerico dell'invenzione e il suo impatto sull'espressione del miR-214 in cellule tumorali *axl* positive o *axl* negative. (a) Rappresentazione schematica del complesso chimerico secondo l'invenzione ("axl-miR-214sponge"). (b) Sequenza di miR-214sponge. (c) Immagine rappresentativa di elettroforesi su gel di poliacrilammide per verificare la corretta formazione del complesso chimerico. La prima banda corrisponde a miR-214sponge, la seconda banda all'aptamero anti-*axl* e la terza al complesso chimerico axl-miR-214sponge secondo l'invenzione. (d) Immagini rappresentative di esperimenti in elettroforesi su gel di poliacrilammide non denaturanti che mostrano la stabilità del complesso chimerico axl-miR-214sponge (4 μ M) in siero umano all'80% per i tempi indicati (h=ore). Per (c-d), riferimento = 1kb. (e-h) Livelli di espressione relativi del miR-214 ottenuti mediante qRT-PCR sulle cellule 4175-TGL e MA-2 esprimenti *axl* e sovraesprimenti il miR-214 o le cellule SKBR3 *axl*-negative dopo trattamento con

soluzione di controllo (ctrl), aptamero anti-axl da solo, axl-miR-214sponge dell'invenzione o scr-miR-214sponge. È anche stata effettuata la trasfezione con anti-miR-214 (anti-214) o pre-miR-214 (pre-214) o con i loro rispettivi controlli (anti-ctrl o pre-ctrl) e sono stati analizzati i rispettivi livelli di espressione di miR-214. I risultati sono mostrati come numero di volte della variazione (*fold changes*) (media $\pm$ SD) rispetto ai controlli (ctrl o anti-ctrl), normalizzati sui livelli del piccolo RNA nucleolare U44. Sono stati effettuati tre esperimenti indipendenti in triplicato e ne viene mostrato uno rappresentativo. Ns = non significativo, *p <0,05, **p<0,01, ***p<0,001. SD = Deviazione Standard.

La Figura 2 mostra che il complesso chimerico dell'invenzione è capace di inibire la motilità delle cellule di tumore del seno e melanoma. (a-g) Saggi di migrazione transwell (a-b, g), di invasione attraverso Matrigel (c-d) o di migrazione transendoteliale attraverso un monostrato di HUVEC (e-f) per le cellule 4175-TGL e MA-2 esprimenti axl e sovraesprimenti il miR-214 e le cellule SKBR3 axl-negative trattate con soluzione di ctrl, aptamero anti-axl da solo o col complesso axl-miR-214sponge o scr-miR-214sponge. È anche stata effettuata la

trasfezione con anti-miR-214 (anti-214) e il suo rispettivo controllo (anti-ctrl). Nei grafici i risultati sono espressi come rapporto della media $\pm$ SEM dell'area coperta dalle cellule cancerose migrate o invase vs cellule piastrate (a-d, g) o come media $\pm$ SEM dell'area (pixel) coperta dalle cellule transmigrate (e-f). Sono stati effettuati almeno due esperimenti indipendenti (in triplicato) e ne vengono mostrati dei risultati rappresentativi. ns = non significativo; *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001; SEM = Errore Standard della Media.

La Figura 3 mostra che il complesso chimerico dell'invenzione non ha effetti sulla crescita delle cellule tumorali. (a-f) Saggi di proliferazione per le cellule 4175-TGL e MA-2 esprimenti *axl* e sovraesprimenti il miR-214 e le cellule SKBR3 *axl*-negative trattate con soluzione di ctrl, aptamero anti-*axl* da solo o col complesso *axl*-miR-214sponge o scr-miR-214sponge. I risultati sono indicati come media $\pm$ SD del rapporto della proliferazione sul numero di cellule piastrate, misurato come densità ottica a 0-96 ore (h). Sono stati effettuati almeno 2 esperimenti indipendenti in triplicato e ne vengono mostrati dei risultati rappresentativi. SD = Deviazione Standard.

La Figura 4 mostra che il complesso chimerico dell'invenzione modula l'espressione dei bersagli del miR-214 in cellule di tumore del seno e melanoma esprimenti *axl*. (a-f) Analisi Western blot dei bersagli diretti del miR-214 ITG α 3 e TFAP2 γ o del bersaglio indiretto ALCAM in cellule 4175-TGL e MA-2 esprimenti *axl* e sovraesprimenti il miR-214 (a-b, d-e) o in cellule SKBR3 *axl*-negative (c, f) trattate con soluzione di controllo, aptamero anti-*axl* da solo, complesso *axl*-miR-214sponge o scr-miR-214sponge. È anche stata effettuata la trasfezione con anti-miR-214 (anti-214) e il suo rispettivo controllo (anti-ctrl). Le proteine sono state raccolte dopo 48 ore. Le variazioni delle proteine sono state calcolate in riferimento all'aptamero anti-*axl* o all'anti-ctrl, sono state normalizzate sui controlli di caricamento (Vinculina o GAPDH) ed espresse come percentuali (%). Sono stati effettuati almeno tre esperimenti indipendenti e ne vengono mostrati dei risultati rappresentativi. Per i riquadri a e d in alto e a sinistra, il GAPDH è lo stesso perché i filtri sono stati incubati con anticorpo anti-ITG α 3, strippati e incubati con anticorpo anti-ALCAM.

La Figura 5 mostra che il complesso chimerico dell'invenzione riduce la quantità e le dimensioni delle mammosfere derivate da cellule di tumore del seno *axl* positive, ma non da cellule di tumore del seno *axl* negative. (a) Rappresentazione schematica del protocollo: le cellule di tumore al seno 4175-TGL esprimenti *axl* e sovraesprimenti il miR-214 o le cellule di tumore al seno SKBR3 *axl*-negative sono state piastrate (giorno 0), mantenute in sospensione e trattate con soluzione ctrl, aptamero anti-*axl* da solo, complesso *axl*-miR-214sponge o scr-miR-214sponge. I trattamenti sono stati ripetuti nei giorni 3 e 5. (b-d) Al giorno 5 è stata effettuata una valutazione al microscopio delle dimensioni e del numero delle sfere. Sia il numero che le dimensioni delle sfere sono mostrate come media $\pm$ SEM della lunghezza delle sfere (μ m). (b,d) Grafici rappresentanti il numero di mammosfere derivate da 4175-TGL 214 o SKBR3 in 50 μ l di volume di terreno al giorno 5, mostrati come media $\pm$ SEM. (c-e) In alto: fotografie rappresentative delle mammosfere. In basso: diagrammi relativi alle dimensioni delle sfere, mostrate come media $\pm$ SEM della lunghezza delle sfere (μ m); le linee nere corrispondono alle misurazioni delle dimensioni. Sono stati effettuati

almeno due esperimenti indipendenti (in triplicato) e ne vengono mostrati dei risultati rappresentativi. ns = non significativo; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; SEM = Errore Standard della media; barra della scala = 25 μ m (c-e).

La Figura 6 mostra che axl-miR-214sponge riduce la metastatizzazione e promuove la necrosi e l'apoptosi in xenotrapianti di tumore al seno. (a) Schema dell'esperimento: le cellule di tumore al seno 4175-TGL sono state pretrattate per 24 ore con l'aptamero anti-axl o axl-miR-214sponge e poi iniettate in modo ortotopico nella ghiandola mammaria di topi NOD / SCID / IL2R_null (NSG). axl o axl-miR-214sponge sono stati somministrati nei tumori a partire dal giorno 2 post-iniezione (3 trattamenti/settimana, 400 pmoli in 100 μ l, 10 iniezioni in totale, come indicato) e i tumori primari sono stati analizzati. (b) Sono mostrate le immagini rappresentative dei polmoni. Il grafico indica il numero di metastasi ai polmoni e i risultati sono indicati come media $\pm$ SEM per il numero indicato di topi (n). (c) Le sezioni dei tumori primari sono state colorate con H&E e le aree necrotiche sono state valutate: le immagini rappresentative sono mostrate sopra i grafici che

indicano la percentuale (%) dell'area necrotica verso l'area totale mostrata come media $\pm$ SEM per il numero (n) indicato di topi. (d-e) I tumori primari sono stati colorati in IHC con un anticorpo anti-Caspasi-3 Clivata (d) o KI67 (e) e i nuclei sono stati contro-colorati con l'ematosilina (blu): le immagini rappresentative sono mostrate sopra i grafici che indicano la percentuale (%) delle cellule positive verso il numero totale di cellule mostrata come media $\pm$ SEM per il numero (n) indicato di topi (10 campi per topo sono stati valutati). IHC = immunoistochimica. H&E = Ematossilina & Eosina. Barra della scala = 100 μ m (c) o 25 μ m (d, e). ns = non significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0,001$. SEM = Errore Standard Medio.

La Figura 7 mostra che axl-miR-214sponge non è tossico per i topi. (a-c) I topi sono stati iniettati con le cellule 4175-TGL e trattati come descritto nella Figura 6. Il fegato (a), la milza (b) e i reni (c) sono stati pesati al giorno 23 (giorno in cui è finito l'esperimento) e le sezioni sono state colorate con H&E. Le foto rappresentative degli organi (barra della scala =100 o 200 μ m) sono mostrate sopra ai grafici rappresentanti la media $\pm$ SEM del peso degli organi per il numero di

topi indicato (n). ns = non significativo. SEM= Errore Standard Medio; H&E = Ematossilina & Eosina; mg = milligrammi.

La Figura 8 mostra che axl-miR-214sponge PEG previene la disseminazione del tumore al seno nei topi iniettati sistemicamente. (a) Schema dell'esperimento. Le cellule di tumore al seno 4175-TGL sono state iniettate in modo ortotopico nella ghiandola mammaria di topi NOD / SCID / IL2R_null (NSG) e il PBS o l'aptamero axl-miR-214sponge PEG sono stati somministrati nella vena della coda del topo a partire dal giorno 3 post-iniezione (3 trattamenti/settimana, 1600 pmoli in 100 μ l, 10 iniezioni in totale, come indicato). (b) Sono mostrate le immagini rappresentative dei polmoni con le relative metastasi. Il grafico indica la fluorescenza delle metastasi polmonari e i risultati sono indicati come media $\pm$ SEM per il numero indicato (n) di topi. Barra della scala = 800 μ m. ns = non significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0,001$. SEM = Errore Standard Medio.

ESEMPI

Materiali e metodi

Culture cellulari.

Le cellule MA-2 sono state gentilmente fornite da L. Xu e R.O. Hynes (Xu, L, et al. (2008). Gene expression changes in an animal melanoma model correlate with aggressiveness of human melanoma metastases. Mol Cancer Res 6: 760-769.) e mantenute come descritto in (Penna, E, Orso, F et al. (2011). "microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C". EMBO J 30: 1990-2007; Penna, E, et al. (2013) "miR-214 coordinates melanoma progression by upregulating ALCAM through TFAP2 and miR-148b downmodulation", Cancer Res 73: 4098-4111). Le cellule SKBR3 sono state acquistate presso l'American Type Culture Collection (ATCC), mentre le 4175-TGL sono state generosamente fornite da J. Massagué (Minn, A et al. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. Nature 436: 518-524) e mantenute in condizioni di coltura standard. Le cellule HUVECs (cellule endoteliali umane ottenute dal cordone ombelicale) sono state gentilmente fornite da M.F. Brizzi e mantenute come descritto in (Penna, E, Orso, F et al. (2011). "microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C". EMBO J 30: 1990-2007; Penna, E, et al. (2013) "miR-214 coordinates melanoma progression by

upregulating ALCAM through TFAP2 and miR-148b downmodulation", Cancer Res 73: 4098-4111).

Reagenti e anticorpi.

Come inibitori anti-miR sono stati usati i seguenti: Anti-miR miRNA Inibitore Controllo negativo #1, Anti-miR miRNA Inibitore hsa-miR-214 (AM12124) (Applied Biosystems). Per l'analisi dei livelli di espressione dei miRNA sono stati usati i seguenti reagenti: MicroRNA TaqMan®: Hsa-miR-214 ID 002306, U6 snRNA ID001973, U44 snRNA ID001904 (Applied Biosystems). Anticorpi primari: anti-Cleaved Caspase-3 (Asp175) # 9661 (Cell Signaling Technology), anti-KI67 ab15580 (Abcam), anti-ITG α 5pAb RM10 gentilmente fornito da G. Tarone (Molecular Biotechnology Center, Università di Torino), anti-ITG α 3 gentilmente fornito da E. Turco (Molecular Biotechnology Center, Università di Torino), anti-CD166/ALCAM mAb MOG / 07 (Novocastra Laboratories), anti-TFAP2 γ (6E4/4), anti-GAPDH pAb V-18, anti-ACTIN I-19 pAb (da Santa Cruz Biotechnology), anti- α -tubulina mAb B5-1-2 (Sigma). Anticorpi secondari: IgG di capra anti-topo coniugato con HRP, IgG di capra anti-coniglio (Santa Cruz Biotechnology).

Trasfezioni transienti e produzione di linee

cellulari stabili.

Per ottenere un'espressione transiente dei miRNA e delle linee cellulari stabili per l'espressione dei miRNA, le cellule sono state trattate come descritto in ((Penna, E, Orso, F et al. (2011). "microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C". EMBO J 30: 1990-2007; Orso, F, et al. (2016) "miR-214 and miR-148b Targeting Inhibits Dissemination of Melanoma and Breast Cancer"; Cancer Res 76: 5151-5162)5).

Preparazione del complesso chimerico.

Per generare un complesso chimerico axl-miR-214sponge rientrante nell'ambito dell'invenzione, una sponge per il miR-214 è stata coniugata con un aptamero anti-axl ("GL21.T") (Cerchia et al. (2012). Targeting Axl with an high-affinity inhibitory aptamer. Mol Ther 20: 2291-2303), tramite appaiamento delle sequenze attraverso le estremità adesive (sticky ends).

Sono state utilizzate le seguenti sequenze:

5'AUGAUCAAUCGCCUCAAUUCGACAGGAGGCUCAC 3' (sequenza di legame GL21.T atta a legarsi al recettore tirosina-chinasi axl, SEQ ID NO:1);

5'GUACAUUCUAGAUAGCC 3' (prima sequenza adesiva, SEQ ID NO:2);

5'ACTGCCTGTCCATCCTGCTGTCCTCTTCATCGTCAAACCTGCCTGTCAAA
CCTGCTGTAATACCC 3' (sequenza di legame con siti
multipli anti-miR-214, SEQ ID NO:3);

5'GGCTATCTAGAATGTAC 3' (seconda sequenza adesiva,
SEQ ID NO:4);

5'GGCGCUAGAACCUUCUAAGCGAAUACAUUACCGC 3' (GL21.T
scramble, SEQ ID NO:5);

GL21.T-sticky (aptamero anti-axl):

5'AUGAUCAAUCGCCUCAAUUCGACAGGAGGCUCACXXXXGUACAUUCUAG
AUAGCC 3' (SEQ ID NO:1-XXXX-SEQ ID NO:2);

GL21.T scramble (aptamero scr):

5'GGCGCUAGAACCUUCUAAGCGAAUACAUUACCGCXXXXGUACAUUCUAG
AUAGCC 3' (SEQ ID NO:5-XXXX-SEQ ID NO:2);

miR-214sponge:

5'ACTGCCTGTCCATCCTGCTGTCCTCTTCATCGTCAAACCTGCCTGTCAAA
CCTGCTGTAATACCCGGCTATCTAGAATGTAC 3' (SEQ ID NO:6).

Nelle sequenze dell'aptamero anti-axl e
scramble "XXXX" rappresenta la sequenza alchilica
lineare non sostituita avente da 4 a 2 atomi di
carbonio che funge da linker.

Sequenze alternative a SEQ ID NO:3:

In alternativa alla sequenza di legame SEQ ID NO:3, possono essere utilizzate le seguenti sequenze di legame:

5'ACTGCCTGTCTAACCTGCTGTAACCTACCAATACCAAACCTGCCTGTCAAC
CCTGCTGTCTTTTGT 3' (SEQ ID NO:7)

5'ACTGCCTGTCCGTCCTGCTGTCCCATCTATTTCTTACTGCCTGTCCAC
CCTGCTGTTTAATCC 3' (SEQ ID NO:8)

5'ACTGCCTGTCCCTCCTGCTGTAAACAACCTTCACCGAACTGCCTGTCCAT
CCTGCTGTATCATCC 3' (SEQ ID NO:9)

5'ACTGCCTGTCAATCCTGCTGTCACTAATTTTCATCCAACTGCCTGTCACC
CCTGCTGTCTATCCC 3' (SEQ ID NO:10)

5'ACTGCCTGTCCGTCCTGCTGTATCTTACTTCATCAAACCTGCCTGTCCCT
CCTGCTGTCCCCCCC 3' (SEQ ID NO:11)

5'ACTGCCTGTCCGTCCTGCTGTTCGTATCCTACCTTAAACTGCCTGTCCCA
CCTGCTGTATCCCCC 3' (SEQ ID NO:12)

5'ACTGCCTGTCCATCCTGCTGTCACTTACTCCCCTTATACTGCCTGTCAAT
CCTGCTGTTATTCCC 3' (SEQ ID NO:13)

5'ACTGCCTGTCCATCCTGCTGTCTCCCGTTTCTTTTTACTGCCTGTCCCT
CCTGCTGTTCGTCTCC 3' (SEQ ID NO:14)

5'ACTGCCTGTCAATCCTGCTGTATCCTTATCGAATTAACCTGCCTGTCCCT
CCTGCTGTTCGTCCCC 3' (SEQ ID NO:15)

5'ACTGCCTGTCACCCCTGCTGTTTTCCCATCCCCATTACTGCCTGTCCCA
CCTGCTGTCTCTTTT 3' (SEQ ID NO:16)

5'ACTGCCTGTCTATCCTGCTGTTAAAAACCTTTAAATACTGCCTGTCTCC
CCTGCTGTTACCATT 3' (SEQ ID NO:17)

5'ACTGCCTGTCTACCCTGCTGTCCTAAAAATTTATAAACTGCCTGTCCAA
 CCTGCTGTCCCCTTT 3' (SEQ ID NO:18)
 5'ACTGCCTGTCAACCCTGCTGTAATCTGTGTTTATGTACTGCCTGTCCCC
 CCTGCTGTCTCCCCT 3' (SEQ ID NO:19)
 5'ACTGCCTGTCCATCCTGCTGTTTTCTTTCTCATATACTGCCTGTCAAT
 CCTGCTGTAATCCGT 3' (SEQ ID NO:20)
 5'ACTGCCTGTCTATCCTGCTGTCGTCAAACCTTATCATACTGCCTGTCCCT
 CCTGCTGTCTACCCT 3' (SEQ ID NO:21)
 5'ACTGCCTGTCAACCCTGCTGTGCTCATCCCTCATCAACTGCCTGTCCCT
 CCTGCTGTCTCCAAT 3' (SEQ ID NO:22)
 5'ACTGCCTGTCACCCCTGCTGTATTTTTTCCAATCCGAACTGCCTGTCACC
 CCTGCTGTCTCTTAT 3' (SEQ ID NO:23)
 5'ACTGCCTGTCCATCCTGCTGTGTCTTAACTCCCATAACTGCCTGTCCAT
 CCTGCTGTAACCTTT 3' (SEQ ID NO:24)
 5'ACTGCCTGTCAAACCTGCTGTCCACCCACTAAACCTACTGCCTGTCCAT
 CCTGCTGTAATAATT 3' (SEQ ID NO:25)
 5'ACTGCCTGTCAATCCTGCTGTACTCAAATAAATAATACTGCCTGTCAAT
 CCTGCTGTTCCCTCGT 3' (SEQ ID NO:26)
 5'ACTGCCTGTCAATCCTGCTGTTTTACCCTCACAATTACTGCCTGTCAAC
 CCTGCTGTCAATAAT 3' (SEQ ID NO:27)
 5'ACTGCCTGTCAACCCTGCTGTACCTCTCACCTATCAACTGCCTGTCCCC
 CCTGCTGTCTACCGT 3' (SEQ ID NO:28).

Tutti gli RNA presentano pirimidine 2'-F
 modificate (2'-F-Py) per migliorare la stabilità e
 sono stati sintetizzati presso il centro di chimica

di sintesi e biopolimeri, "Beckman Research Institute", Città della speranza, Duarte, CA. Le sequenze adesive (sticky ends), costituite da 2'-F-Py e 2'-O-Methylpurine (2'OMe-Pu), sono sottolineate. XXXX indica la sequenza alchilica lineare non sostituita C4-C20 che funge da linker. Alternativamente, la sequenza dell'aptamero anti-axl può avere un PEG al 5'. Per preparare i complessi axl-miR-214sponge, axl-miR-214spongePEG e scramble-miR-214sponge: 1) la sequenza miR-214sponge è stata incubata a 95 ° C per 10 minuti; 2) l'aptamero con le sequenze adesive (sticky ends) o scramble sono stati ripiegati (5 min 85 ° C, 3 min su ghiaccio, 10 min a 37 ° C); 3) uguali quantità di aptamero/scramble e miR-214sponge sono stati appaiati incubandoli insieme a 37 ° C per 30 minuti. L'efficienza di appaiamento è stata controllata come descritto in (Catuogno et al. (2015). Selective delivery of therapeutic single strand anti-miRs by aptamer-based conjugates. J Control Release 210: 147-159). Per trattare le cellule con gli aptameri axl, axl-miR-214sponge o scramble-miR-214sponge, le cellule sono state piastrate in piastre da 24 pozzetti ad una confluenza dell'80% e trattate 24

ore più tardi con gli aptameri ripiegati aggiungendoli al loro mezzo di coltura.

Isolamento di proteine o RNA, Western Blot, qRT-PCR

Gli estratti totali di proteine o di RNA, Western Blot (WB) e qRT-PCR sono stati eseguiti come descritto in Penna, E, Orso, F et al. (2011). "microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C". EMBO J 30: 1990-2007.

Saggi di proliferazione, migrazione, invasione e migrazione transendoteliale

Le analisi di proliferazione *in vitro*, migrazione, invasione e migrazione transendoteliale sono state eseguite come descritto in (Penna, E, Orso, F et al. (2011). "microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C". EMBO J 30: 1990-2007, Penna, E, et al. (2013) "miR-214 coordinates melanoma progression by upregulating ALCAM through TFAP2 and miR-148b downmodulation", Cancer Res 73: 4098-4111, Cerchia et al. (2012). Targeting Axl with an high-affinity inhibitory aptamer. Mol Ther 20: 2291-2303).

Saggi di formazione di mammosfere

I saggi di formazione delle mammosfere sono stati eseguiti come descritto nel Technical Bulletin

di Stem Cell Technologies Tumorsphere, DOCUMENT # 29936 VERSION 1.1.0 JAN 2014 "Culture of Human Breast Cancer Cell Lines", (<https://www.stemcell.com/tumorsphere-culture-human-breast-cancer-cell-lines-lp.html>) su piastre da 24 pozzetti ricoperti di poli-HEMA (poli-2-idrossietilmetacrilato) utilizzando due protocolli diversi. In un caso, le singole cellule di tumore della mammella (8×10^3 cellule/pozzetto per le cellule 4175-TGL, 1×10^4 cellule/pozzetto per cellule SKBR3) sono state piastrate (giorno 0), mantenute in sospensione in MammoCult Medium (StemCell Technologies) e non trattate (controlli = ctrl) o trattate con 400 nmol / l di complesso anti-axl miR-214sponge o scr-miR-214sponge. I trattamenti sono stati rinnovati ai giorni 3 e 5 (200 nmol/l). Al giorno 5 la dimensione e il numero delle sfere sono stati valutati utilizzando un microscopio Zeiss AxioObserver (Zeiss) e il software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Per la valutazione delle dimensioni, è stato misurato il lato lungo delle sfere (lunghezza). Per la valutazione del numero, è stato contato il numero totale di sfere presenti in 50 μ l di volume per ciascun trattamento.

Istologia e immunoistochimica

Sezioni di tessuto spesse 5 μ m sono state tagliate dai campioni tumorali fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) e colorate con ematossilina ed eosina (H & E) per osservazioni istologiche standard. Le colorazioni immunoistochimiche (IHC) sono state eseguite utilizzando anticorpi anti- KI67 o anti-caspasi 3 clivata con le tecniche di avidina-biotina-perossidasi (Anti-Mouse HRP-DAB Cell & Tissue Staining Kit, R & D Systems). I vetrini sono stati controcolorati con ematossilina.

Stabilità del complesso chimerico axl-miR-214sponge nel siero umano

La stabilità del complesso chimerico nel siero umano è stata verificata come descritto in (Catuogno et al. (2015). Selective delivery of therapeutic single strand antimiRs by aptamer-based conjugates. J Control Release 210: 147-159).

Saggi di crescita e metastasi del tumore in vivo

Tutti gli esperimenti eseguiti con animali sono stati condotti in ottemperanza dell'etica. Topi NOD / SCID / IL2R_null (NSG) sono stati iniettati con cellule tumorali come descritto in (Penna, E, et al. (2013) "miR-214 coordinates melanoma progression by upregulating ALCAM through TFAP2 and miR-148b

downmodulation", Cancer Res 73: 4098-4111, Orso, F, et al. (2016) "miR-214 and miR-148b Targeting Inhibits Dissemination of Melanoma and Breast Cancer"; Cancer Res 76: 5151-5162). Le cellule tumorali sono state pretrattate 24 ore prima dell'iniezione con l'aptamero anti-axl o con axl-miR-214sponge. I tumori, una volta palpabili, sono stati trattati con axl o miR-214sponge (400 pmol/iniezione, tre iniezioni a settimana). I topi sono stati sacrificati ed analizzati 23 giorni dopo le iniezioni di cellule 4175-TGL. In alternativa, i topi sono stati iniettati con le cellule 4175-TGL e gli animali sono stati trattati con un'iniezione nella vena della coda a partire dal giorno 3 con PBS o axl-miR-214spongePEG (1600 pmol/iniezione, tre iniezioni a settimana) e sacrificati al giorno 28. In entrambi i casi, il peso e la morfologia del tumore primario e delle metastasi polmonari o epatiche sono stati valutati come descritto in (Penna, E, et al. (2013) "miR-214 coordinates melanoma progression by upregulating ALCAM through TFAP2 and miR-148b downmodulation", Cancer Res 73: 4098-4111, Orso, F, et al. (2016) "miR-214 and miR-148b Targeting Inhibits Dissemination of Melanoma and Breast Cancer"; Cancer Res 76: 5151-5162). Le

dimensioni dell'organo (fegato, milza, reni) (peso) e la morfologia (H & E) sono stati analizzati al punto finale.

Analisi statistica

Tutti i risultati sono presentati come media $\pm$ Deviazione standard (SD) o $\pm$ Errore standard medio (SEM), come indicato, e il test t di Student a due code è stato utilizzato per i confronti. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ sono stati considerati statisticamente significativi. ns = indica un valore p non statisticamente significativo.

Risultati

Il complesso chimerico axl-miR-214sponge e il suo impatto sull'espressione del miR-214

Il potenziale terapeutico derivante dalla modulazione dei livelli del miR-214 era stato dimostrato in precedenza (Orso, F, et al. (2016) "miR-214 and miR-148b Targeting Inhibits Dissemination of Melanoma and Breast Cancer"; Cancer Res 76: 5151-5162)., Dettori D, Orso F, Penna E, et al.(2018) "Therapeutic Silencing of miR-214 Inhibits Tumor Progression in Multiple Mouse Models". Mol Ther.;26(8):2008-2018). Con lo scopo di veicolare una sponge, una sequenza disegnata per inibire il miR-214, in modo specifico alle cellule di tumore al

seno o melanoma, gli inventori hanno generato il complesso chimerico axl-miR-214sponge (Figura 1a). Nel dettaglio, è stato utilizzato un noto aptamero a RNA, GL21.T, che è in grado di legarsi con grande affinità e specificità ad axl (Cerchia et al. (2012). Targeting Axl with an high-affinity inhibitory aptamer. Mol Ther 20: 2291-2303), un recettore oncogenico sovraespresso sulla superficie delle cellule tumorali e in modo particolare sulle cellule di tumore al seno triplo negative e di melanoma (Quirico et al. (2020) "Axl-148b chimeric aptamers inhibit breast cancer and melanoma progression" IJBS 16:1238-1251). Per ridurre l'ingombro sterico e preservare il corretto ripiegamento del complesso, la sequenza originale a DNA della sponge composta da 8 siti di legame per il miR-214, ognuno della lunghezza di 21 nucleotidi, interrotti da 15 nucleotidi spaziatori, perfettamente complementari alla regione seed del miR-214 e con una mancata complementarità nella posizione 9-12 (Penna, E, Orso, F et al. (2011). "microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C". EMBO J 30: 1990-2007, Orso, F, et al. (2016) "miR-214 and miR-148b Targeting Inhibits Dissemination of Melanoma and Breast Cancer"; Cancer

Res 76: 5151-5162).), è stata accorciata. Nella nuova sequenza sono presenti due siti di legame per il miR-214 separati da 15 nucleotidi che servono a conferire flessibilità alla sequenza e migliorare il legame col miR-214 (Figura 1b). Inoltre la parte finale della sponge per il miR-214 contiene 7 nucleotidi e una sequenza adesiva che si lega all'aptamero per ottenere il complesso chimerico. L'efficienza del ripiegamento della molecola è stata analizzata per ogni preparazione usando un gel di poliacrilammide non denaturante: come mostrato, la chimera corrisponde alla banda posta più in alto, seguita dalle bande relative alla sponge del miR-214 e dell'aptamero anti-axl, indicando una formazione corretta di axl-miR-214sponge (Figura 1c). In parallelo, per valutare la stabilità nel siero *in vitro*, abbiamo incubato il complesso chimerico col siero umano a diverse temperature partendo dal tempo zero (0 ore) fino ad arrivare a 168 ore (Figura 1d). Dopo aver analizzato il gel di poliacrilammide non denaturante, il coniugato axl-miR-214sponge è risultato stabile per 8 ore, trascorse le quali comincia a essere degradato.

In seguito, per valutare la veicolazione della sponge del miR-214 alle cellule tumorali che

esprimono *axl*, delle cellule di tumore al seno (4175-TGL 214) o di melanoma (MA-2 214) sovraesprimenti il miR-214 sono state trattate con l'aptamero *axl* da solo, il complesso chimerico *axl*-miR-214sponge, un complesso chimerico scorrelato/scramble (*scr*-miR-214sponge) o non sono state trattate (*ctrl*). L'RNA è stato isolato 48 ore dopo i trattamenti e i livelli del miR-214 sono stati misurati con una qRT-PCR. In alternativa, le cellule sono state trasfettate con un anti-miR-214 (*anti*-214) o la sequenza di controllo (*anti*-*ctrl*). È stata osservata una riduzione significativa dei livelli del miR-214 nelle cellule esprimanti *axl* 4175-TGL 214 (Figura 1e) o MA-2 214 (Figura 1f) in seguito al trattamento col complesso *axl*-miR-214sponge rispetto agli altri trattamenti e tale modulazione era presente anche nelle cellule trasfettate con *anti*-214. È importante notare che quando le cellule di tumore al seno *axl* negative SKBR3 sono state trattate con il complesso chimerico, nessuna modulazione del miR-214 è stata rilevata (Figura 1g), ma quando le stesse cellule sono state trasfettate con l'*anti*-214, una riduzione dell'espressione del miR-214 rispetto al controllo è stata osservata. Questo indica che l'aptamero *axl* funziona in modo selettivo nel veicolare la sponge

per il miR-214 all'interno delle cellule che esprimono *axl*. Anche nel caso in cui i livelli del miR-214 nelle cellule SKBR3 sono stati aumentati tramite una trasfezione con un precursore del miR-214 (pre-214) e le cellule sono state trattate come indicato in precedenza, non sono stati osservati cambiamenti nei livelli del miR-214 (Figura 1h).

Il complesso axl-miR-214sponge riduce la motilità delle cellule di tumore al seno e melanoma, ma non ha effetti sulla proliferazione *in vitro*.

Gli inventori hanno valutato se axl-miR-214sponge sia in grado di agire sulla disseminazione tumorale, considerato che miR-214 è un miRNA pro-metastatico (Penna, E, Orso, F et al. (2011). "microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C". EMBO J 30: 1990-2007). Nello specifico, sono state analizzate la migrazione, l'invasione attraverso il Matrigel e la migrazione transendoteliale attraverso uno strato di HUVEC per simulare il processo di extravasazione. Per fare questi esperimenti, le cellule (4175-TGL 214, MA-2 214 e SKBR3) o non sono state trattate oppure sono state trattate con l'aptamero anti-*axl* da solo (*axl*) o in combinazione con la sponge per il miR-214 (axl-miR-214sponge),

con la sponge legata ad un aptamero scramble (scr-miR-214sponge) o, in parallelo, le cellule sono state trasfettate con l'anti-214 o il suo controllo negativo (anti-ctrl).

Un'inibizione della motilità cellulare è stata osservata per le cellule *axl* positive di tumore al seno 4175-TGL 214 (Figura 2a,c,e) e melanoma MA-2 214 (Figura 2b, d, f), ma non per le cellule SKBR3 che non esprimono il recettore *axl* (Figura 2g) rispetto ai controlli (ctrl o scr-miR-214sponge). Anche l'aptamero *axl* da solo blocca i tratti metastatici nelle cellule che esprimono *axl*, ma l'effetto del coniugato *axl*-miR-214sponge è più forte grazie alla combinazione dell'attività dell'aptamero anti-*axl* e della sponge per il miR-214. Sono stati osservati risultati simili anche per le cellule trasfettate con l'anti-214 rispetto ai controlli (anti-ctrl) sia nelle cellule che esprimono che in quelle che non esprimono il recettore *axl*. Questi dati suggeriscono che gli effetti biologici ottenuti dipendano dalla veicolazione specifica mediata dall'aptamero e siano specifici per le cellule che esprimono *axl* sulla loro superficie. Quando è stata analizzata la proliferazione nelle cellule tumorali, non è stato

osservato nessun cambiamento significativo nelle cellule trattate o trasfettate (Figura 3a-f), confermando che il miR-214 influenza solo il movimento cellulare. Questi dati indicano la possibilità di usare il complesso per bloccare la motilità delle cellule tumorali e la conseguente metastatizzazione.

Il complesso chimerico axl-miR-214sponge modula i livelli sia dei bersagli diretti che di quelli indiretti del miR-214 nelle cellule di tumore al seno e melanoma che esprimono axl.

Dal momento che la funzione dei miRNA è esercitata dalla regolazione negativa dei loro geni bersaglio, sono stati analizzati TFAP2 γ e ITG α 3, due bersagli diretti del miR-214 (Penna, E, Orso, F et al. (2011). "microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C". EMBO J 30: 1990-2007). È stato quindi determinato se miR-214sponge fosse in grado di agire su queste due molecole quando le cellule 4175-TGL 214, MA-2 214 o SKBR3 sono state trattate con l'aptamero anti-axl da solo, con axl-miR-214sponge, con scr-miR-214sponge o non sono state trattate (ctrl) o, in alternativa, sono state trasfettate con l'anti-214 o anti-ctrl. Come mostrato, axl-miR-214sponge aumenta

l'espressione proteica di TFAP2 γ e ITG α 3 rispetto al ctrl, anti-*axl* o scr-miR-214sponge nelle cellule esprimenti *axl* (Figura 4a-b), ma nessun effetto è presente quando le cellule SKBR3 sono state trattate con le stesse condizioni (Figura 4c). Inoltre, tutte le linee cellulari hanno mostrato una riduzione dei geni bersaglio quando trasfettate con l'anti-214 rispetto all'anti-ctrl. In parallelo, il miR-214 coordina un pathway che include non solo le molecole di adesione (ITG α 3) e i fattori di trascrizione (TFAP2 γ), ma anche il miRNA anti-metastatico miR-148b e i suoi bersagli diretti come ALCAM e ITG α 5 (Penna, E, et al. (2013) "miR-214 coordinates melanoma progression by upregulating ALCAM through TFAP2 and miR-148b downmodulation", Cancer Res 73: 4098-4111). Anche *axl*-miR-214sponge è in grado di agire sui bersagli indiretti del miR-214, di conseguenza, quando le cellule *axl*-positive sono state trattate con il complesso chimerico, è stata osservata una diminuzione dei livelli proteici di ALCAM (Figura 4d-e) mentre nessun effetto è stato rilevato nelle cellule SKBR3 (Figura 4f). Questi dati indicano che *axl*-miR-214sponge funziona non solo sui bersagli diretti del miR-214, ma anche sull'asse che forma col miR-148b.

Il complesso chimerico axl-miR-214sponge riduce il numero e le dimensioni delle mammosfere

Per testare se il coniugato axl-miR-214sponge sia in grado di agire su un modello 3D, è stato effettuato un saggio di mammosfere. Nello specifico, le singole cellule delle linee 4175-TGL 214 o SKBR3 sono state piastrate (giorno 0) e trattate al giorno 0, 3 e 5 con gli aptameri axl, axl-miR-214sponge o scr-miR-214sponge o non sono state trattate (ctrl), e le mammosfere sono state analizzate al giorno 5 (Figura 5a). Quando le mammosfere derivate dalle cellule esprimenti axl 4175-TGL 214 sono state esaminate al giorno 5, è stata osservata una riduzione significativa del loro numero (Figura 5b) e dimensione (Figura 5c) nelle cellule trattate con axl-miR-214sponge rispetto a quelle trattate con ctrl, axl o scr-miR-214sponge. Inoltre, quando i trattamenti summenzionati sono stati usati sulle mammosfere derivanti da cellule axl-negative SKBR3, nessun cambiamento nel numero e dimensioni è stato rilevato (Figura 5d-e). Questi dati indicano che axl-miR-214sponge controlla sia la formazione che la crescita delle mammosfere ed è in grado di penetrare anche all'interno di strutture 3D, suggerendo la possibilità che il complesso chimerico sia in grado

di entrare all'interno della massa tumorale per svolgere la sua funzione anti-tumorale.

Il complesso chimerico axl-miR-214sponge blocca la disseminazione delle cellule tumorali

Per valutare l'efficacia del complesso chimerico axl-miR-214sponge sulla disseminazione metastatica nei topi, le cellule di tumore al seno 4175-TGL esprimenti la RFP pretrattate per 24 ore con l'aptamero anti-axl o con axl-miR-214sponge sono state iniettate nella ghiandola mammaria dei topi immunocompromessi NOD / SCID / IL2R_null (NSG) e axl o axl-miR-214sponge sono stati iniettati nella massa tumorale 3 volte a settimana a partire dal giorno 2 (Figura 6a). La formazione di metastasi è stata analizzata 23 giorni dopo l'iniezione delle cellule tumorali ed è stata osservata una riduzione del numero di metastasi polmonari (Figura 6b) nei topi trattati con axl-miR-214sponge rispetto a quelli trattati con axl. Analisi sulla massa primaria tramite H&E hanno mostrato un aumento della necrosi (Figura 6c), mentre analisi di immunoistochimica sulla caspasi-3 clivata e KI67 hanno mostrato un aumento dell'apoptosi (Figura 6d), ma nessuna alterazione nella proliferazione (Figura 6e) nei tumori trattati con il complesso chimerico rispetto

a quelli iniettati con axl da solo. È importante notare che in seguito alla somministrazione dell'aptamero da solo o coniugato alla sponge del miR-214, non è stata osservata alcuna tossicità. Infatti, non sono presenti alterazioni morfologiche o di peso negli organi analizzati, ovvero fegato, milza e reni (Figura 7a-c). In un altro esperimento, sono state iniettate le cellule 4175-TGL e dal giorno 3 ai topi è stato iniettato nella vena della coda PBS o axl-miR-214spongePEG (Figura 8a), un complesso che differisce da axl-miR-214sponge per l'aggiunta di una molecola di PEG al 5' che ha lo scopo di aumentare il peso del complesso chimerico e, di conseguenza, di ridurre la sua filtrazione renale, aumentando la sua persistenza in circolo. Nei topi in cui è stato iniettato il complesso è stata osservata una riduzione delle metastasi polmonari rispetto ai topi a cui è stato iniettato PBS, indicando che è possibile una somministrazione sistemica del composto (Figura 8b).

RIVENDICAZIONI

1. Complesso chimerico isolato comprendente:

a) un aptamero anti-*axl* comprendente dall'estremità 5' all'estremità 3':

(i) una sequenza di acido nucleico a singolo filamento atta a legarsi al recettore tirosina-chinasi *axl*;

(ii) un elemento linker consistente di una catena alchilica lineare non sostituita contenente da 4 a 20 atomi di carbonio; e

(iii) una prima sequenza adesiva consistente di una sequenza di acido nucleico a singolo filamento di 15 a 20 basi di lunghezza; e

b) un oligonucleotide contenente una sponge a DNA diretta contro miR-214, l'oligonucleotide comprendendo dall'estremità 5' all'estremità 3':

(iv) una sequenza di legame consistente di una sequenza di DNA a singolo filamento contenente una pluralità di regioni di legame per il miR-214 inframmezzate da una o più regioni di collegamento, e

(v) una seconda sequenza adesiva consistente di una sequenza di DNA a singolo filamento avente la medesima lunghezza in basi della prima sequenza

adesiva identificata in (iii) e ad essa complementare.

2. Complesso chimerico isolato secondo la rivendicazione 1, in cui l'aptamero anti-axl è un aptamero a RNA o un aptamero a DNA.

3. Complesso chimerico isolato secondo la rivendicazione 1, in cui la sequenza di acido nucleico a singolo filamento atta a legarsi al recettore tirosina-chinasi axl identificata in (i) è SEQ ID NO:1 o la sequenza di DNA ad essa corrispondente in cui ciascuna U (uridina) di SEQ ID NO:1 è sostituita da una dU (desossiuridina).

4. Complesso chimerico isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, in cui la prima sequenza adesiva identificata in (iii) è SEQ ID NO:2 o la sequenza di DNA ad essa corrispondente in cui ciascuna U (uridina) di SEQ ID NO:2 è sostituita da una dU (desossiuridina).

5. Complesso chimerico isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, in cui la seconda sequenza adesiva identificata in (v) è SEQ ID NO:4.

6. Complesso chimerico isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, in cui la catena alchilica lineare non sostituita identificata in (ii) contiene 6 to 18 atomi di carbonio.

7. Complesso chimerico isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6, in cui la sequenza di legame identificata in (iv) è scelta dal gruppo che consiste di SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:28.

8. Complesso chimerico isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 7, in cui una o più basi pirimidiniche sono sostituite con la corrispondente 2'-fluoropirimidina.

9. Complesso chimerico isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 8, in cui una o più basi puriniche sono sostituite con la corrispondente 2'-O-metilpurina.

10. Complesso chimerico isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 9, per l'impiego nel trattamento terapeutico di un tumore esprimente il recettore tirosina chinasi axl.

11. Complesso chimerico isolato per l'impiego secondo la rivendicazione 10, in cui il tumore è

caratterizzato dalla sovraespressione del recettore tirosina-chinasi *axl* e del miR-214.

12. Complesso chimerico isolato per l'impiego secondo la rivendicazione 10, in cui il tumore è scelto dal gruppo che consiste di melanoma, tumore del pancreas, tumore dello stomaco, tumore della prostata, tumore del polmone, tumore al seno, tumore ovarico.

13. Complesso chimerico isolato per l'impiego secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 10 a 12, in cui il trattamento inibisce o riduce l'insorgenza e/o la progressione della metastasi.

14. Composizione farmaceutica comprendente un complesso chimerico isolato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 9 ed almeno un veicolo, eccipiente e/o diluente farmaceuticamente accettabile.

15. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 14, che è in una forma farmaceutica idonea alla somministrazione per via sottocutanea, intravascolare endovenosa, intravascolare intraarteriosa, intraperitoneale, intramuscolare, intranasale, inalatoria o intra-tumorale.

16. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 14 o 15, per l'impiego nel

trattamento terapeutico di un tumore esprime il recettore tirosina chinasi *axl*.

17. Composizione farmaceutica per l'impiego secondo la rivendicazione 16, in cui il tumore è caratterizzato dalla sovraespressione del recettore tirosina-chinasi *axl* e del miR-214.

18. Composizione farmaceutica per l'impiego secondo la rivendicazione 16, in cui il tumore è scelto dal gruppo che consiste di melanoma, tumore del pancreas, tumore dello stomaco, tumore della prostata, tumore del polmone, tumore al seno, tumore ovarico.

19. Composizione farmaceutica per l'impiego secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 16 a 18, in cui il trattamento inibisce o riduce l'insorgenza e/o la progressione della metastasi.

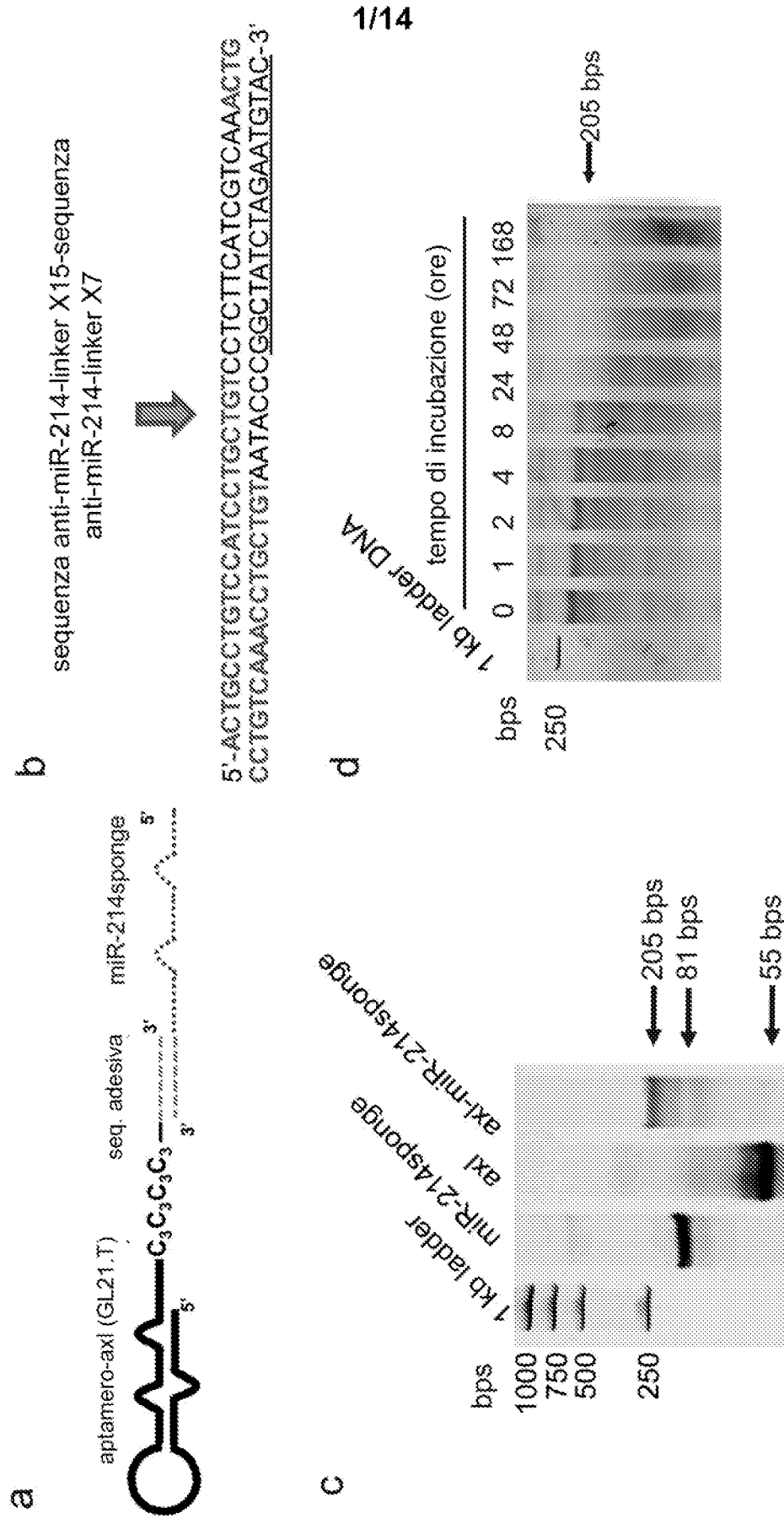
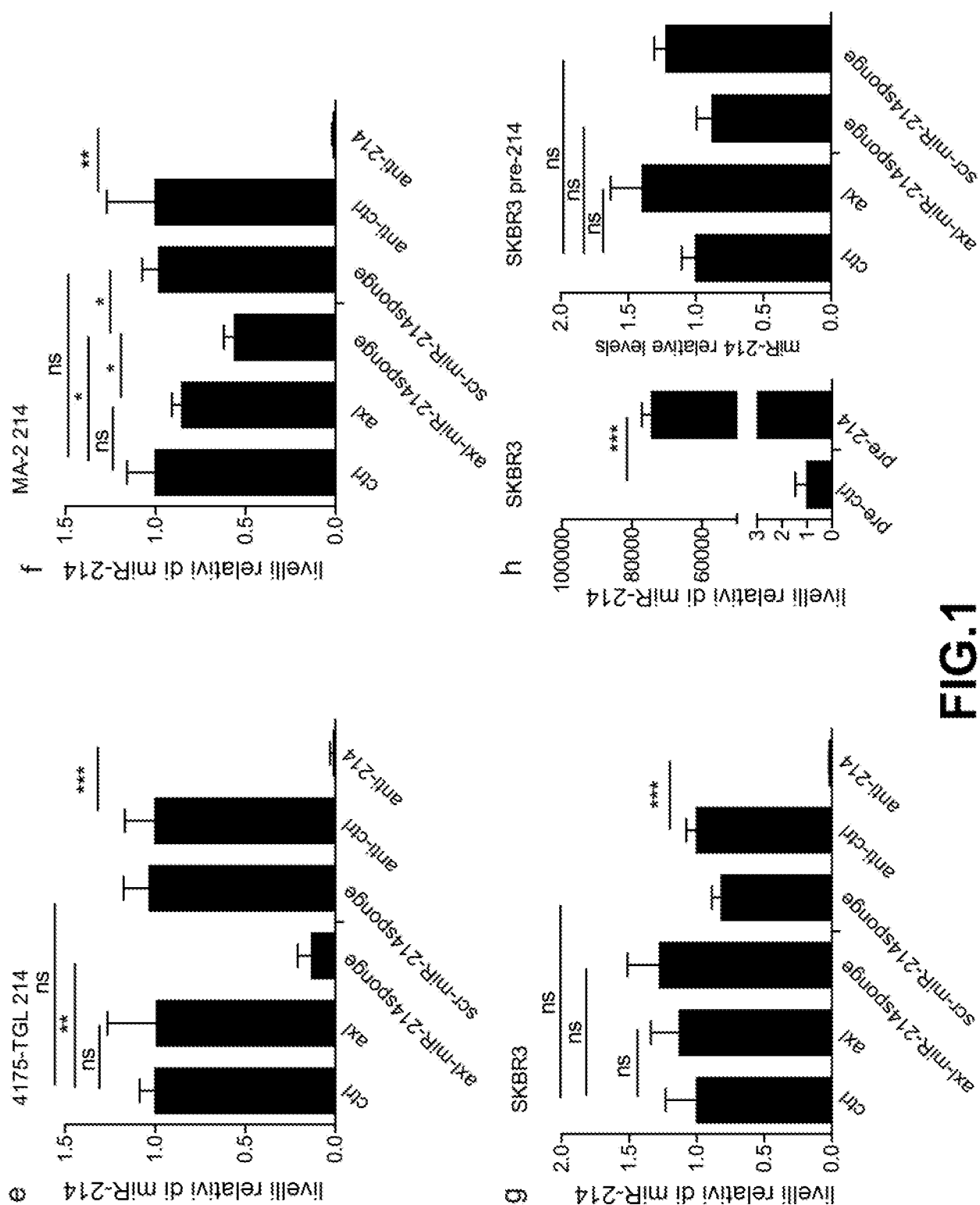


FIG.1

FIG.1



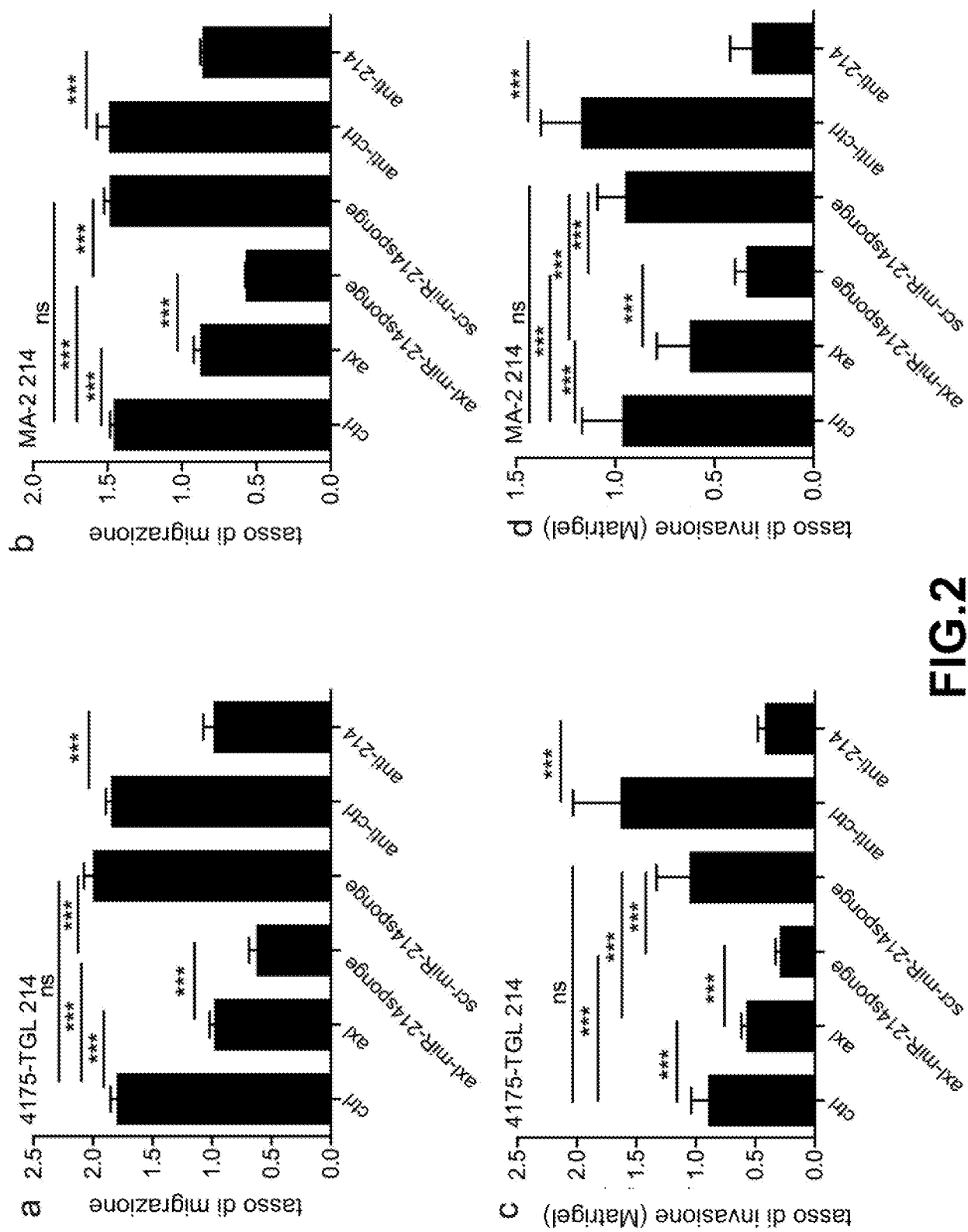
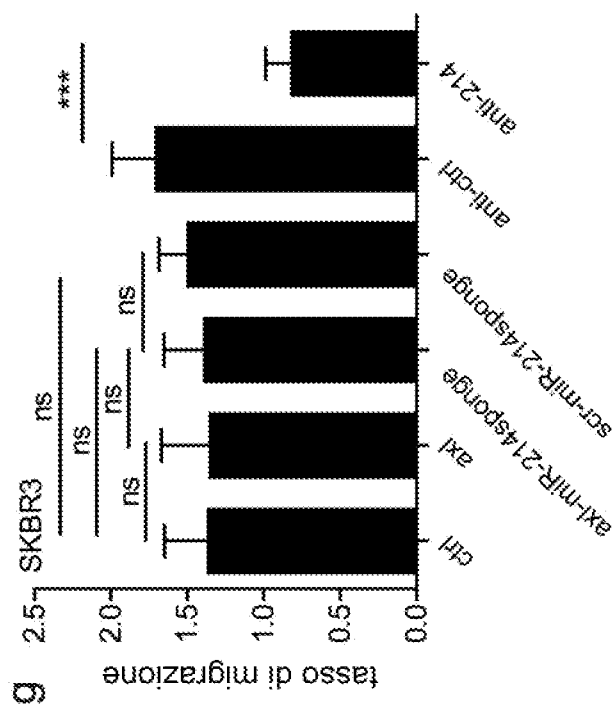
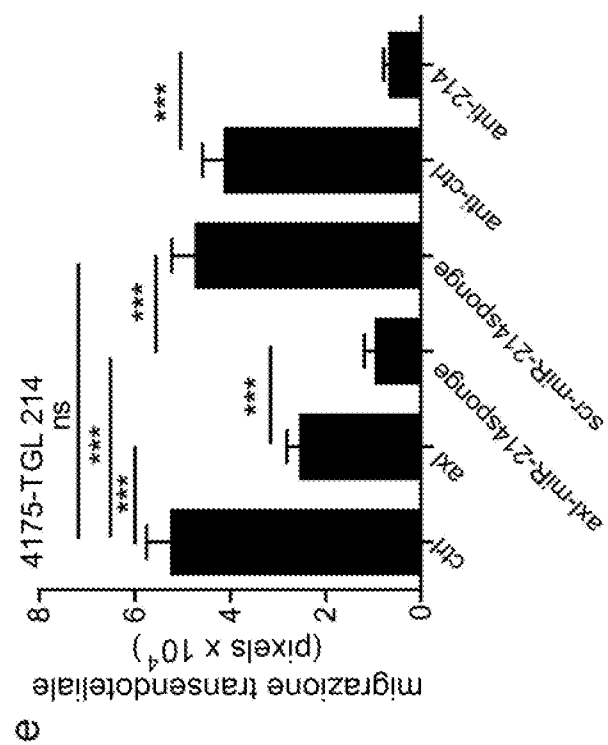
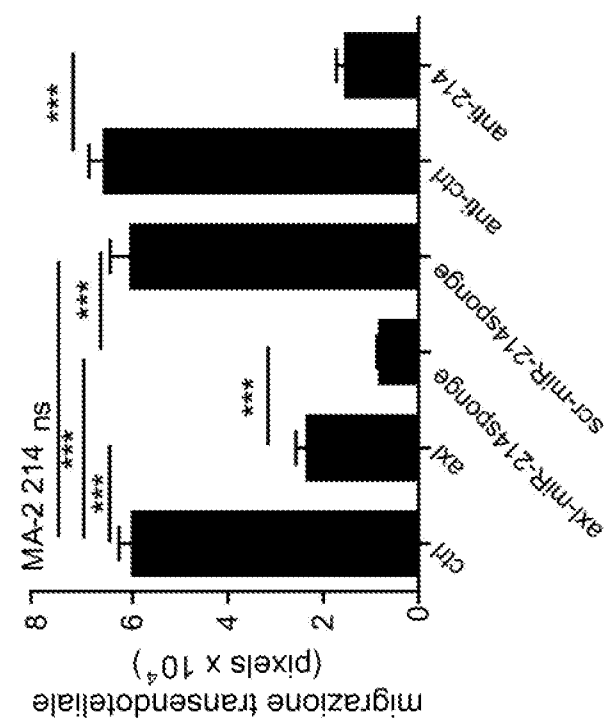


FIG.2

FIG.2



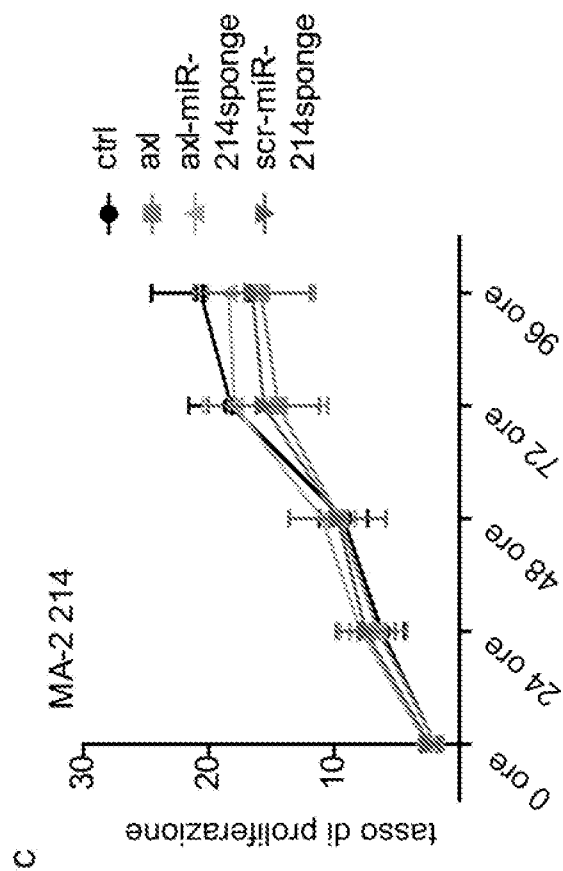
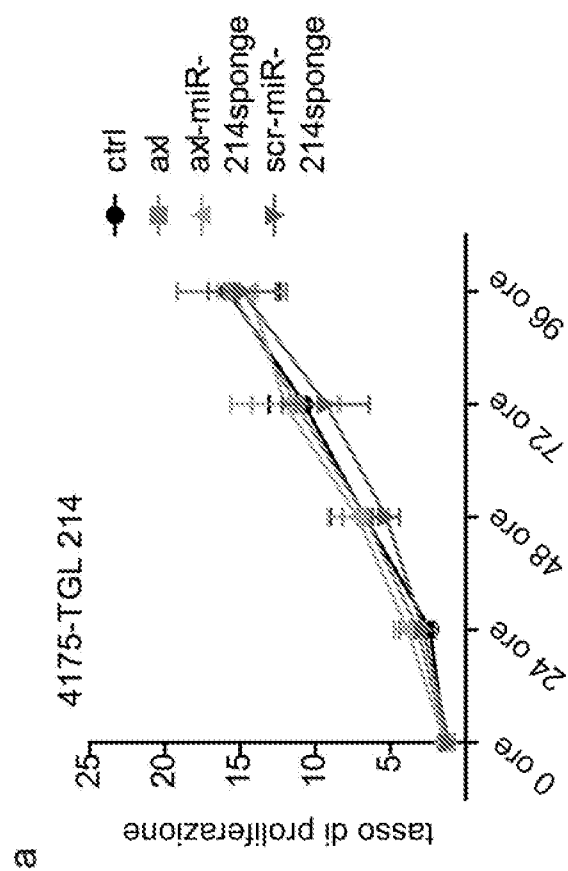
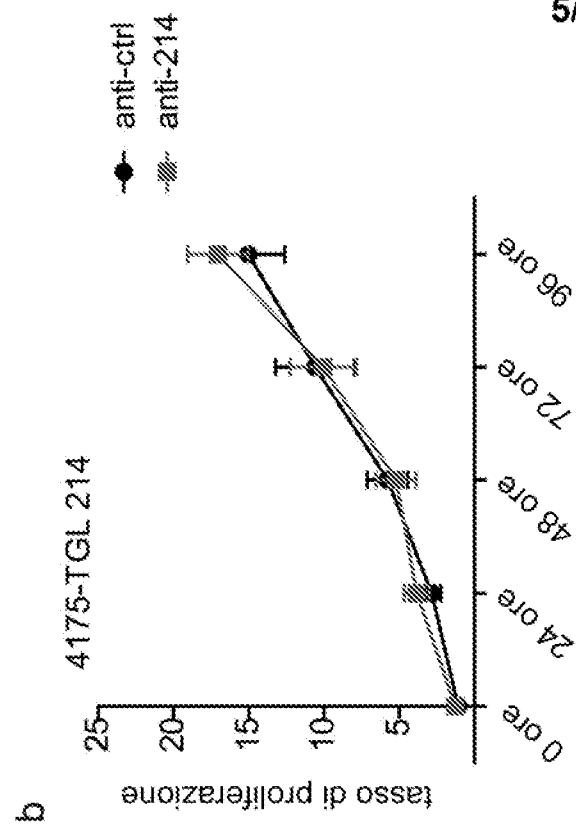


FIG.3

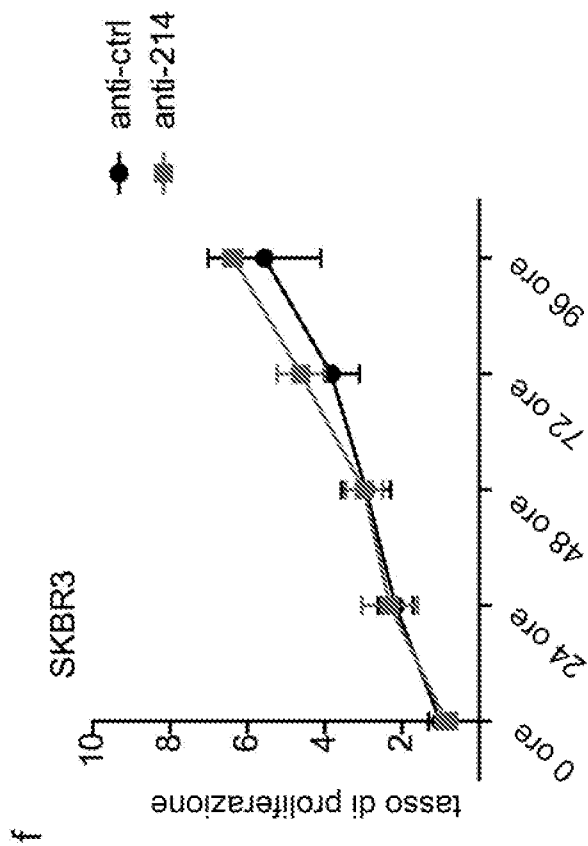
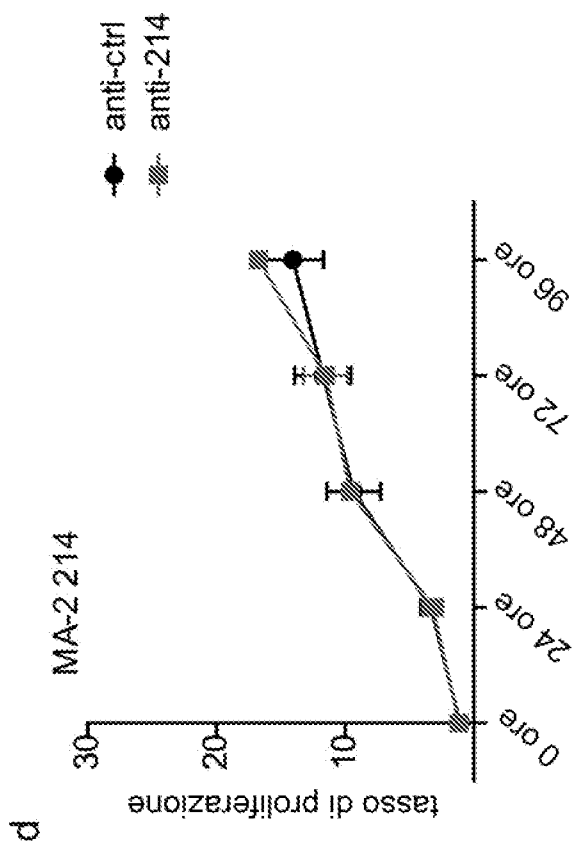
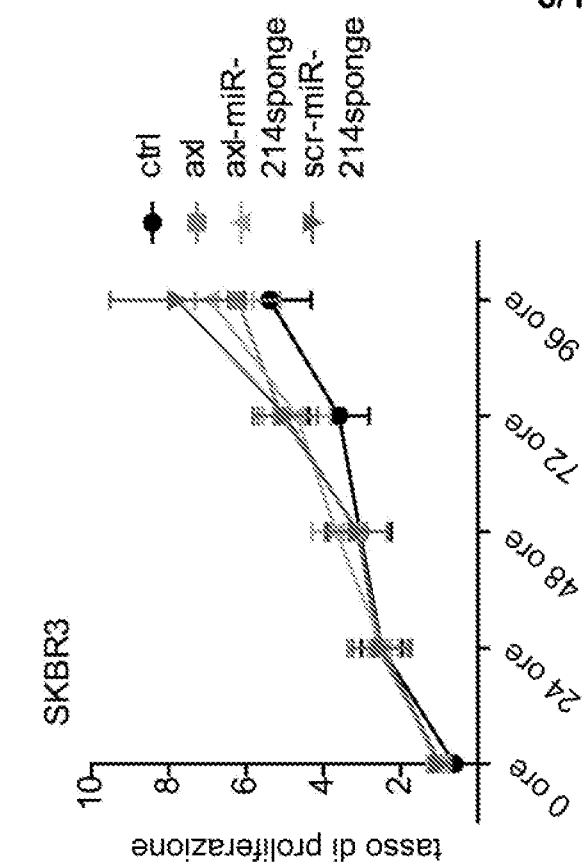


FIG.3

7/14

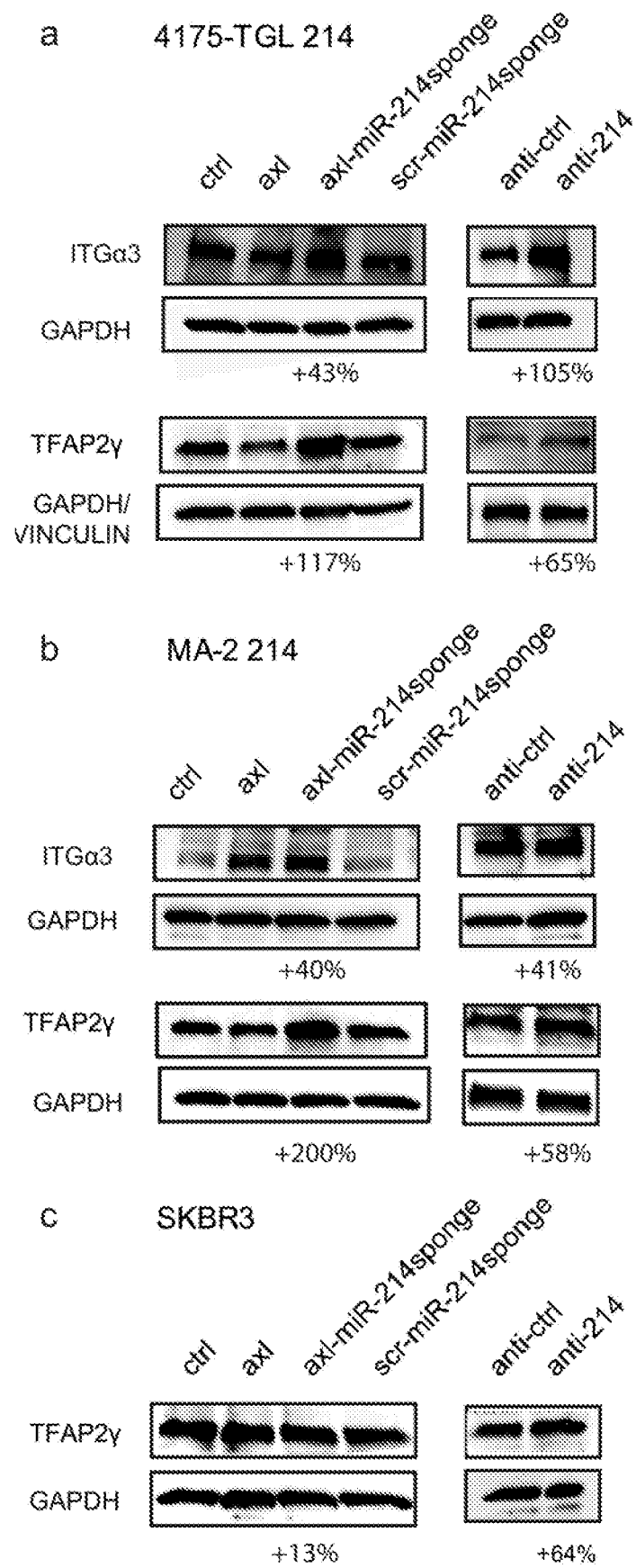
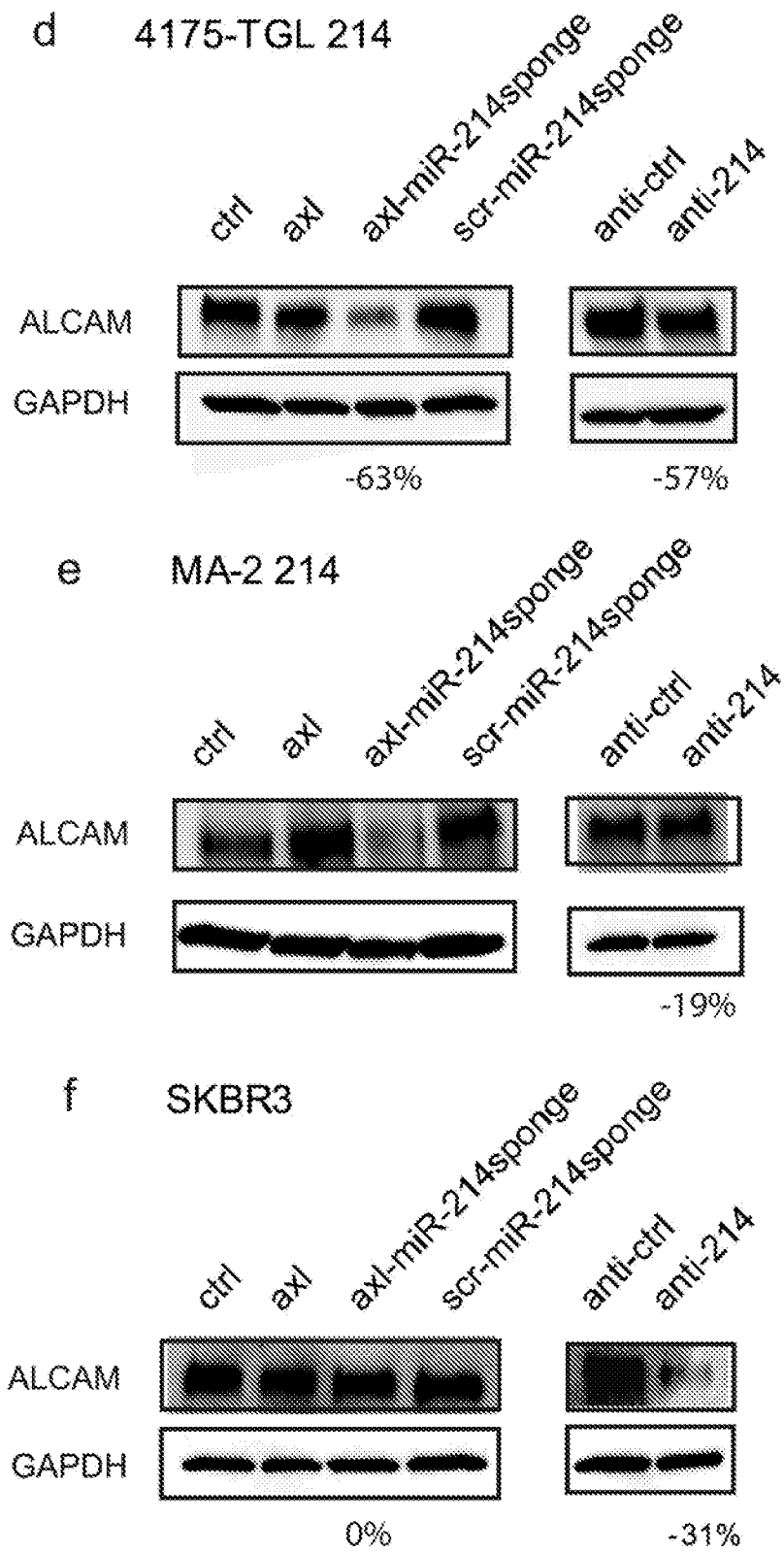
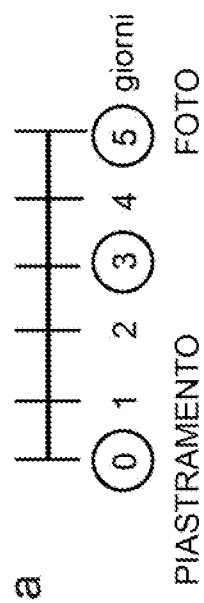


FIG.4

**FIG.4**



○ = TRATTAMENTO

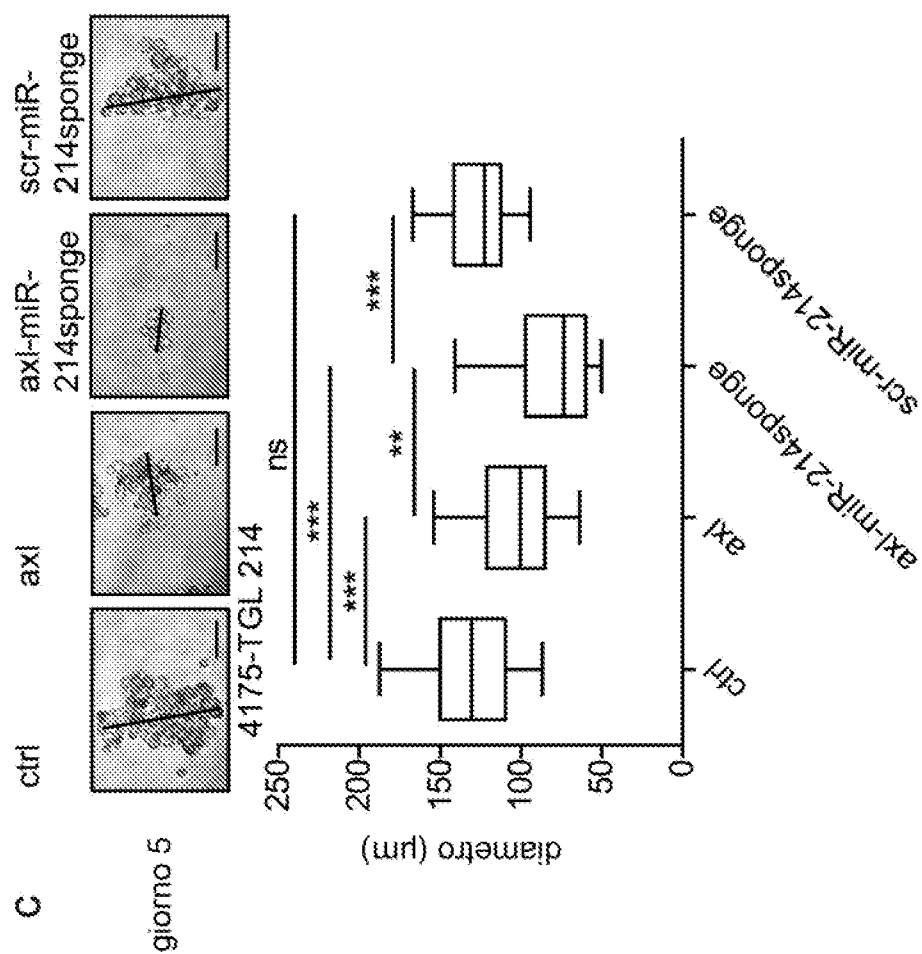
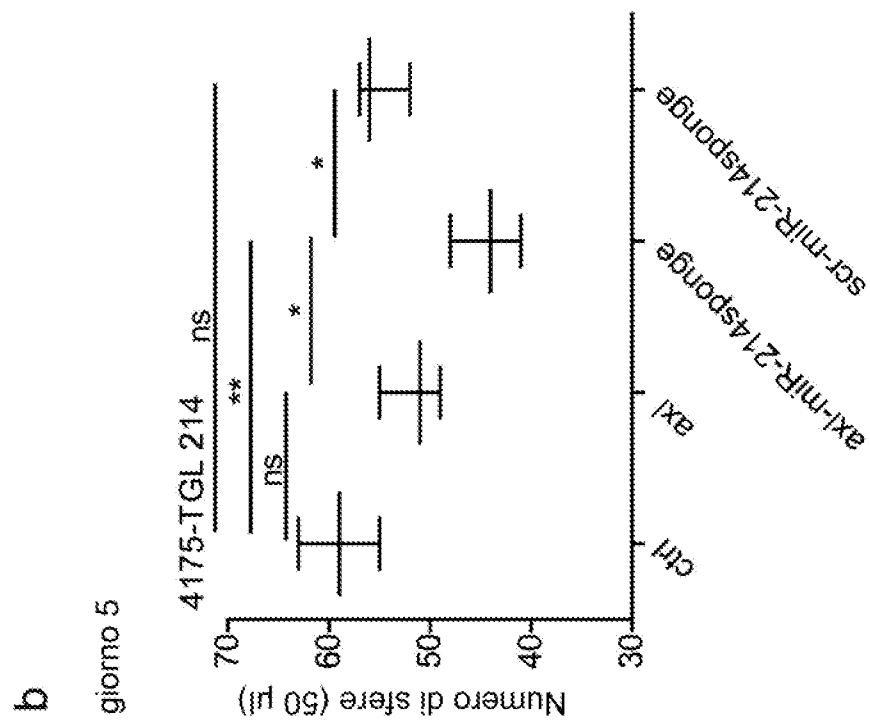
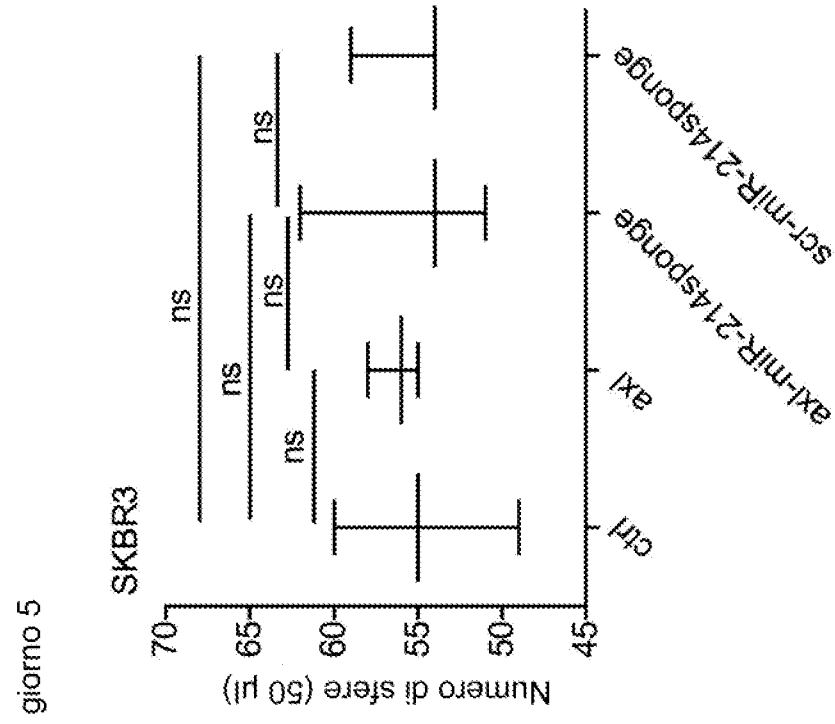


FIG.5

d



e

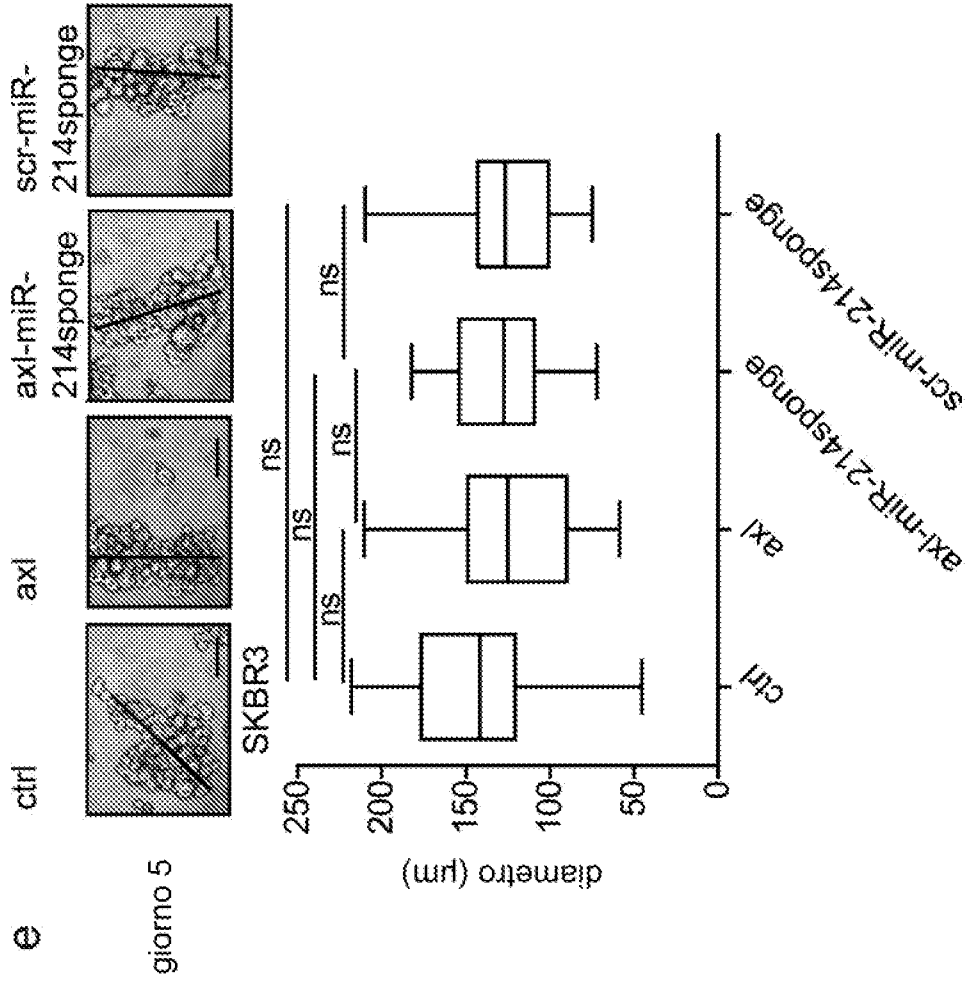
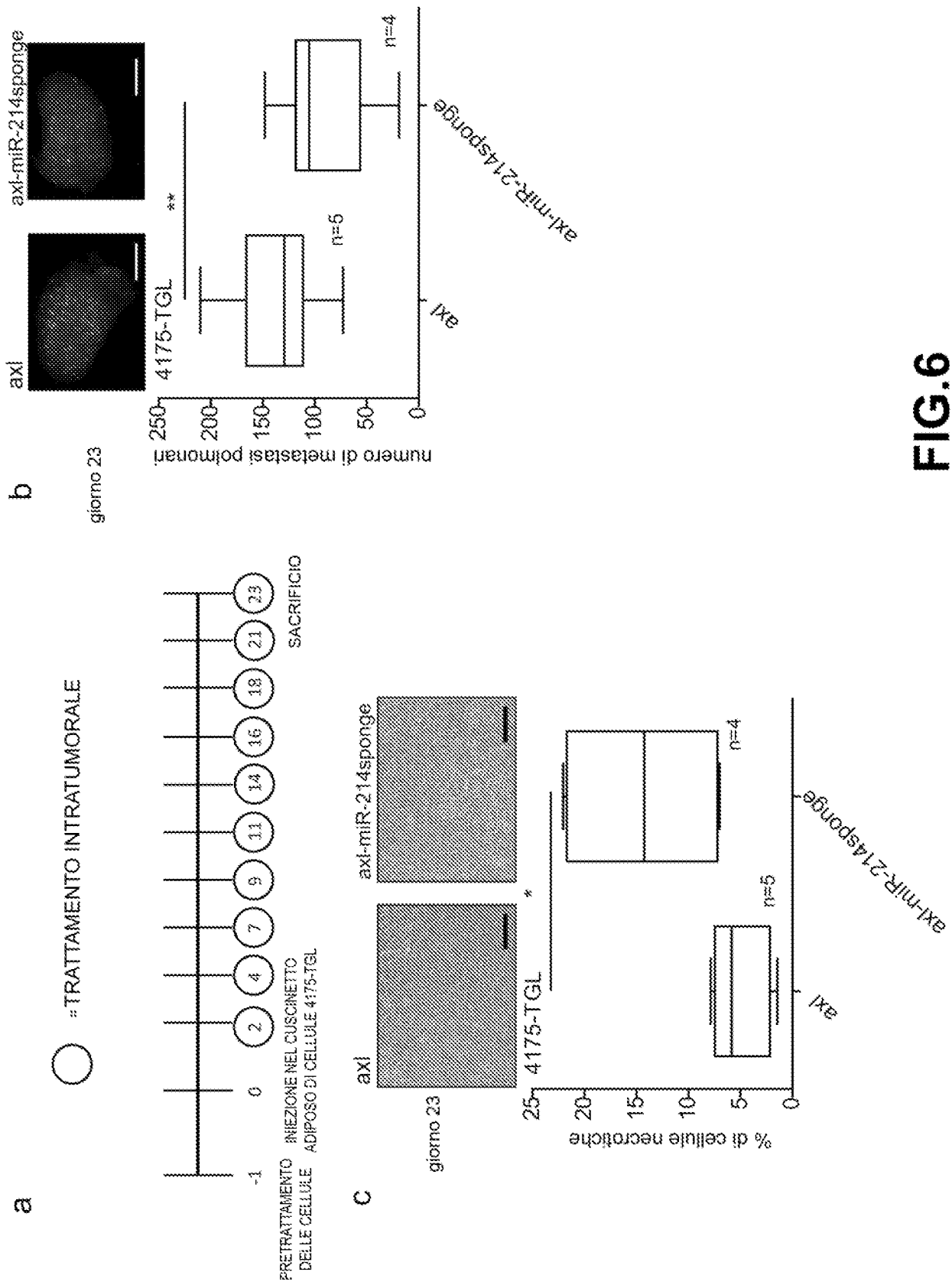


FIG.5

**LEGG**

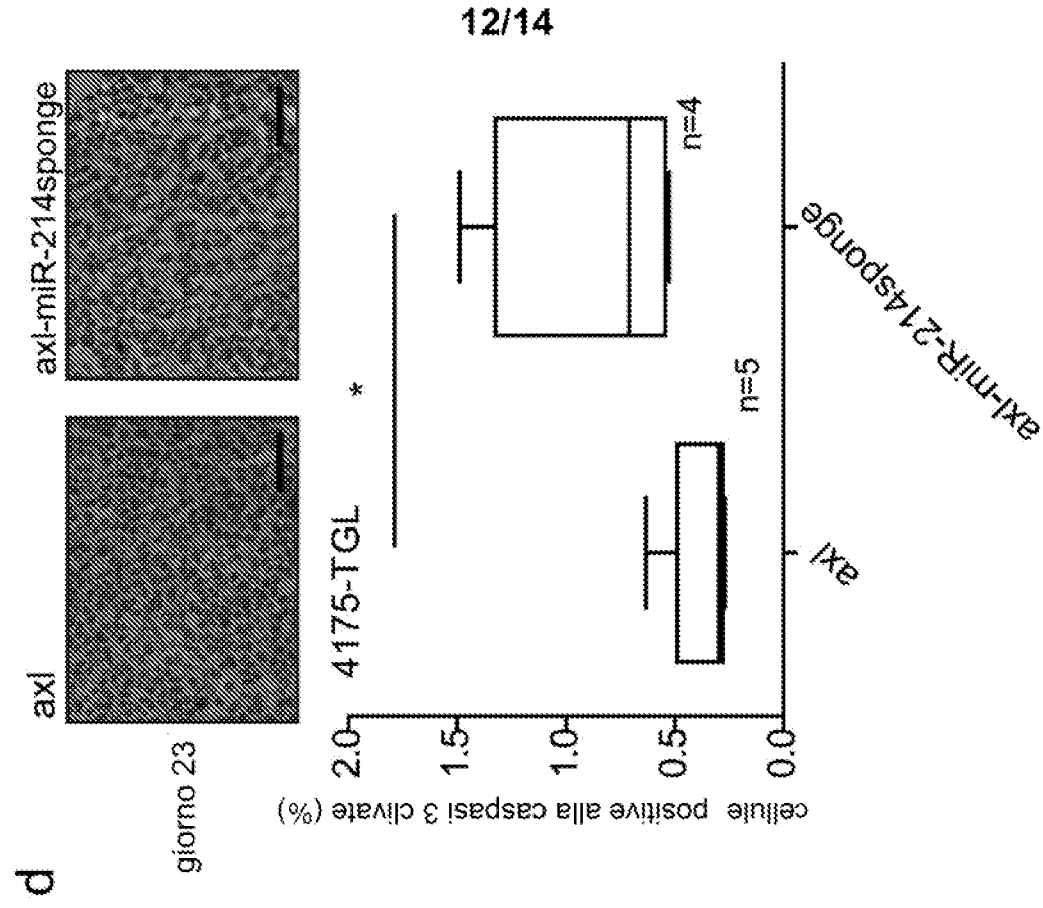
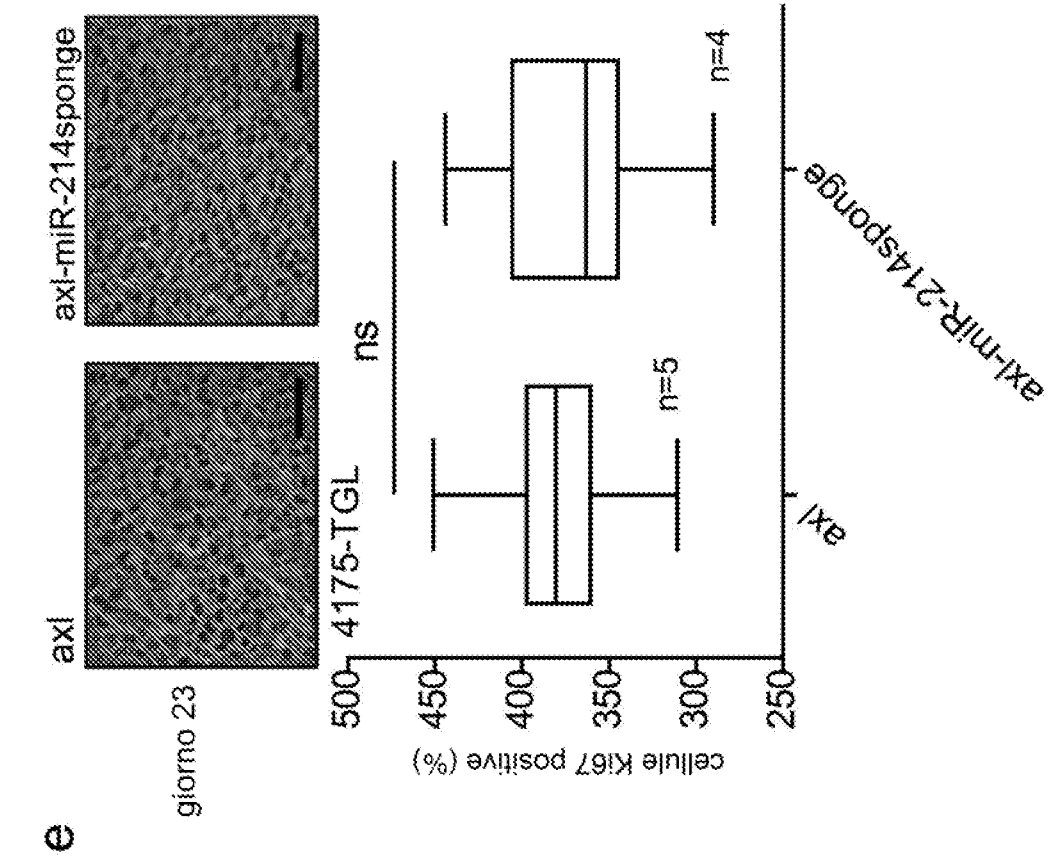


FIG.6

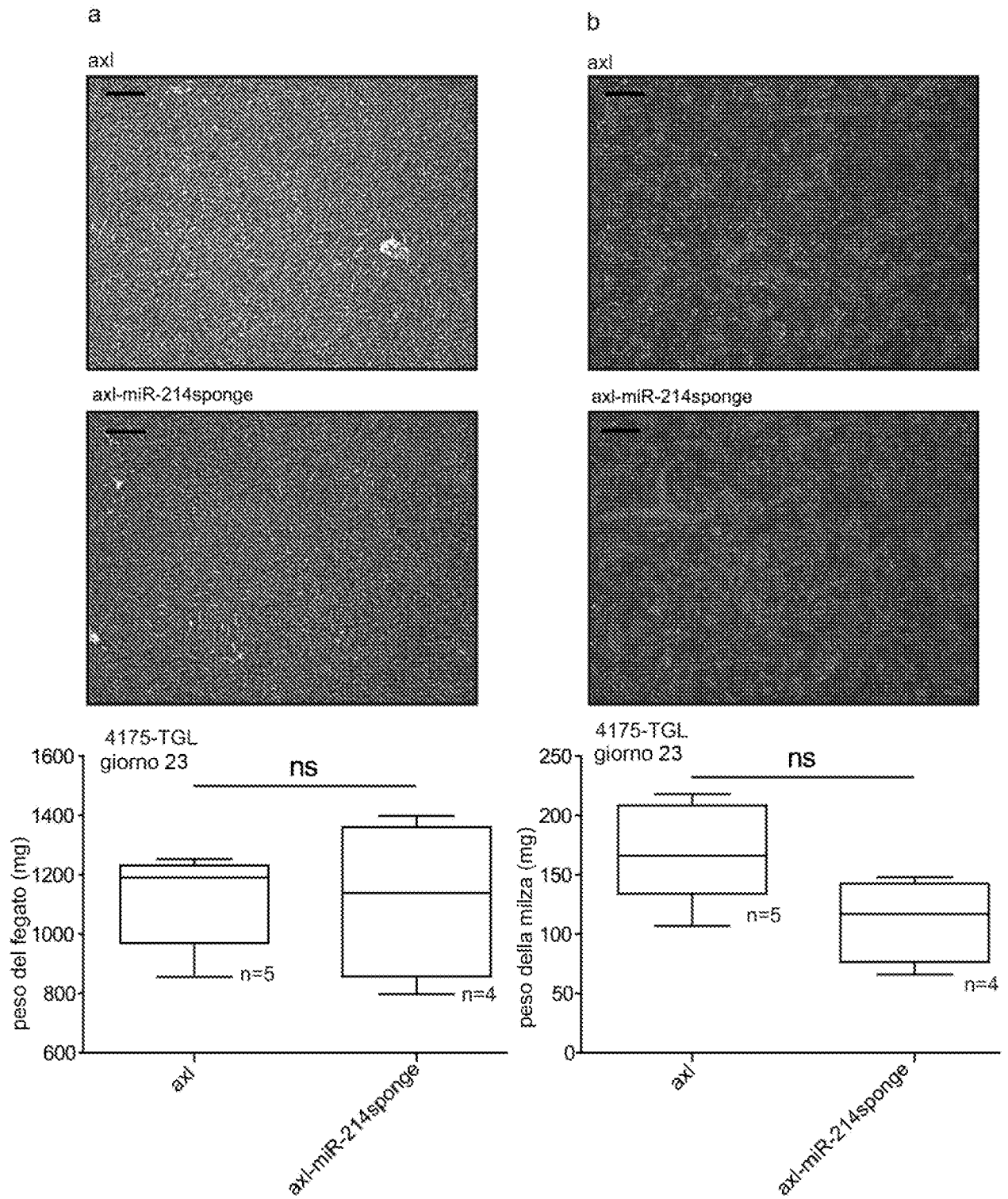


FIG.7

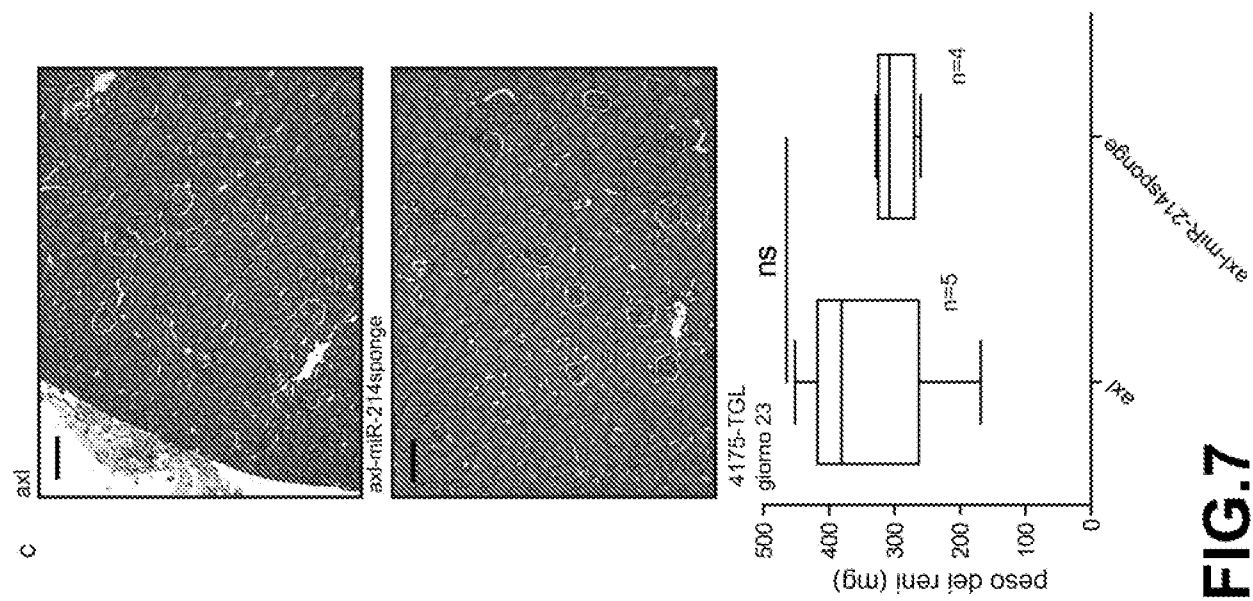


FIG.7

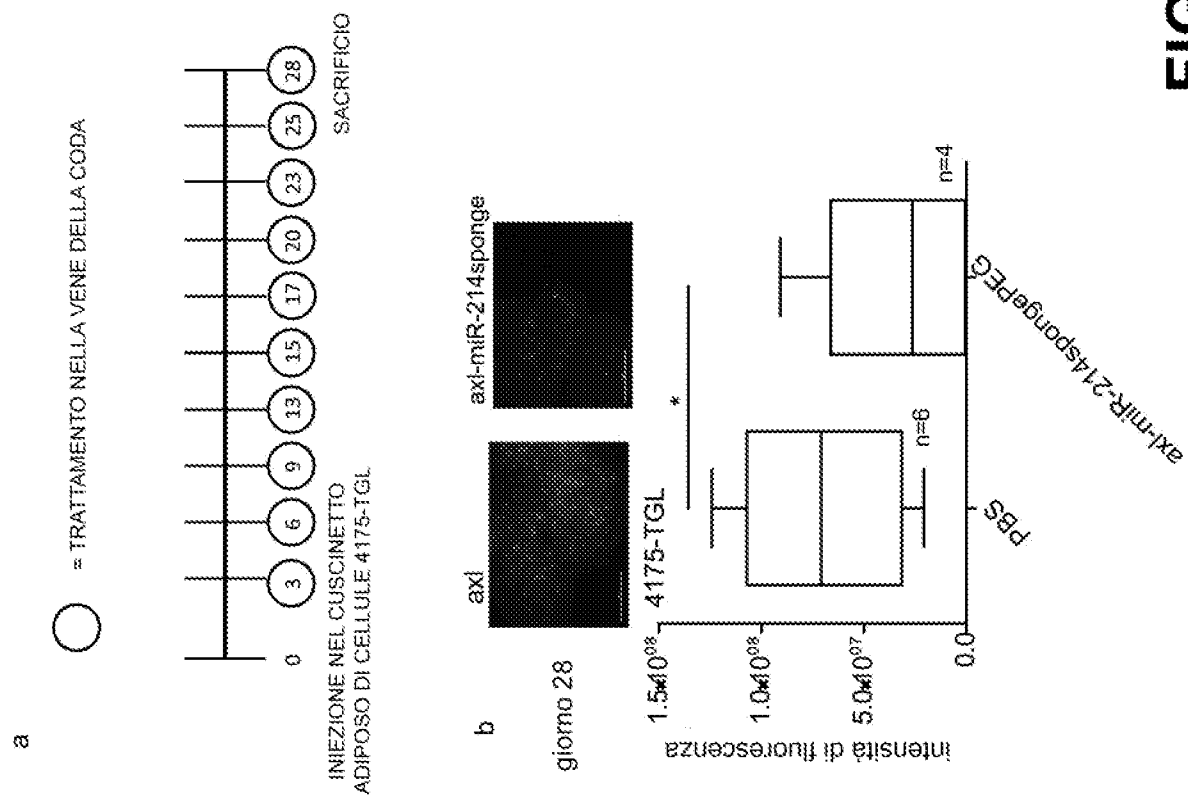


FIG.8