

UIBM

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102022000026595
Data Deposito	22/12/2022
Data Pubblicazione	22/06/2024

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	7105

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N	15	113

Titolo

NUOVI INIBITORI DI REGOLATORI EPIGENETICI

Deposito della domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

NUOVI INIBITORI DI REGOLATORI EPIGENETICI

DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione ha ad oggetto un agente terapeutico per l'uso nel trattamento di una patologia associata al guadagno di funzione (*gain-of-function*) del recettore degli androgeni (AR) e/o alla sovraespressione di un coattivatore di AR, come ad esempio la malattia di Kennedy o il cancro.

- 5 L'agente terapeutico dell'invenzione comprende almeno un inibitore di almeno un coattivatore del recettore degli androgeni (AR), selezionato tra un inibitore della proteina arginina metiltransferasi 6 (PRMT6), inibitore della demetilasi 1 specifica della lisina (LSD1), o rispettive combinazioni.

AMBITO TECNICO

- 10 AR è un fattore di trascrizione attivato dagli androgeni. Allo scopo di espletare correttamente le proprie funzioni pleiotropiche nei diversi tessuti, l'AR interagisce con coregolatori trascrizionali. Nello stato privo di ligandi, l'AR principalmente, ma non esclusivamente, si localizza nel citosol e si associa alle proteine da shock termico. All'atto del legame con gli androgeni, l'AR si dissocia dalle proteine da shock termico e trasloca 15 nel nucleo, ove si lega agli elementi che rispondono agli androgeni (*androgen-responsive elements*, ARE) presenti nel promotore o negli elementi enhancer dei propri geni target, per regolare l'espressione genica.

- La regolazione trascrizionale agisce in modo sia sequenziale, sia combinatorio per riorganizzare la cromatina. In tale riorganizzazione dinamica, risulta centrale la modifica 20 degli istoni del core. Le code N-terminali degli istoni sono soggette a diverse modifiche covalenti, quali acetilazione, fosforilazione, ubiquitinazione e metilazione, mediante specifici enzimi di modifica della cromatina.

- I cofattori (altresì denominati coregolatori) sono impiegati per l'attività corretta dei recettori degli steroidi. Sono noti quasi 300 coregolatori di AR, i quali agiscono da 25 coattivatori o corepressori con l'AR nella regolazione dell'espressione genica.

Le espansioni polyQ alterano la funzione nativa dell'AR, determinando un'espressione genica aberrante sia nei motoneuroni, sia nelle cellule muscolari.

L'atrofia muscolare bulbo spinale (SBMA), altresì nota come malattia di Kennedy, è una patologia neuromuscolare a insorgenza tardiva, legata al cromosoma X, provocata dalle espansioni di microsatelliti (≥ 38 ripetizioni) di una ripetizione in tandem di triplettie CAG codificanti glutammina (Q) nell' esone 1 del gene del recettore degli androgeni (AR), così determinando la produzione di un AR con un tratto poliQ elongato in modo aberrante¹. La SBMA appartiene alla famiglia delle patologie provocate dalle espansioni della poliglutammina (poliQ), le quali includono la malattia di Huntington (HD), l'atrofia dentato-rubro-pallido-luisiana, nonché sei tipi di atassia spinocerebellare (SCA)². La SBMA colpisce 2–5 persone su 100.000 a livello mondiale.

La SBMA si caratterizza per la degenerazione selettiva dei motoneuroni inferiori^{3,4}. La ricerca più recente dimostra altresì il coinvolgimento primario dei tessuti periferici, come ad esempio il muscolo scheletrico⁵. La SBMA si caratterizza per la degenerazione selettiva dei motoneuroni inferiori. Le caratteristiche cliniche della SBMA includono indebolimento muscolare progressivo a insorgenza tardiva, affaticamento e fascicolazioni, disfagia, disfunzione endocrina e sindrome metabolica da lieve a moderata, e, in alcuni individui, disfunzione cardiaca.

I fenotipi sono ampiamente attribuiti al guadagno di funzione (GOF) tossico dell'AR poliQ-espanso. Ancora deboli segnali di insensibilità agli androgeni e di anomalie endocrine implicano altresì una perdita di funzione (*loss-of-function*, LOF) parziale di AR in tale condizione¹. Una fase necessaria per la tossicità è data dal legame dell'AR con i suoi leganti naturali, il testosterone e il suo derivato più potente diidrotestosterone (DHT)⁸. Pertanto, la SBMA risulta unica fra le patologie poliQ per la sua specificità sessuale (nell'uomo così come in modelli di mosche e murini): i maschi sviluppano sintomi gravi, mentre le femmine sviluppano sintomi lievi o non sviluppano alcun sintomo, anche se omozigoti per la mutazione.

Non esiste alcuna terapia per la cura della SBMA o il ritardo dell'insorgenza e della progressione della malattia. Nonostante la natura dipendente dagli androgeni della patologia e le evidenze sperimentali supportino la castrazione chimica quale strategia terapeutica per la SBMA, gli esperimenti clinici basati su tale approccio evidenziano benefici solamente su un sottoinsieme dei pazienti³. Inoltre, l'ablazione cronica degli androgeni può aumentare i sintomi associati alla privazione degli androgeni, dall'atrofia e indebolimento muscolari, alle alterazioni metaboliche e alla depressione.

Ciò pone un limite agli approcci clinici volti a silenziare la proteina della malattia, un aspetto particolarmente rilevante per le malattie croniche, a lenta progressione come la SBMA, le quali richiedono regimi di trattamento di lungo periodo. Tale aspetto è importante per la SBMA per tre ragioni: i) qualsiasi terapia è probabilmente più efficace
 5 qualora iniziata in età puberale, in concomitanza o prima della comparsa dei sintomi; ii) qualsiasi terapia che sopprima l'AR mutante aumenterà la LOF dell'AR, aspetto che non può essere trascurato in una patologia legata al cromosoma X che colpisce i soggetti maschi; iii) i pazienti affetti da SBMA evidenziano segnali di sindrome da insensibilità agli androgeni e, relativamente a una terapia che sarà somministrata per tutta la vita del
 10 paziente, tale aspetto deve essere considerato nell'ideazione di un nuovo trattamento. L'aumento della LOF dell'AR può accentuare la disfunzione sessuale, la sindrome metabolica e il diabete, la depressione e l'atrofia muscolare. Pertanto, risultano necessarie strategie alternative per migliorare i risultati clinici.

In particolare, sussiste la necessità di agenti terapeutici innovativi che possano essere
 15 somministrati in modo cronico con effetti collaterali minimi, ossia una terapia che conservi le funzioni nucleari dell'AR pur eliminando il guadagno di funzione tossico.

Risulta noto che l'espressione disregolata dei coregolatori di AR contribuisce all'insorgenza e alla progressione del cancro alla prostata e di altri tipi di cancri dipendenti dagli ormoni, come ad esempio i cancri alla vescica, al fegato e ai reni. Nel cancro alla
 20 prostata, la sovraespressione di circa il 30% dei coregolatori di AR determina un *signalling* di AR aberrante.

Una analisi trascrittonica precedente ha identificato una sovraregolazione significativa della proteina arginina metiltransferasi 6 (PRMT6) nel muscolo scheletrico di un modello murino di SBMA. PRMT6 è un corepressore trascrizionale generale, ma anche un coattivatore dell'AR. L'espressione di PRMT6 è spesso sovraregolata anche nei cancri dipendenti dagli ormoni, come ad esempio il cancro alla prostata⁴ e il cancro al seno, e nei modelli murini di sindrome metabolica, diabete e sintomi di resistenza all'insulina, che sono altresì presenti in circa il 50% dei pazienti affetti da SBMA.

Analogamente a PRMT6, la demetilasi specifica della lisina 1 (LSD1, AOF2, o KDM1A)
 30 è un coattivatore trascrizionale dell'AR⁶ ed è sovraregolata nel cancro alla prostata⁷.

In particolare, sia LSD1, sia PRMT6 presentano un motivo di legame all'ormone steroideo, LXXLL (in cui L è leucina e X è un qualsiasi aminoacido). In modo

meccanicistico, sia PRMT6, sia LSD1 si legano alla superficie AF-2 dell'AR ubicata nel dominio di legame dell'AR tramite il loro motivo di legame all'ormone steroideo LXXLL. PRMT6 e LSD1 sono entrambe necessarie per la formazione di un complesso funzionale con l'AR, per la risposta completa agli androgeni. Il legame con gli androgeni induce 5 numerose modifiche post-traduzionali sull'AR, incluse la fosforilazione e la metilazione di lisina e arginina.

I coregolatori trascrizionali non si legano direttamente al DNA ma, al contrario, possiedono spesso un'attività enzimatica ed esercitano la loro funzione modificando le proteine istoniche, così determinando variazioni nella struttura della cromatina,

10 nell'accessibilità del fattore di trascrizione a enhancer e promotori, nel richiamo del fattore e del cofattore di trascrizione in corrispondenza di geni bivalenti, e nell'interazione con il complesso di preinizio. LSD1 catalizza la demetilazione di H3K4me1/me2. I 15 cofattori di trascrizione targetizzano altresì in modo post-traduzionale le proteine non istoniche coinvolte nella trascrizione genica. PRMT6 metila e transattiva l'alfa recettore degli estrogeni, il coattivatore trascrizionale CREB-regolato 2, la DNA topoisomerasi 3B, p16^{INK4a}, p21^{CIP1}, la DNA polimerasi beta e il gruppo a elevata mobilità A1a. Anche LSD1 targetizza le proteine non istoniche, incluse Forkhead Box A1, DNA metiltransferasi 1, p53, fattore alfa inducibile dall'ipossia, recettore alfa correlato agli estrogeni, e E2F.

20 LSD1 e PRMT6 transattivano, in modo sinergico, l'AR stesso.

Gli inventori hanno scoperto che si verifica un meccanismo di *feed-forward* nello stato patologico, come ad esempio SBMA o cancro, in cui il guadagno di funzione (GOF) tossico dell'AR aumenta l'espressione dei propri coregolatori positivi, PRMT6 e LSD1, i quali, a loro volta, potenziano ulteriormente la funzione dell'AR, determinando una 25 disregolazione patologica dell'espressione dei geni target dell'AR.

Inaspettatamente, gli inventori hanno fornito una prova di principio che la targetizzazione selettiva di tali coregolatori di AR, i quali sono sovraespressi in modo aberrante nelle malattie associate all'AR, rappresenta una strategia terapeutica efficace per i pazienti, senza aumentare la LOF dell'AR.

30 **BREVE DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE**

I limiti della tecnica nota sono superati dalla presente invenzione, la quale fornisce nuovi agenti terapeutici per il trattamento di patologie associate al guadagno di funzione del

recettore degli androgeni (AR) e/o alla sovraespressione di un coattivatore di AR, i quali agiscono mediante l'inibizione di coattivatori di AR sovraespressi.

La presente invenzione ha ad oggetto, in particolare, un agente terapeutico così come riportato nelle presenti rivendicazioni. Preferibilmente, l'agente terapeutico comprende o
5 consiste in un silenziatore genetico di un coattivatore di AR, o un inibitore a piccola molecola di un coattivatore di AR, o rispettive combinazioni. Più preferibilmente, l'agente terapeutico comprende molecole l'RNA interferenti o agenti di editing genomico che targetizzano PRMT6, LSD1, o rispettive combinazioni.

Inoltre, la presente invenzione ha ad oggetto nuovi silenziatori genetici che targetizzano
10 i trasritti di PRMT6 e/o LSD1.

L'invenzione sarà meglio compresa dalla descrizione dettagliata che segue, ove letta in combinazione con i disegni di accompagnamento.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La Fig. 1 mostra la sovraespressione dipendente dagli androgeni, precoce e permanente,
15 di LSD1 e PRMT6 nel muscolo scheletrico di topi e pazienti affetti da SBMA.

a) Analisi RT-PCR dei livelli di trascritti di *Lsd1* e *Prmt6* nei tessuti indicati di topi maschi WT e AR100Q nella fase pre-sintomatica (4 settimane), all'inizio della patologia (8 settimane), e a una fase tardiva (12 settimane) (n = 3–5 topi/genotipo).

b) Western blot dei livelli di LSD1 e PRMT6 nel muscolo quadricipite di topi WT e AR100Q di 12 settimane (n = 4 topi/genotipo). La quantificazione è mostrata in fondo.

c) Analisi RT-PCR dei livelli di trascritti di *Lsd1* e *Prmt6* nel muscolo quadricipite di topi femmina WT e AR100Q topi (n = 4 topi/genotipo).

d) Analisi RT-PCR dei livelli di trascritti di *Lsd1* e *Prmt6* nel muscolo EDL di topi maschio AR100Q di 8 settimane sottoposti a operazione *sham*- e castrati chirurgicamente (n = 3–4 topi/genotipo).

e) Analisi RT-PCR dei livelli di trascritti di *Lsd1* e *Prmt6* nel muscolo quadricipite di topi maschi knock-in di 24 settimane esprimenti AR113Q (n = 3–4 topi/genotipo).

f) Analisi RT-PCR dei livelli di trascritti di *Lsd1* e *Prmt6* in mioblasti C2C12 stabilmente trasdotti con vettore lentivirale vuoto (*mock*) o vettore di espressione di AR100Q e differenziati in miotubi in presenza di DHT (10 nM, 10 giorni, n = 3–5 replicati biologici).

- g) Analisi RT-PCR dei livelli di trascritti di *LSD1* e *PRMT6* di biopsie del muscolo quadricipite di soggetti di controllo (CTR) e di pazienti affetti da SBMA (n = 5 partecipanti/genotipo).
- h) Saggi di immunoprecipitazione di cromatina (ChIP) in mioblasti C2C12 di espressione di AR24Q e AR100Q e trattati con veicolo e DHT (10 nM, 12 h). Viene mostrato un esperimento rappresentativo di tre replicati tecnici. *LSD1* e *PRMT6* sono state rilevate con anticorpi specifici, e si è usata calnexina (CNX) quale controllo di carico. I grafici mostrano media ± SEM; Student t-test (b, e, f, g, h), o ANOVA a due vie seguito da test Tukey HSD (a, c, d), * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001.
- La Fig. 2 mostra che *LSD1* è un coattivatore di AR poliQ-espanso.
- a) Test di ligazione di prossimità (PLA) in cellule MN1 derivate da motoneuroni esprimenti AR24Q e AR100Q e trattate con veicolo o DHT (10 nM, 16 h). I nuclei sono stati rilevati con DAPI. Vengono mostrate immagini rappresentative. Barra, 17 μm. I grafici mostrano la quantificazione dei nuclei da tre replicati biologici (veicolo AR24Q AR/LSD1: n=26; DHT AR24Q AR/LSD1: n=43; veicolo AR24Q AR/PRMT6: n=20; DHT AR24Q AR/PRMT6: n=8; veicolo AR100Q AR/LSD1: n=76; DHT AR100Q AR/LSD1: n=61; veicolo AR100Q AR/PRMT6: n=66; DHT AR100Q AR/PRMT6: n=43).
- b) Saggi trascrizionali in cellule HEK293T esprimenti AR24Q o AR65Q da sole (mock, ossia vettore vuoto) o insieme a *LSD1* e trattate con veicolo o DHT (10 nM, 16 h, n = 4 replicati biologici).
- c) Saggi trascrizionali in cellule MN1 esprimenti AR65Q da sole (mock) o insieme alle isoforme di *LSD1* indicate e trattate con veicolo o DHT (10 nM, 16 h, n = 3 replicati biologici).
- d) (In alto) Western blot dei livelli di *LSD1* in cellule HEK293T esprimenti Cas9, con o senza guide specifiche per il silenziamento di *LSD1*; la quantificazione è mostrata in fondo (n = 7 replicati biologici). (In basso) Saggi trascrizionali in cellule Cas9 e g1, g2, g2+3 esprimenti AR24Q o AR65Q e trattate con DHT (10 nM, 16 h, n = 3 replicati biologici).
- e) (In alto) Western blot dei livelli di *LSD1* in cellule MN1 esprimenti Cas9, con o senza una guida specifica (g4) per il silenziamento di *Lsd1*; la quantificazione è mostrata in

fondo ($n = 5$ replicati biologici). (In basso) Saggi trascrizionali in cellule Cas9 e g4 esperimenti AR24Q o AR100Q e trattate con DHT (10 nM, 16 h, $n = 3$ replicati biologici). LSD1, PRMT6 e AR sono stati rilevati con anticorpi specifici, e si è usata beta-tubulina (β -Tub) quale controllo di carico. I grafici mostrano media \pm SEM; ANOVA a una via (d) o a due vie (Western blot b, c, e) seguito da test Tukey HSD, o student t test (saggi trascrizionali a, e). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

La **Fig. 3** mostra che LSD1 richiede la superficie AF-2 dell'AR e la rispettiva attività catalitica per transattivare l'AR.

a) Schema di domini modulari e di motivi specifici di AR e LSD1. I numeri si riferiscono a AR NM_000044 e LSD1 NM_001009999. NTD, dominio ammino-terminale; DBD, dominio di legame a DNA; LBD, dominio di legame; AOD, dominio di ammina ossidasi; CTD, dominio carbossi-terminale.

b) Saggio trascrizionale in cellule HEK293T esperimenti AR55Q o il mutante AF-2, AR55Q-E897K, da sola (mock) o con LSD1. Le cellule sono state trattate con DHT (10 nM, 16 h, $n = 3$ replicati biologici).

c) (A sinistra) Saggio trascrizionale in cellule HEK293T esperimenti AR65Q da sola (mock) e con LSD1 o LSD1-LXXAA. Le cellule sono state trattate con DHT (10 nM, 16 h, $n = 3-6$ replicati biologici). (A destra) Analisi western blotting di espressione di LSD1 e LSD1-LXXAA in cellule HEK293T. Viene mostrata un'immagine rappresentativa di 3 replicati biologici.

d) Saggio trascrizionale in cellule HEK293T esperimenti AR55Q da sola (mock) e con LSD1 o il mutante catalitico inattivo, LSD1-K685A. Le cellule sono state trattate con DHT (10 nM, 16 h, $n = 3$ replicati biologici).

e) Saggio trascrizionale in cellule HEK293T esperimenti AR65Q trattate con DHT da solo o insieme a SP-2509 (100 nM) e TCP (10 μ M) per 16 h ($n = 3$ replicati biologici).

f) Analisi western blotting di H3K4me2 in cellule C2C12 differenziate in miotubi per 10 DIV alla presenza di DHT (10 nM).

H3K4me2 è stato rilevato con un anticorpo specifico che riconosce il residuo K modificato H3. L'anticorpo H3 è stato usato quale controllo di carico. I grafici mostrano media \pm SEM; ANOVA a due vie (b), a una via (c, d, e) seguito da test Tukey HSD, o Student t test (f). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

La **Fig. 4** mostra che LSD1 e PRMT6 transattivano in modo sinergico l'AR normale e poliQ-espanso.

a) Analisi PLA in cellule MN1 esprimenti AR24Q o AR100Q e vettori per il silenziamento di *Lsd1* e *Prmt6*. Le cellule sono state trattate con DHT (10 nM, 16 h). I

5 nuclei sono stati rilevati con DAPI. Vengono mostrate immagini rappresentative. Barra, 17 µm. I grafici mostrano la quantificazione dei nuclei da tre esperimenti indipendenti

(veicolo AR24Q P6/LSD1: n=12; DHT AR24Q P6/LSD1: n=22; AR/LSD1 AR24Q Cas9 scramble con: n=169; AR/LSD1 AR24Q Cas9 scramble: n=198; AR24Q Cas9

AR/PRMT6: n=184; AR24Q Cas9 g2 AR/PRMT6: n=237; veicolo AR100Q PRMT6/LSD1: n=79; DHT AR100Q PRMT6/LSD1: n=116; AR/LSD1 AR100Q Cas9

scramble: n=302; AR/LSD1 AR100Q Cas9 scramble: n=190; AR/PRMT6 AR100Q Cas9: n=202; AR/PRMT6 AR100Q Cas9 g2: n=164).

b) Western blot di cellule MN1 trasdotte con vettori lentivirali per il silenziamento di *Lsd1* e *Prmt6*. Viene mostrato un esperimento rappresentativo di tre replicati biologici.

15 La quantificazione è mostrata in fondo.

c) Immunoprecipitazione di PRMT6 e immunoblotting delle proteine indicate nel muscolo scheletrico (quadricipite) di topi WT e AR113Q di 24 settimane. Viene mostrato un esperimento rappresentativo (3 topi/genotipo).

d) Saggi trascrizionali in cellule HEK293T esprimenti AR24Q e AR65Q da sole (mock) o con LSD1 e PRMT6 e trattate per 16 h con veicolo, DHT (10 nM), TCP (10 µM), o Adox (10 µM) (n = 3–7 replicati biologici).

e) (A sinistra) Saggio trascrizionale in cellule HEK293T esprimenti AR24Q o AR65Q con o senza guide CRISPR per il silenziamento di *Lsd1* e *Prmt6* (n = 3 replicati biologici). (A destra) Western blot dei livelli di PRMT6 in HEK293T esprimenti Cas9 da sola o insieme a guide per il silenziamento di *PRMT6*. Viene mostrato un esperimento rappresentativo di tre replicati biologici. La quantificazione è mostrata in fondo.

AR, LSD1 e PRMT6 sono stati rilevati con anticorpi specifici, e sono state utilizzate beta-tubulina (β-Tub) e calnexina (CNX) quali controlli di carico. I grafici mostrano media ± SEM; Student t test (a, c) o ANOVA a una via seguito da test Tukey HSD (d, e). * p ≤

30 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001.

La **Fig. 5** mostra che il silenziamento di LSD1 e PRMT6 sopprime la neurotossicità dell'AR poliQ-espanso.

a) Analisi del fenotipo oculare in mosche esprimenti GFP, AR0Q o AR52Q, con o senza RNAi per il silenziamento di *dLsd1* e dell'ortologo PRMT6 di mosca *Dart8*. Vengono mostrate immagini rappresentative da 10–15 mosche/genotipo.

b) Analisi RT-PCR dei livelli di trascritto mRNA di *dLsd1* normalizzati su *Tubulina* (n = 3 mosche/genotipo).

c) Gravità della patologia in mosche AR52Q con o senza silenziamento di *dLsd1* e *Dart8* (n = 10–15 mosche/genotipo).

I grafici mostrano media ± SEM; Student t-test (b) o ANOVA a una via seguito da test Tukey HSD (c). * p ≤ 0,05; *** p ≤ 0,001.

10 La Fig. 6 mostra la strategia RNAi per il silenziamento di *Lsd1* e *Prmt6* in vivo.

a) Western blot di LSD1 e PRMT6 in cellule MN1 trasfettate con vettori che esprimono amiR scramble o amiR per il silenziamento di *Lsd1* e *Prmt6*. Viene mostrato un esperimento rappresentativo di tre replicati biologici.

b) Saggio di vitalità cellulare in cellule MN1 esprimenti AR24Q o AR100Q trasfettate così come indicato e trattate con DHT (10 nM, 48 h, n = 3 replicati biologici).

c) Schema del vettore AAV9 di espressione di GFP e amiR per il silenziamento di *Lsd1* e *Prmt6*. ITR, ripetizione terminale invertita; WPRE, elemento regolatore post-trascrizionale del virus dell'epatite della marmotta; pA, sito di poliadenilazione.

d) Biodistribuzione delle particelle virali nei diversi tessuti di topi WT.

e) Western blot di espressione di GFP nei tessuti indicati dei topi WT trasdotti mediante AAV9-amiR. Viene mostrato un esperimento rappresentativo di tre replicati biologici in tre topi.

f) Analisi RT-PCR dei livelli di trascritto di *Lsd1*, *Prmt6*, AR murino (*mAR*) e AR umano (*hAR*) normalizzati su actina nel muscolo quadricipite di topi AR100Q di 13 settimane con o senza amiR-Lsd1/Prmt6 (n = 7–9 topi/gruppo).

g) Western blot di LSD1 e PRMT6 nel muscolo scheletrico di topi AR100Q trattati con o senza amiR-*Lsd1/Prmt6*. Viene mostrato un esperimento rappresentativo di cinque topi/gruppo. La quantificazione è mostrata in fondo.

GFP, LSD1 e PRMT6 sono stati rilevati con anticorpi specifici, e sono state utilizzate beta-tubulina (β-Tub) e calnexina (CNX) quali controlli di carico. I grafici mostrano media ± SEM; ANOVA a una via seguito da test Tukey HSD (a,b), o Student t test (d, f, g). * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001.

La **Fig. 7** mostra che il silenziamento di *Lsd1* e *Prmt6* modifica l'espressione genica nel muscolo affetto da SBMA.

- a) Diagrammi di Venn che mostrano l'intersezione di geni espressi in modo diverso (in alto, sovrapregolati; in basso, sottoregolati; numero di volte assoluto della variazione >4 e p rettificato $< 0,01$) ottenuta confrontando il controllo (AR100Q) con topi affetti da SBMA trattati con amiR; topi AR100Q con topi WT; o topi trattati con amiR con topi WT.
- b) Grafico ad anello che mostra il numero di geni espressi in modo diverso nel confronto fra topi AR100Q e topi WT da analisi dell'espressione differenziale e proporzioni relative dei geni ripristinati totalmente e parzialmente.
- c) Mappa termica dei 20 cluster top ottenuti dall'analisi di arricchimento funzionale dei geni ripristinati. Il colore è proporzionale ai valori p di arricchimento. Ogni nome di cluster si basa sul termine più significativo a livello statistico all'interno del cluster.
- d) Network di somiglianza dei termini arricchiti. Ogni nodo rappresenta un termine arricchito ed è colorato mediante un identificatore di cluster. La dimensione del nodo è proporzionale al numero di geni recuperati nel termine. La larghezza del limite è proporzionale al punteggio di somiglianza calcolato fra le coppie di nodi.

La **Fig. 8** mostra che il silenziamento di *Lsd1* e *Prmt6* migliora il fenotipo patologico dei topi affetti da SBMA.

- a) Analisi di peso corporeo, sospensione alla barra e analisi rotarod dei topi WT e AR100Q trattati con veicolo o amiR-*Lsd1/Prmt6* ($n = 7\text{--}10$ topi/gruppo).
- b) Colorazione NADH di topi di 8 settimane trattati così come indicato ($n = 4$ topi/gruppo; $n = 11.000$ fibre/gruppo).
- c) Analisi RT-PCR dei marcatori di denervazione normalizzati su *Actina* nei topi di controllo o AR100Q trattati con veicolo o amiR-*Lsd1/Prmt6* ($n = 4\text{--}9$ topi/gruppo).
- d) Western blot dell'AR nel muscolo scheletrico di topi AR100Q trattati con veicolo o amiR-*Lsd1/Prmt6* ($n = 3$ topi/gruppo). HMW, specie di peso molecolare elevato.

L'AR è stato rilevato con un anticorpo specifico ed è stata utilizzata calnexina (CNX) quale controllo di carico. I grafici mostrano media \pm SEM; ANOVA a una via seguito da

test Tukey HSD (a, b, c), or Student t-test (d), * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

La **Fig. 9** mostra che il silenziamento di *LSD1* e di *PRMT6* umane modifica l'espressione genica e la proliferazione cellulare del cancro alla prostata.

- a) Western blot di LSD1 e PRMT6 in cellule HEK293T trasfettate con vettori che esprimono amiR scramble o amiR-LSD1/PRMT6 per il silenziamento di *LSD1* e *PRMT6*. Viene mostrato un esperimento rappresentativo di 3-4 replicati biologici. La quantificazione dei livelli di LSD1 (giallo) e PRMT6 (blu) è mostrata in fondo.
- 5 b) Analisi RT-PCR dei geni indicati nelle cellule HEK293T trasfettate con i vettori che esprimono amiR scramble o amiR-LSD1/PRMT6 (n = 3 replicati biologici).
- c) Saggio di proliferazione cellulare BrDU eseguito in cellule LNCaP trasdotte con vettori lentivirali che esprimono amiR scramble o amiR-LSD1/PRMT6 (n = 15-19 campi da tre esperimenti indipendenti).
- 10 I grafici mostrano media ± SEM; ANOVA a una via seguito da test Tukey HSD (a, c), o Student t-test (b), * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01.

La **Fig. 10** mostra un modello di lavoro di AR poliQ-espanso e cofattore nel muscolo affetto da SBMA. In condizioni fisiologiche, l'AR controlla l'espressione dei geni target. Le espansioni PoliQ determinano la trascrizione aberrante dei coregolatori di AR, come ad esempio LSD1 e PRMT6, i quali, a loro volta, potenziano la transattivazione dell'AR, in tal modo esaltando il GOF tossico. L'intervento volto a bloccare tale meccanismo feed-forward migliora gli esiti della malattia nei modelli animali di SBMA.

15 La **Fig. 11** mostra che LSD1 interagisce con l'AR normale e poliQ-espanso.

a-b) Analisi di immunoprecipitazione (IP) e di Western blotting (IB) di AR con tag Flag e interazione di LSD1 nelle cellule HEK293T (n = 3 replicati biologici).

20 L'AR è stato rilevato con un anticorpo anti-Flag e LSD1 con un anticorpo specifico. Il peso molecolare (MW) è indicato sulla destra.

La **Fig. 12** mostra che LSD1 è un coattivatore dell'AR normale e poliQ-espanso.

a) Saggi trascrizionali in cellule HEK293T esprimenti AR12Q e AR55Q guidate dal promotore EF1α da solo e insieme a LSD1 e trattate con veicolo e DHT (10 nM, 16 h, n = 4 replicati biologici).

b) Saggi trascrizionali in cellule HEK293T esprimenti AR24Q e AR65Q da sole e insieme alle isoforme di LSD1 indicate e trattate con veicolo e DHT (10 nM, 16 h, n = 4 replicati biologici).

30 c) Saggi trascrizionali in cellule MN1 esprimenti AR24Q da sola e insieme a LSD1 e trattate con veicolo e DHT (10 nM, 16 h, n = 3 replicati biologici).

d) Analisi western blotting dell'espressione di LSD1 nelle cellule HEK293T esperimenti stabilmente Cas9 e le guide indicate che targetizzano *LSD1*. Viene mostrato un esperimento rappresentativo di n = 7 replicati biologici.

LSD1 è stata rilevata con un anticorpo specifico, ed è stata utilizzata beta-tubulina (β -Tub) quale controllo di carico. I grafici mostrano media \pm s.e.m., ANOVA a due vie

5 seguito da test Tukey HSD, * p \leq 0,05, *** p \leq 0,001.

La **Fig. 13** mostra che LSD1 e PRMT6 interagiscono e transattivano in modo sinergico l'AR normale e poliQ-espanso.

a) (A sinistra) Analisi di immunoprecipitazione (IP) e di immunoblotting (IB)

10 dell'interazione di LSD1 e PRMT6 nelle cellule HEK293T esperimenti PRMT6 taggati

con EGFP e LSD1. (A destra) Analisi western blotting di LSD1 e PRMT6 in cellule

HEK293T trasdotte con vettori lentivirali per il silenziamento di *LSD1* e *PRMT6*

mediante la tecnologia CRISPR. Viene mostrato un esperimento rappresentativo di 3 (a destra) e di 2 (a sinistra) replicati biologici. La quantificazione è mostrata in fondo.

b) Saggio trascrizionale in cellule HEK293T esperimenti AR65Q e AR65Q-S215A,

S792A, da sole (mock) e con LSD1 e PRMT6. Le cellule sono state trattate con DHT (10 nM, 16 h, n = 3 replicati biologici).

c) Saggio trascrizionale in cellule HEK293T con e senza guide di silenziamento che

targetizzano *LSD1* e esperimenti AR24Q e AR65Q da sole (mock) e con PRMT6. Le

20 cellule sono state trattate con DHT (10 nM, 16 h, n = 6 replicati biologici).

LSD1 e PRMT6 sono state rilevate con anticorpi specifici, e si è utilizzata β -Tub quale

controllo di carico. I grafici mostrano media \pm s.e.m., ANOVA a due vie seguito da test

Tukey HSD, *** p \leq 0,001.

La **Fig. 14** mostra l'efficacia del silenziamento target di amiR in vivo.

25 Analisi western blotting nei tessuti indicati dei topi AR100Q trattati con e senza amiR-

Lsd1/Prmt6, (n = 3-5 topi/genotipo). LSD1, PRMT6 e GFP sono stati rilevati con

anticorpi specifici, e CNX o Actina sono state utilizzate quali controlli di carico. I grafici

mostrano media \pm s.e.m., student's t test, * p \leq 0,05.

La **Fig. 15** mostra l'effetto del trattamento con amiR sull'espressione genica.

30 Analisi RT-PCR dei geni target di LSD1, AR e PRMT6 nei topi AR100Q trattati con

veicolo o amiR-Lsd1/Prmt6 (n = 3 topi/genotipo). I grafici mostrano media \pm s.e.m.,

student's t test, * p \leq 0,05.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione ha quindi a oggetto agenti terapeutici innovativi comprendenti almeno un inibitore di almeno un coattivatore del recettore degli androgeni (AR), selezionato tra la proteina arginina metiltransferasi 6 (PRMT6), la demetilasi 1 specifica della lisina (LSD1), o entrambe.

Salvo qualora definiti diversamente, tutti i termini tecnici e scientifici qui utilizzati presentano lo stesso significato così come comunemente compreso da un esperto del settore a cui la presente invenzione appartiene.

Il termine “agente terapeutico” indica una sostanza o una combinazione di sostanze aventi proprietà utili per il trattamento o la prevenzione di una patologia, in particolare negli esseri umani.

Un “inibitore”, conformemente alla presente invenzione, è un agente in grado di ridurre o sopprimere, direttamente o indirettamente, l'espressione o l'attività della molecola inibita. Il termine “espressione” è qui utilizzato nel suo significato più ampio e comprende la produzione di RNA o di RNA e proteine. Relativamente al RNA, il termine “espressione” o “traduzione” si riferisce, in particolare, alla produzione di peptidi o proteine.

Ad esempio, un inibitore conformemente alla presente invenzione può essere una molecola che riduce o sopprime, direttamente o indirettamente, la trascrizione di un gene (gene target) che codifica la molecola da inibire (molecola target), o la traduzione della molecola target dal proprio trascritto genico (RNA messaggero, mRNA). Un inibitore conformemente alla presente invenzione può essere anche un'entità chimica, come ad esempio una piccola molecola, in grado di ridurre o sopprimere, direttamente o indirettamente, l'attività biologica della molecola target.

Così come qui utilizzato, il termine “recettore degli androgeni” si riferisce, preferibilmente, al recettore degli androgeni (AR) umano (UniProt P10275-1).

Un coattivatore di recettori degli androgeni è una proteina che interagisce con i recettori degli androgeni per potenziare la transattivazione dei geni target dei recettori degli androgeni.

Gli agenti terapeutici dell'invenzione sono inibitori dei coattivatori di AR PRMT6 e/o LSD1.

Così come qui utilizzato, il termine “PRMT6” si riferisce preferibilmente alla proteina

umana arginina metiltransferasi 6 (UniProt Q96LA8), o al suo rispettivo gene codificante (Sequenza di Riferimento NCBI: NC_000001.11) o trascritto (Sequenza di Riferimento NCBI: NM_018137.3, **SEQ ID NO:1**).

Così come qui vi utilizzato, il termine “LSD1” si riferisce preferibilmente alla proteina umana demetilasi 1 specifica della lisina (UniProt O60341), altresì nota come “KDM1A”, al suo rispettivo gene codificante (Sequenza di Riferimento NCBI: NG_047129.1) o trascritto (Sequenza di Riferimento NCBI: NM_001009999.3, **SEQ ID NO:2**), o a qualsiasi rispettiva variante o isoforma, quali le isoforme LSD1-2a, LSD1-8a e LSD1-2a/8a derivanti da splicing alternativo¹⁰.

L’agente terapeutico dell’invenzione è preferibilmente per l’uso nel trattamento di una patologia associata al guadagno di funzione dell’AR e/o alla sovraespressione di un coattivatore di AR in un soggetto che ne abbia necessità, detto coattivatore di AR essendo preferibilmente PRMT6 o LSD1.

Così come qui vi utilizzati, “patologia/malattia”, “disturbo” e “stato” sono utilizzati in modo intercambiabile, per indicare una condizione anomala in un soggetto.

Le patologie associate al “guadagno di funzione” dell’AR sono patologie caratterizzate da un’attività dell’AR che è aumentata rispetto allo standard fisiologico. Tali malattie possono essere provocate da un AR mutante, in cui la mutazione aumenta la funzionalità dell’AR. Un esempio di tali patologie è il disturbo da poliglutammine (poliQ), il quale è associato al “guadagno di funzione” del gene mutante o del rispettivo prodotto, come ad esempio la SBMA relativamente all’AR. Ulteriori patologie associate al guadagno di funzione dell’AR includono i cancri dipendenti dagli ormoni, fra cui i cancri alla prostata, alla vescica, al fegato o ai reni, la sindrome metabolica, il diabete e la resistenza all’insulina.

Preferibilmente, gli agenti terapeutici dell’invenzione sono per l’uso nel trattamento di una patologia associata al guadagno di funzione dell’AR, più preferibilmente la SBMA o i cancri dipendenti dagli ormoni, quali i cancri alla prostata, alla vescica, al fegato o ai reni, o la sindrome metabolica, il diabete o la resistenza all’insulina.

Il termine “sovraespressione” indica la maggiore espressione di un gene oltre la norma. I saggi per la determinazione della sovraespressione di un gene sono noti nel settore e includono, senza limitazione alcuna, i dosaggi immunologici, i test di protezione da nucleasi, i northern blot, l’ibridizzazione in situ, la Reazione a Catena della Polimerasi in

Tempo Reale (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR), la sequenziazione di sequenze tag espresse (*Expressed Sequence Tag*, EST), l'ibridizzazione dei microarray di cDNA o l'analisi dei chip genici, la clonazione sottrattiva, l'Analisi Seriale dell'Espressione Genica (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*, SAGE), il

5 Sequenziamento Massivo della Firma Parallela (*Massively Parallel Signature Sequencing*, MPSS) e il Sequenziamento Mediante Sintesi (*Sequencing-By-Synthesis*, SBS). Un gene espresso in modo differenziale può essere sovraespresso rispetto al livello di espressione di una cellula normale o di controllo o ad un controllo interno. Ad esempio, il termine si riferisce a un differenziale maggiore di circa 1,5 volte, di circa
10 2,0 volte, di circa 3,0 volte, di circa 5 volte, di circa 10 volte, di circa 50 volte, o ancora di più di circa 100 volte rispetto al livello di espressione rilevato in un campione di controllo. Il "controllo" viene utilizzato in un esperimento per finalità di confronto o di normalizzazione. I controlli da utilizzare nel confronto dell'espressione genica a livello
15 di mRNA includono i controlli interni ed esterni. Il controllo interno si riferisce a un gene noto per essere presente nel campione da testare. Il livello di espressione del gene è preferibilmente ben caratterizzato e fornisce una misura affidabile del livello di espressione genica nel controllo. Esempi di geni che sono utili quali controlli interni includono, senza limitazione alcuna, i geni costitutivi (*housekeeping*) fra cui β-actina, 18S, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e ciclofilina. I controlli esterni includono l'uso di un soggetto o di un campione da un soggetto, noti per esprimere il gene
20 di interesse a un determinato livello, o, ad esempio, un campione da un soggetto sano.

Le patologie associate alla sovraespressione di un coattivatore di AR includono la SBMA, il cancro alla prostata, il cancro al polmone, il cancro al seno, il cancro alla vescica, il cancro al collo dell'utero, e il linfoma.

25 Preferibilmente, gli agenti terapeutici dell'invenzione sono utilizzabili nel trattamento di una patologia associata alla sovraespressione di un coattivatore di AR, più preferibilmente la SBMA, il cancro alla prostata, il cancro al polmone, il cancro al seno, il cancro alla vescica, il cancro al collo dell'utero o il linfoma.

Più preferibilmente, gli agenti terapeutici dell'invenzione sono per l'uso nel trattamento
30 di una patologia associata al guadagno di funzione dell'AR e alla sovraespressione dei coattivatori di AR, quale SBMA o cancro, in modo maggiormente preferito SBMA o cancro alla prostata.

Così come qui vi utilizzato, il "trattamento" (e le rispettive varianti grammaticali fra cui "trattare" o "che tratta/trattano") si riferisce alla somministrazione di un agente terapeutico o di una formulazione conformemente all'invenzione, allo scopo di ottenere un effetto farmacologico e/o fisiologico desiderato. L'effetto può essere profilattico in

5 termini di prevenzione completa o parziale di una patologia o del/dei rispettivi sintomi e/o può essere terapeutico in termini di stabilizzazione o cura, parziale o completa, di una patologia e/o di un effetto avverso attribuibile alla patologia o in termini di controllo della progressione della patologia. Il termine "trattamento" include, quindi, "prevenzione", ossia inibizione o ritardo dell'inizio o riduzione del verificarsi di una malattia in un

10 soggetto. La prevenzione può essere completa (ad es., l'assenza totale di cellule patologiche in un soggetto) o parziale. La prevenzione si riferisce altresì a una ridotta predisposizione a uno stato clinico. Il controllo della progressione della patologia è inteso quale conseguimento di risultati clinici benefici o desiderati che includono, senza limitazione alcuna, la riduzione dei sintomi, la riduzione della durata della malattia, la

15 stabilizzazione degli stati patologici (specificamente per evitare un ulteriore peggioramento), il ritardo della progressione della malattia, il miglioramento dello stato patologico e la remissione (sia parziale, sia totale). Il controllo della progressione della patologia coinvolge altresì l'estensione del periodo di sopravvivenza, rispetto alla sopravvivenza attesa in caso di mancata somministrazione del trattamento.

20 In particolare, conformemente alla presente invenzione, i termini "trattamento", "che tratta/trattano", "trattare" e simili, così come qui vi utilizzati, si riferiscono, preferibilmente, alla somministrazione di un agente terapeutico o formulazione dell'invenzione per curare, prevenire, ritardare e/o controllare le manifestazioni cliniche della patologia da trattare. Ad esempio, nel caso del cancro, il trattamento include la riduzione della cachessia, l'aumento del tempo di sopravvivenza, il rallentamento della progressione tumorale, la riduzione della massa tumorale, la riduzione del carico tumorale e/o il rallentamento nella formazione di metastasi, ciascuno così come misurato mediante le direttive fissate dai National Health Institutes, ad es., dal National Cancer Institute e dal U.S. Food and Drug Administration per l'approvazione di nuovi farmaci. Nel caso

25 della SBMA, il trattamento include la riduzione o la prevenzione dei sintomi della SBMA, inclusi i sintomi precoci come ad esempio uno o più fra debolezza/crampi ai muscoli di braccia e gambe, debolezza ai muscoli di viso, bocca e lingua, difficoltà a parlare e

30

deglutire, spasmi (fascicolazioni), tremori e tremolii in determinate posizioni, ingrossamento del petto, (ginecomastia), intorpidimento, infertilità e atrofia testicolare.

Il termine “quantità efficace” si riferisce alla quantità di una sostanza sufficiente per conseguire lo scopo previsto. La quantità efficace di una data sostanza varia al variare di

5 fattori fra cui la natura della sostanza, la modalità di somministrazione, la dimensione e la specie dell’animale che riceve la sostanza e la finalità della somministrazione della sostanza medesima. La quantità efficace di ogni singolo caso può essere determinata in modo empirico da un esperto del settore, secondo procedimenti consolidati nel settore stesso. Ad esempio, con "dose o quantità terapeuticamente efficace" di un composto,

10 composizione o formulazione conformemente all'invenzione, si intende una quantità che, qualora somministrata così come qui descritto, determina una risposta terapeutica positiva, fra cui un recupero aumentato dalla patologia o dalle condizioni collaterali della patologia medesima.

I soggetti che necessitano del trattamento includono i soggetti già colpiti, così come quelli

15 per cui si auspichi la prevenzione (ad es., i soggetti privi di sintomi ma a cui sia stato diagnosticato il disturbo genetico, ecc.).

“Paziente” o “soggetto”, così come qui utilizzato, indica un umano di sesso maschile o femminile, un animale non umano, nonché modelli animali utilizzati per la ricerca clinica.

In una realizzazione, il soggetto del trattamento è un umano a cui è stata diagnosticata

20 una patologia associata al guadagno di funzione dell'AR e/o alla sovraespressione dei coattivatori di AR. In determinate realizzazioni, il soggetto umano è un feto, un neonato, un infante, un lattante, un bimbo in età prescolare, un bimbo in età scolare, un adolescente, un giovane adulto o un adulto. Preferibilmente, il soggetto è di sesso maschile.

Conformemente alle realizzazioni preferite, l’almeno un inibitore di almeno un coattivatore di AR, per l’uso conformemente alla presente invenzione, è un silenziatore genetico. Un “silenziatore genetico” è un agente in grado di targetizzare specificamente un gene o trascritto e di inibire, ridurre o interrompere l'espressione del gene o trascritto targetizzato. Preferibilmente, un silenziatore genetico conformemente all'invenzione riduce la quantità o l'attività del proprio target di non oltre il 90%, di non oltre l'80%, di non oltre il 70%, di non oltre il 60%, o di non oltre il 50%, rispetto a un target non inibito;

30 più preferibilmente, il silenziatore genetico conformemente all'invenzione riduce la

quantità o l'attività del proprio target del 10-70%, del 10-60%, del 10-50%, rispetto a un target non inibito.

Il silenziatore genetico, conformemente all'invenzione, può essere una molecola RNA-interferente o un agente di editing genomico, in grado di targetizzare rispettivamente un trascritto o un gene, inibendoli.

Conformemente alla presente invenzione, un gene o trascritto è "targetizzato" da un silenziatore genetico e un silenziatore genetico "targetizza" un gene o trascritto, quando il silenziatore genetico è in grado di ridurre o inibire selettivamente l'espressione del gene target o di un allele del gene target o la traduzione del trascritto target, e/o quando il silenziatore genetico si ibridizza, in condizioni stringenti, al gene o trascritto target. Ad esempio, un silenziatore genetico che targetizza un coattivatore di AR (come PRMT6 e/o LSD1), conformemente alla presente invenzione, riduce o inibisce in modo selettivo l'espressione di un gene, o di un allele di un gene, che codifica il coattivatore di AR, o riduce o inibisce in modo selettivo la traduzione di un trascritto del coattivatore di AR; in alternativa o in aggiunta, un silenziatore genetico che targetizza un coattivatore di AR (come PRMT6 e/o LSD1), conformemente alla presente invenzione, si ibridizza, in condizioni stringenti si indicano, tipicamente, la preibridizzazione e l'ibridizzazione a 42°C in 5X SSPE, 0,3% di SDS, 200pg/ml di DNA di sperma di salmone tagliato e denaturato, e 25% 35% o 50% di formammide rispettivamente per stringenza da bassa a media a elevata. Successivamente, la reazione di ibridizzazione viene lavata tre volte per 30 minuti ogni lavaggio, usando 2XSSC, 0,2% di SDS e a 55 °C, 65 °C o 75 °C per stringenza da bassa a media a elevata.

Come qui vi utilizzata, una "sequenza target" è una sequenza di nucleotidi targetizzata da un silenziatore genetico conformemente all'invenzione: qui, la sequenza target può essere indicata quale sequenza di cDNA (filamento positivo, da 5' a 3') corrispondente al trascritto target del RNA (trascritto senso, da 5' a 3') di un gene target.

Così come qui vi utilizzata, una "sequenza targetizzante" è una sequenza di un silenziatore genetico che è (completamente o parzialmente) complementare alla sequenza target, o al rispettivo trascritto, e che è in grado di direzionare il silenziatore genetico verso il gene o trascritto target .

I termini "sequenza", "sequenza di nucleotidi", "sequenza nucleotidica isolata",

“sequenza polinucleotidica”, “polinucleotide” o “sequenza polinucleotidica isolata” sono quivi utilizzati in modo intercambiabile e si riferiscono a una molecola di acido nucleico, DNA o RNA, contenente, rispettivamente, deossiribonucleotidi o ribonucleotidi. Il termine “sequenza” può essere quivi utilizzato per indicare, in breve, un polinucleotide o
5 una porzione di un polinucleotide avente una determinata sequenza.

Un acido nucleico può essere a filamento doppio, a filamento singolo, o contenere porzioni di una sequenza sia a filamento doppio, sia a filamento singolo.

Salvo qualora diversamente indicato, le sequenze di acidi nucleici a filamento doppio quivi indicate sono le sequenze da 5' a 3' del filamento senso (o positivo).

10 Un silenziatore genetico può essere testato *in vitro* o *in vivo* relativamente alla capacità di targetizzare un gene o trascritto, mediante tecniche note nel settore.

Preferibilmente, l'agente terapeutico comprende almeno un silenziatore genetico rappresentato da una molecola RNA-interferente (RNAi).

L'interferenza di RNA è un processo noto e naturale nelle cellule. In natura, ovvero, nelle

15 piante, negli animali e in alcuni virus, il silenziamento di RNA e la regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica sono influenzati dai miRNA, ovvero una piccola molecola di RNA non codificante a filamento singolo (contenente circa 22 nucleotidi). I miRNA agiscono mediante accoppiamento di basi con sequenze complementari all'interno delle molecole di mRNA. Di conseguenza, tali molecole di mRNA sono

20 silenziate, mediante uno o più dei processi seguenti: (1) taglio del filamento di mRNA in due parti, (2) destabilizzazione del mRNA attraverso l'accorciamento della propria coda poli(A), e (3) traduzione del mRNA in proteine mediante ribosomi meno efficiente. I miRNA sono elaborati, ciascuno, da una molecola di RNA precursore più lunga ("miRNA precursore" o pre-miRNA): i geni miRNA endogeni sono trascritti mediante RNA

25 polimerasi II, per ottenere miRNA primari (pri-miRNA) che sono sottoposti a una fase iniziale di maturazione nucleare, risultante in precursori stem-loop (stelo-anello) per con accoppiamento di basi imperfetto (pre-miRNA) di ~70 nt, dotati, in effetti, di due aree di complementarità che consentono loro di formare una struttura a stelo-anello. Dopo l'esportazione nel citoplasma, i pre-miRNA sono sottoposti a un'ulteriore fase di maturazione, eseguita mediante enzimi denominati Dicer e Drosha negli animali, i quali scindono l'anello del precursore e generano RNA corti imperfetti a filamento doppio (dsRNA), altresì denominati miRNA duplex. Nell'ultima fase di maturazione, uno dei
30

filamenti di RNA duplex è incorporato nel complesso RISC, responsabile della repressione traduzionale e della degradazione del RNA. Il miRNA processato (miRNA maturo) si accoppia a un mRNA target, determinando il suo silenziamento.

Conformemente alla presente invenzione, il termine “molecola di RNAi” include piccoli

5 RNA-interferenti sintetici (siRNA), RNA a forcina (hairpin) corti (shRNA), o miRNA artificiali (amiR), in grado di inibire il trascritto target. La molecola di RNAi comprende o consiste in una sequenza breve (sequenza targetizzante) che è complementare a una sequenza target all’interno del trascritto di RNA del gene target. La sequenza targetizzante della molecola di RNAi può essere una sequenza perfettamente 10 complementare alla sequenza target, o una sequenza RNAi degenerata che targetizza aree omologhe nel trascritto target. Ad esempio, gli accoppiamenti non corretti e/o le coppie di base traballanti (*wobbled*) possono fornire sequenze targetizzanti aggiuntive. Preferibilmente, la molecola di RNAi dell’invenzione comprende o consiste in una sequenza targetizzante perfettamente complementare alla sequenza target o al rispettivo 15 trascritto.

La valutazione dell’inibizione del trascritto target da parte della molecola di RNAi può essere eseguita utilizzando tecniche classiche di biologia molecolare, come ad esempio (*real time Polymerase Chain Reaction*, Reazione a Catena della Polimerasi in tempo reale) qPCR, microarray, bead array, analisi Northern blot o clonazione e 20 sequenziamento, quantificando la molecola di RNAi, il trascritto target, un substrato o un composto noto per essere associato al trascritto target in una cellula.

Il silenziatore genetico conformemente all’invenzione può essere una molecola di RNAi come tale (una molecola di RNAi “matura”), tipicamente una molecola di RNA a filamento singolo o a filamento doppio. Inoltre, il silenziatore genetico può essere un 25 “precursore” della molecola di RNAi matura: il precursore presenta due aree di auto-complementarità che consentono loro di formare una struttura a stelo-anello, la quale è tagliata mediante enzimi denominati Dicer e Drosha negli animali; il RNAi processato(molecola di RNAi matura), ovvero la molecola attiva comprendente o composta dalla sequenza targetizzante, è tipicamente una porzione dello stelo.

30 Inoltre, il silenziatore genetico può essere una “fonte” di una molecola di RNAi o di un rispettivo precursore, presentando la forma di una sequenza di DNA comprendente la sequenza che codifica la molecola di RNAi, preferibilmente estesa di almeno 1 - 5

nucleotidi di sequenza codificante a monte e/o a valle della sequenza predetta che codifica la molecola di RNAi. In alcune realizzazioni, le molecole fonte di RNAi presentano fino a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o più nucleotidi contigui, o qualsiasi intervallo derivabile al loro interno, i quali fiancheggiano la sequenza che codifica il RNAi maturo 5 processato predominante o il rispettivo precursore, su uno o entrambi i lati (estremità 5' e/o 3').

Conformemente alle realizzazioni preferite dell'invenzione, l'agente terapeutico comprende almeno un silenziatore genetico che è una molecola di RNAi, o un rispettivo precursore, o una rispettiva fonte, o un loro equivalente, il quale targetizza un coattivatore 10 di AR, più preferibilmente PRMT6. Preferibilmente, la detta molecola di RNAi targetizza una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 3-53**, più preferibilmente una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 18, 21 o 29**, o un rispettivo trascritto. Preferibilmente, la detta molecola di RNAi comprende o consiste in un polinucleotide avente una sequenza perfettamente complementare a una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 3-53**, più preferibilmente a una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 18, 21 o 29**, o al rispettivo 15 trascritto. In modo maggiormente preferito, la detta molecola di RNAi comprende o consiste nella sequenza **SEQ ID NO: 171-173**, o un rispettivo equivalente. Opzionalmente, l'agente terapeutico comprendente almeno un silenziatore genetico che è una molecola di RNAi, o un rispettivo precursore o una rispettiva fonte, o un loro equivalente, che targetizza PRMT6, comprende, inoltre, almeno un inibitore di LSD1, 20 preferibilmente il detto inibitore essendo un silenziatore genetico o una piccola molecola, più preferibilmente essendo un silenziatore genetico.

Conformemente alle realizzazioni preferite dell'invenzione, l'agente terapeutico comprende almeno un silenziatore genetico che è una molecola di RNAi, o un rispettivo precursore o una rispettiva fonte, o un loro equivalente, che targetizza LSD1. Preferibilmente, la detta molecola di RNAi targetizza una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 54-138**, più preferibilmente una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 68, 72 o 90**, o un rispettivo trascritto. Preferibilmente, la detta molecola di RNAi comprende o consiste in un polinucleotide avente una sequenza perfettamente complementare a una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 54-138**, più preferibilmente a una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 68, 72 o 90**, o ai rispettivi trascritti. In modo maggiormente preferito, la detta molecola di RNAi comprende o consiste nella sequenza **SEQ ID NO:**

174-176, o un rispettivo equivalente. Opzionalmente, l'agente terapeutico comprendente almeno un silenziatore genetico che è una molecola di RNAi, un rispettivo precursore o una rispettiva fonte, o un loro equivalente, che targetizza LSD1, comprende, inoltre, almeno un inibitore di PRMT6, preferibilmente il detto inibitore essendo un silenziatore genetico o una piccola molecola, più preferibilmente essendo un silenziatore genetico.

5 Gli equivalenti della molecola di RNAi, del rispettivo precursore o della rispettiva fonte, sono altresì inclusi nell'invenzione.

Il termine "equivalente", qualora riferito alle molecole di RNAi, è volto a indicare una molecola di RNAi chimicamente modificata o un analogo nucleotidico del RNAi, il quale

10 mantiene la stessa attività della molecola di RNAi, ovvero una molecola di RNAi comprendente una sequenza targetizzante degenerata, una sequenza con una o più addizioni, sostituzioni (generalmente di natura conservativa) e/o delezioni, o una sequenza che presenta un grado elevato di omologia di sequenza rispetto alla sequenza di riferimento, ad es., omologia di sequenza di almeno 80%, di almeno 85%, di almeno 90%

15 rispetto alla sequenza targetizzante della molecola di RNAi. I termini "identità di sequenza %", "identità %" o "omologia di sequenza %" si riferiscono alla percentuale di nucleotidi o aminoacidi di una sequenza candidata che sono identici ai nucleotidi o aminoacidi della sequenza di riferimento, dopo l'allineamento delle sequenze per ottenere l'identità di sequenza % massima. In una realizzazione preferita, l'identità di sequenza è

20 calcolata sulla base della intera lunghezza di due sequenze date o su una rispettiva parte.

L'identità di sequenza % può essere determinata mediante qualsiasi procedimento o algoritmo consolidati nel settore, come ad esempio gli algoritmi ALIGN, BLAST e BLAST 2.0. Qui, l'"identità di sequenza %", l'"identità %" o l'"omologia di sequenza %"

25 sono calcolate dividendo il numero di nucleotidi o aminoacidi che sono identici dopo l'allineamento fra la sequenza di riferimento e la sequenza candidata per il numero totale di nucleotidi o aminoacidi nella sequenza di riferimento e moltiplicando il risultato per 100. Preferibilmente, la sequenza equivalente presenta un'identità di sequenza maggiore del 90%, del 95%, del 99% con la sequenza delle molecole di RNAi.

Possono essere apportate diverse modifiche chimiche note nel settore, volte ad aumentare 30 la stabilità o la disponibilità degli oligonucleotidi di dsRNA.

Inoltre, le molecole di RNAi dell'invenzione contemplano specificamente l'uso di nucleotidi che sono modificati in modo da potenziare le loro attività. Tali nucleotidi

includono quelli che si trovano in corrispondenza dell'estremità 5' o 3' della molecola di RNAi, così come quelli che sono interni alla molecola. I nucleotidi modificati utilizzati nei filamenti complementari di una molecola di RNAi a filamento doppio bloccano o il 5'OH o il fosfato del RNA o introducono modifiche degli zuccheri interni che aumentano l'assunzione del filamento attivo della molecola di RNAi. Le modifiche delle molecole di RNAi includono le modifiche degli zuccheri interni che aumentano l'ibridizzazione così come stabilizzano le molecole nelle cellule, e le modifiche terminali che stabilizzano ulteriormente gli acidi nucleici nelle cellule.

5 Gli equivalenti delle molecole di RNAi conformemente all'invenzione includono, quindi, molecole di RNAi comprendenti nucleotidi modificati.

Gli equivalenti delle molecole di RNAi conformemente all'invenzione includono altresì molecole di RNAi comprendenti nucleotidi modificati denominati UNA (*unlocked nucleic acid*, acido nucleico sbloccato): gli UNA sono analoghi aciclici del RNA, in cui il legame fra gli atomi C2' e C3' è stato talgaito, diminuendo l'affinità di legame verso un filamento complementare, così come descritto in WO2008/147824. Gli UNA sono compatibili con il riconoscimento di RNase H e la scissione del RNA e migliorano il silenziamento genico mediato dai siRNA.

10 Gli equivalenti includono altresì molecole di RNAi conformemente all'invenzione comprendenti analoghi di acidi nucleici di morfolino, i quali contengono associazioni di inter-sottounità sia non cariche che cationiche, così come descritto in WO2008/036127, Acidi Nucleici Zip (ZNA), contenenti derivati coniugati della spermina quali frazioni cationiche (unità Z) rispetto a un oligonucleotide (WO/2007/069092 e EP2075342). Ulteriori insegnamenti relativamente agli equivalenti di RNAi sono riportati nel Brevetto U.S. 5,728,525, il quale descrive analoghi nucleosidici che sono marcati all'estremità, nei 15 Brevetti U.S. 5,637,683, 6,251,666, i quali descrivono sostituzioni di L-nucleotidi, e nel Brevetto U.S. 5,480,980, il quale descrive nucleotidi 7-deaza- 2'-deossiguanosina e rispettivi analoghi di acidi nucleici. L'uso di altri analoghi di nucleotidi è specificamente contemplato per l'uso nel contesto della presente invenzione. Essi includono, senza limitazione alcuna: modifiche del ribosio (fra cui 2'F, 2' H2, 2'N3,4'tio, o 2' O-CH3) e modifiche del fosfato (come ad esempio quelle rilevate nei fosforotioati, nei metilfosfonati e nei fosforo borati). Tali analoghi conferiscono stabilità sugli RNA, riducendo o eliminando la loro capacità di essere tagliati da ribonucleasi. Quando tali

analoghi di nucleotidi sono presenti nelle molecole di RNAi, essi possono presentare effetti decisamente positivi sulla stabilità delle molecole di RNAi negli animali.

Gli equivalenti includono altresì equivalenti dei precursori delle molecole di RNAi o delle rispettive fonti, come ad esempio sequenze con ottimizzazione dei codoni e sequenze comprendenti nucleotidi mutati o aggiunti, ad es., per necessità di clonazione.

Le molecole di RNAi conformemente all'invenzione possono essere ottenute da fornitori commerciali di sintesi di oligo di RNA. In alternativa, le molecole di RNAi conformemente all'invenzione possono essere espresse nelle cellule mediante la trasfezione delle cellule con i vettori contenenti una fonte di RNAi, come ad esempio un transgene, per l'espressione del precursore del RNAi sotto il controllo di un idoneo promotore.

Il termine "promotore" deve essere inteso quale frammento di acido nucleico che agisce in modo da controllare la trascrizione di uno o più polinucleotidi, ad es., sequenze codificanti, il quale è collocato 5' a monte della o delle sequenze di polinucleotidi, e il quale è strutturalmente identificato dalla presenza di un sito di legame per la RNA

polimerasi DNA dipendente, siti di inizio di trascrizione e, ma senza limitazione, siti di legame per fattori di trascrizione, repressori, e qualsiasi altra sequenza di nucleotidi nota nel settore per agire, direttamente o indirettamente, in modo da regolare la quantità di trascrizione dal promotore. Il promotore si dice essere legato operativamente a una sequenza di nucleotidi o guidare l'espressione della medesima quando può iniziare la trascrizione della detta sequenza di nucleotidi in un sistema di espressione utilizzando un costrutto genico comprendente il detto promotore operativamente legato a una sequenza di nucleotidi di interesse, mediante l'utilizzo di un idoneo saggio, ad esempio RT- qPCR o Northern blotting (rilevazione del trascritto).

Preferibilmente, l'agente terapeutico comprende almeno un precursore della molecola di RNAi in forma di polinucleotide stelo-anello, composto, ad es., da 50 - 80 nucleotidi in lunghezza, 50 - 70 nucleotidi, o 50 - 65 nucleotidi in lunghezza, i quali comprendono la sequenza targetizzante. Preferibilmente, il polinucleotide del precursore del RNAi comprende (da 5' a 3') circa 5 nucleotidi che affiancano una sequenza targetizzante, la sequenza targetizzante, preferibilmente di circa 21 nucleotidi, corrispondente alla sequenza della molecole di RNAi matura, una sequenza ad anello di 19-22 nucleotidi, e la sequenza target senso di 19-21 nucleotidi la quale include, opzionalmente, uno

5

10

15

20

25

30

disallineamento (*mismatch*) rispetto alla sequenza targetizzante; preferibilmente, la sequenza target senso è il complementare inverso (*reverse complement*) della sequenza targetizzante con uno, due, o tre nucleotidi disallineati; ad esempio, una sequenza target senso in una molecola precursore di RNAi può comprendere i nucleotidi 1-8 del complementare inverso di una sequenza targetizzante lunga 21 nucleotidi, seguiti dai nucleotidi 11-21 del complementare inverso della detta sequenza targetizzante lunga 21 nucleotidi.

Preferibilmente, l' almeno un silenziatore genetico è una fonte di una molecola di RNAi,

la detta fonte essendo una molecola di DNA che codifica la molecola di RNAi o il

rispettivo precursore. La molecola di DNA che codifica la molecola di RNAi o il

rispettivo precursore è preferibilmente compresa in un vettore. Il termine "vettore" viene

utilizzato per fare riferimento a una molecola di acido nucleico trasportatrice in cui può

essere inserita una sequenza di acidi nucleici per l'introduzione in una cellula, in cui essa

può essere replicata. I vettori includono plasmidi, cosmidi, virus (batteriofagi, virus

animali, lentivirus e virus delle piante), e cromosomi artificiali (ad es., YAC). Un esperto

del settore dispone delle competenze per realizzare un vettore mediante tecniche

ricombinanti standard, le quali sono descritte in Sambrook, 2003, Sambrook, 2001 e

Sambrook, 1989, qui incorporati mediante riferimento. Conformemente alle

realizzazioni preferite, la molecola di DNA che codifica la molecola di RNAi o il

rispettivo precursore è compresa in un vettore virale per la veicolazione in una cellula e

l'espressione del precursore nella cellula.

Conformemente agli aspetti preferiti dell'invenzione, la fonte di molecole di RNAi

comprende o consiste in una cassetta di espressione, o un genoma vettoriale

comprendente una cassetta di espressione, la detta cassetta di espressione comprendendo

una sequenza di acidi nucleici che codifica la molecola di RNAi o il rispettivo precursore,

operativamente legata a sequenze regolatrici che dirigono l'espressione della sequenza di

acidi nucleici nel soggetto.

In alcune realizzazioni, la fonte della molecola di RNAi comprende un acido nucleico

contenente più di una sequenza che codifica una molecola di RNAi o il rispettivo

precursore, ad esempio la fonte della molecola di RNAi comprende una molecola di acido

nucleico contenente una prima sequenza che codifica una molecola di RNAi o il rispettivo

precursore e una seconda sequenza che codifica una seconda molecola di RNAi o il

rispettivo precursore, preferibilmente in cui la prima molecola di RNAi o il rispettivo precursore comprendono una sequenza targetizzante PRMT6 e la seconda molecola di RNAi o il rispettivo precursore comprendono una sequenza targetizzante LSD1.

Preferibilmente, la fonte di molecole di RNAi comprende o consiste in almeno un vettore, più preferibilmente almeno un vettore virale, comprendente l’almeno un acido nucleico che codifica un precursore di una molecola di RNAi che targetizza PRMT6 e/o LSD1.

Preferibilmente, il silenziatore genetico dell’invenzione è un miRNA artificiale (amiR), un rispettivo precursore o fonte, o un rispettivo equivalente.

Gli amiR comprendono un inserto siRNA target-specifico (la cui sequenza comprende la sequenza targetizzante) e un’impalcatura, sulla base di un miRNA primario naturale (pri-miRNA). L’inserto siRNA target-specifico funge da guida per la ricerca di sequenze complementari nei trascritti, mentre le impalcature del pri-miRNA garantiscono un’elaborazione e un trasporto corretti. Le dinamiche della maturazione del siRNA e dei livelli di siRNA nella cellula assomigliano a quelle dei miRNA endogeni; pertanto, gli amiR sono più sicuri delle altre molecole di RNAi. Veicolati, ad es., mediante vettori virali ed espressi con promotori della polimerasi II (Pol II), gli amiR forniscono un silenziamento di lunga durata. Preferibilmente, l’espressione nei tessuti selezionati è ottenuta mediante l’espressione degli amiR con promotori tessuto-specifici.

Un vantaggio particolare degli amiR è dato dal fatto che l’amiR può essere espresso a livelli inferiori, rispetto ai shRNA, utilizzando i promotori della RNAPol II, i quali consentono un’elevata espressione nelle cellule target pur garantendo un’elaborazione efficiente e l’assenza di danni neuronali. Inoltre, gli amiR targetizzano una proteina specifica all’interno della stessa famiglia e, quindi, sono altamente specifici rispetto agli inibitori delle piccole molecole.

Gli amiR conformemente all’invenzione sono, solitamente, molecole a singolo filamento, mentre i precursori di amiR sono, solitamente, nella forma di una molecola almeno parzialmente auto-complementare, in grado di formare porzioni a doppio filamento, ad es., strutture a stelo-anello.

Tipicamente, la sequenza targetizzante nel amiR è di almeno da 12 nucleotidi a 28 nucleotidi, da 20 nucleotidi a 26 nucleotidi, circa 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 nucleotidi. Preferibilmente, la sequenza targetizzante della molecola di RNAi è lunga 21 bp, nonostante siano possibili anche altre lunghezze.

Conformemente alle realizzazioni preferite dell'invenzione, l'agente terapeutico comprende almeno un silenziatore genetico che è un amiR, o un rispettivo precursore o una rispettiva fonte, o un loro equivalente, il quale targetizza PRMT6, preferibilmente targetizza una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 3-53**, più preferibilmente una 5 qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 18, 21 o 29**, o i rispettivi trascritti. Preferibilmente, il detto amiR comprende o consiste in un polinucleotide avente una sequenza perfettamente complementare ad una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO:3-53**, più preferibilmente ad una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 18, 21 o 29**, o ai rispettivi trascritti. In modo maggiormente preferito, il detto amiR comprende o consiste nella 10 sequenza **SEQ ID NO: 171-173**, o rispettivo equivalente. Opzionalmente, il detto agente terapeutico comprende, inoltre, almeno un inibitore di LSD1, preferibilmente il detto inibitore essendo un silenziatore genetico o una piccola molecola, più preferibilmente essendo un silenziatore genetico.

Conformemente alle realizzazioni preferite dell'invenzione, l'agente terapeutico 15 comprende almeno un silenziatore genetico che è un amiR, o un rispettivo precursore o una rispettiva fonte, o un loro equivalente, il quale targetizza LSD1, preferibilmente targetizza una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 54-138**, più preferibilmente una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 68, 72 o 90**, o i rispettivi trascritti. Preferibilmente, il detto amiR comprende o consiste in un polinucleotide avente una sequenza perfettamente complementare a una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 54-138**, più preferibilmente a una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 68, 72 o 90**, o ai rispettivi trascritti. In modo maggiormente preferito, il detto amiR comprende o consiste nella 20 sequenza **SEQ ID NO: 174-176**, o rispettivo equivalente. Opzionalmente, il detto agente terapeutico comprende, inoltre, almeno un inibitore di PRMT6, preferibilmente il detto inibitore essendo un silenziatore genetico o una piccola molecola, più preferibilmente essendo un silenziatore genetico.

Conformemente a realizzazioni particolarmente preferite, il silenziatore genetico dell'invenzione è una fonte di amiR, o rispettivo equivalente, comprendente una molecola di acido nucleico che codifica un amiR di interesse o il rispettivo precursore, 25 fiancheggiata da regioni strutturali di acido nucleico (ad esempio l'anello della forcina) derivate da un precursore del miR naturale. Di conseguenza, il silenziatore genetico dell'invenzione è preferibilmente un precursore di amiR, o rispettivo equivalente,

comprendente l'acido nucleico del amiR di interesse fiancheggiato da aree strutturali di acido nucleico (ad esempio l'anello della forcina) derivate da un precursore del miR naturale. Le aree strutturali che fiancheggiano l'amiR di interesse possono essere derivate, ad esempio, da un precursore del miR-155, così come descritto in
5 US20040053876. L'esperto del settore comprenderà che la presente invenzione ha altresì a oggetto precursori o fonti di amiR aventi strutture stelo-anello derivate da miRNA diversi dal miR-155 e sarà in grado di disegnare detti precursori o fonti di amiR. Ad esempio, le strutture stelo-anello possono essere derivate da un precursore o fonte del miR-30, o di altri.

10 Conformemente alle realizzazioni preferite, l'agente terapeutico comprende almeno un silenziatore genetico rappresentato da un precursore, da una fonte, o da un rispettivo equivalente di un amiR che targetizza PRMT6, più preferibilmente, che targetizza una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 3-53**, in modo maggiormente preferito una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 18, 21 o 29**, o i rispettivi trascritti. Preferibilmente,
15 il detto amiR, il rispettivo precursore o la rispettiva fonte, o un rispettivo equivalente, comprende o consiste in un polinucleotide avente una sequenza perfettamente complementare a una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO:3-53**, più preferibilmente a una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 18, 21 o 29**, o ai rispettivi trascritti. Preferibilmente, il detto amiR, o il rispettivo precursore o la rispettiva fonte, comprende
20 la sequenza **SEQ ID NO: 171-173**, o un rispettivo equivalente, più preferibilmente comprende o consiste nella sequenza **SEQ ID NO: 177-179**, o un rispettivo equivalente. Opzionalmente, il detto agente terapeutico comprende, inoltre, almeno un inibitore di LSD1, preferibilmente il detto inibitore essendo un silenziatore genetico o una piccola molecola, più preferibilmente essendo un silenziatore genetico.

25 Conformemente alle realizzazioni preferite dell'invenzione, l'agente terapeutico comprende almeno un silenziatore genetico rappresentato da un precursore, o da una fonte, o da un rispettivo equivalente, di un amiR che targetizza LSD1. Preferibilmente, il detto silenziatore genetico è un precursore, o un rispettivo equivalente, di un amiR che targetizza una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 54-138**, più preferibilmente che
30 targetizza una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 68, 72 o 90**, o i rispettivi trascritti. Preferibilmente, il detto amiR, o il rispettivo precursore o la rispettiva fonte, o un rispettivo equivalente, comprende un polinucleotide avente una sequenza perfettamente

complementare a una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 54-138**, più preferibilmente a una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 68, 72 o 90**, o ai rispettivi trascritti. Preferibilmente, il detto amiR, o il rispettivo precursore o la rispettiva fonte, comprende la sequenza **SEQ ID NO: 174-176**, o un rispettivo equivalente, più preferibilmente comprende o consiste nella sequenza **SEQ ID NO: 180-182**, o un rispettivo equivalente. Opzionalmente, detto agente terapeutico comprende, inoltre, almeno un inibitore di PRMT6, preferibilmente il detto inibitore essendo un silenziatore genetico.

Conformemente alle realizzazioni preferite dell'invenzione, l'agente terapeutico comprende almeno un silenziatore genetico che è una fonte, o un rispettivo equivalente, di un amiR o del rispettivo precursore che targetizza PRMT6. Preferibilmente, il detto silenziatore genetico è una fonte, o rispettivo equivalente, di un amiR o del rispettivo precursore che targetizza una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 3-53**, più preferibilmente una delle sequenze **SEQ ID NO: 18, 21 o 29**, o i rispettivi trascritti. Preferibilmente, la detta fonte di amiR o rispettivo equivalente, comprende un polinucleotide avente una sequenza perfettamente complementare a una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 3-53**, più preferibilmente a una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 18, 21 o 29**, o ai rispettivi trascritti. Preferibilmente, la detta fonte di amiR, comprende o consiste nella sequenza **SEQ ID NO: 183-185**, o rispettivo equivalente. Opzionalmente, il detto agente terapeutico comprende, inoltre, almeno un inibitore di LSD1, preferibilmente il detto inibitore essendo un silenziatore genetico o una piccola molecola, più preferibilmente essendo un silenziatore genetico.

Conformemente alle realizzazioni preferite dell'invenzione, l'agente terapeutico comprende almeno un silenziatore genetico rappresentato da una fonte, o da un rispettivo equivalente, di un amiR o del rispettivo precursore che targetizza LSD1. Preferibilmente, il detto silenziatore genetico è una fonte o un rispettivo equivalente di un amiR o del rispettivo precursore che targetizza una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 54-138**, più preferibilmente una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 68, 72 o 90**, o i rispettivi trascritti. Preferibilmente, la detta fonte di amiR, o rispettivo equivalente, comprende un polinucleotide avente una sequenza perfettamente complementare a una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 54-138**, più preferibilmente a una qualsiasi delle sequenze **SEQ ID NO: 68, 72 o 90**, o ai rispettivi trascritti. Preferibilmente, la detta fonte di amiR comprende o consiste nella sequenza **SEQ ID NO: 186-188**, o rispettivo equivalente.

Opzionalmente, il detto agente terapeutico comprende, inoltre, almeno un inibitore di PRMT6, preferibilmente il detto inibitore essendo un silenziatore genetico.

Le molecole di RNAi, o i rispettivi precursori o le rispettive fonti, e loro equivalenti, possono essere implementati mediante qualsiasi tecnica nota a un esperto del settore, come, ad esempio, sintesi chimica, produzione enzimatica o produzione biologica, inclusi i procedimenti che coinvolgono la tecnologia del DNA ricombinante.
5

Le molecole di RNAi o i rispettivi precursori sono tipicamente realizzati mediante sintesi chimica.

Preferibilmente, la molecola di RNAi è veicolata a una cellula come precursore o fonte della molecola di RNAi. La fonte di RNAi è preferibilmente prodotta mediante procedimenti ricombinanti per la produzione di acidi nucleici in una cellula, noti agli esperti del settore. Essi includono l'uso di vettori, plasmidi, cosmidi e altri veicoli per veicolare un acido nucleico a una cellula, la quale può essere la cellula target o semplicemente una cellula ospite (allo scopo di generare elevate quantità della molecola di RNAi desiderata).
10
15

Conformemente alle realizzazioni preferite, l'agente terapeutico può comprendere almeno un silenziatore genetico rappresentato da un agente di editing genomico.

L'“agente di editing genomico” è un agente comprendente una nucleasi ingegnerizzata che può mediare l'interruzione dei geni targetizzati. Tali nucleasi possono essere veicolate ad una cellula target mediante l'utilizzo di vettori, come ad esempio vettori virali o non virali.
20

Esempi di nucleasi idonee per l'editing genomico includono le nucleasi a dita di zinco (*zinc finger nucleases*, ZFN), le nucleasi effettive simili ad attivatori di trascrizione (*transcription activator like effector nucleases*, TALEN), e il sistema di brevi ripetizioni 25 palindromi raggruppate e separate a intervalli regolari (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, CRISPR)/Cas (Gaj, T. et al. (2013) Trends Biotechnol. 31: 397-405). Le meganucleasi (Silve, G. et al. (2011) Cur. Gene Ther. 11: 11-27) possono essere altresì impiegate quali nucleasi idonee per l'editing genomico.

Il “sistema CRISPR/Cas” si riferisce, collettivamente, ai trascritti e altri elementi coinvolti nell'espressione di, o direzionanti l'attività di, geni CRISPR-associati (“Cas”), incluse le sequenze che codificano un gene Cas e un RNA guida, in cui l'RNA guida (gRNA o sgRNA) può essere selezionato per permettere a un dominio Cas di essere
30

targetizzato verso una specifica sequenza (van der Oost et al. (2014) *Nat. Rev. Microbiol.* 12: 479-92). I procedimenti per il disegno dei gRNA sono noti nel settore. Inoltre, proteine Cas9 completamente ortogonal, così come complessi ribonucleoproteici Cas9/gRNA e modifiche della struttura/composizione del gRNA per il legame a diverse 5 proteine, sono stati recentemente sviluppati per targetizzare in modo simultaneo e direzionale diversi domini effettori verso siti genomici delle cellule desiderati (Esveld et al. (2013) *Nat. Methods* 10: 1116-21), e sono idonei per essere utilizzati nell'invenzione. Conformemente alle realizzazioni preferite dell'invenzione, l'agente terapeutico comprende, o consiste in, almeno un agente di editing genomico comprendente almeno 10 una nucleasi che targetizza PRMT6 e/o almeno una nucleasi che targetizza LSD1; più preferibilmente, il detto almeno un agente di editing genomico è un sistema CRISPR/Cas comprendente almeno una molecola di RNA non codificante (RNA guida), comprendente una sequenza guida che si lega, in modo sequenza-specifico, al gene di PRMT6 e/o di LSD1, e una proteina Cas (ad es., Cas9 o simili), con funzionalità di nucleasi.

15 Conformemente a realizzazioni particolarmente preferite, l'agente terapeutico comprende, o consiste in, almeno un sistema CRISPR/Cas comprendente almeno un gRNA comprendente una sequenza guida che è complementare a una sequenza target nel gene di PRMT6, e/o comprendente almeno un gRNA comprendente una sequenza guida che è complementare a una sequenza target nel gene di LSD1; il sistema CRISPR/Cas comprende, inoltre, un acido nucleico che codifica una nucleasi Cas sito-diretta, preferibilmente una nucleasi Cas9 o una rispettiva variante.

Conformemente alle realizzazioni maggiormente preferite, l'agente terapeutico comprende, o consiste in, almeno un sistema CRISPR/Cas comprendente almeno un gRNA e almeno un acido nucleico che codifica una nucleasi Cas sito-diretta, in cui detto 20 almeno un gRNA comprende una sequenza guida che è complementare a una sequenza target nel gene di PRMT6, in cui la detta sequenza guida è selezionata dal gruppo composto da **SEQ ID NO: 236-334**, e/o in cui il detto almeno un gRNA comprende una sequenza guida che è complementare a una sequenza target nel gene di LSD1, in cui la detta sequenza guida è selezionata dal gruppo composto da **SEQ ID NO: 335-431**.

25 Le sequenze guida del gRNA preferite idonee per l'uso secondo la presente invenzione sono riportate nella Tabella 1 che segue; per ogni gRNA sono altresì riportate le sequenze PAM tagliate nei geni target.

Tabella 1. gRNA

gRNA sequenza guida che targetizza PRMT6	SEQ ID NO:	Sequenza PAM del gene PRMT6
GCUGUACUACGAGUGCUACU	236	CGG
GGCAAGACGGUACUGGACGU	237	GGG
ACUGCGAGGCAAGACGGUAC	238	TGG
GAUACCCAGGCCGUAGGCAU	239	CGG
GGUGCAAGUGGAGCAAGACA	240	CGG
CAGAUGGCAAAGCCAUGCAU	241	GGG
UAUGGCUCGGCGCCCAUGCA	242	TGG
AGCCAGGUGAAGCAGCACUA	243	TGG
GCCCAUCCACUCGCUCACGA	244	TGG
UCCUCCACGCGCGAACCAAG	245	TGG
GGCAGCACUGCGAGGCAAGA	246	CGG
GCCAUCUGUGAGCGAGUGGAU	247	GGG
CCGAAGGGAUACCCAGGCGGU	248	AGG
GGCAACUCUACAGUCUCCAC	249	TGG
GGGGGCUAUGAAGAGCUCGG	250	CGG
AUCGUUGUGCGAGGGAUUGUC	251	CGG
CACUCGGAGAUCGUUGUGCA	252	GGG
UGUGCAGGGAUUGUCCGGCG	253	AGG
ACGAUGGCAUCCACCUGUUC	254	CGG
GUGGCCAUGAGACAGCGCG	255	TGG
GCGACCCGGAGGACUAAGC	256	GGG
CCAGGGGUAGGCAUCGGUG	257	CGG
UGGAUGCCAUCGUGAGCGAG	258	TGG
CGGUAGAGGCCAGCGCCAUC	259	TGG
GCAGUGCUGCCCAGUCCGA	260	AGG
CCCAGUUCCGAAGGAUACCC	261	AGG
CCUACCGCCUGGGUAUCCUU	262	CGG
CCUGGGUAUCCUUUCGGAACU	263	GGG
CGCACCGAUGCCUACCGCCU	264	GGG
CGUUCCCGCUUAGUCCUCCG	265	GGG
UCAGCCACUUGGUUCGCGCG	266	TGG
GGCUAUGAAGAGCUCGGCGG	267	AGG
ACAGAAAGAUGCUCAGAAUGC	268	CGG
GUGAGCGAGUGGAUGGGCUA	269	CGG
CCUGCACAAACGAUCUCCGAG	270	TGG
UCAGCGACCAGAUGCUGGAA	271	TGG
ACGGUACUGGACGUGGGCGC	272	GGG
AGCGCGUGGCAGAACCCUCC	273	AGG

CCCGGCCACUCACUGGAAAC	274	AGG
GGGAGGUGGUGCGGUUCAAC	275	GGG
GGCCGGGUGAAAAGGCGAGG	276	TGG
UCUACAGUCUCCACUGGUCC	277	CGG
CAGCUAGAGCUCUCCCCGCGC	278	CGG
GUUUCUCCGACUCCCCUCCA	279	GGG
CCGGCGCGUGUACGCGGUAG	280	AGG
GUGGAGGACGGAGCUCAGCA	281	TGG
GUGUCUUGCUCACUUGCAC	282	CGG
AGUCCUCCGGGGUCGCUCCA	283	GGG
UCUAGCUGAGCAAAGCGCUG	284	CGG
GUGGACAUGAGCUGCCUGGA	285	GGG
CCAGAUGGCAAAGCCAUGCA	286	TGG
CGAACCAAGUGGCUGAAGGA	287	GGG
GUUGAACCGCACCAACCUCCC	288	GGG
AAGGCAGGGUGGACAGCACC	289	AGG
GCGCUGUCUCAUGGGCCACU	290	CGG
AUGAAGAGCUCGGCGGAGGC	291	CGG
GGCCAGCGCCAUCUGGCAAC	292	AGG
CAGGCGACGGGGUUGUCCC	293	GGG
CAGGAGCUGGAGGCCGGAGU	294	GGG
UCUGAGCAUCUUCUGUGCCC	295	AGG
CGGAACUGGGCAGCACUGCG	296	AGG
AGGCGAGGUGGACAGCACCA	297	GGG
CGGGGCCCGGCGCGUGUACG	298	CGG
GGUCCACGAGGAGAUGAUCG	299	CGG
CCAGGCGCCAUUCCAGCAUC	300	TGG
CCCCAUCAGCGACCAGAUGC	301	TGG
AGUGGAGACUGUAGAGUUGC	302	CGG
GCAGCACGCGCAGGCGACGG	303	GGG
AGGGGAGUCGGAGAAACCCC	304	TGG
UCACCUGGCUCCAGAACGCC	305	AGG
GAAGACCAAAGACUUUGCCA	306	TGG
GGUGAACAGCACUAUGGUG	307	TGG
UGUAGCGCAGCAGCACGCGC	308	AGG
CUGGACGUGGGCGCGGGCAC	309	CGG
GCGCUACAAAGUGGGAGACC	310	AGG
GUGCUGCUGCGCUACAAAGU	311	GGG
GCGAACCAAGUGGCUGAAGG	312	AGG
GGCGAGGUGGACAGCACCAG	313	GGG
CCAGGUGACCUCUCCUGGAG	314	GGG
GAAGGUACACCUGGAACCAGA	315	TGG

AGUUCCGAAGGAUACCCAGG	316	CGG
GCAGCAGCACGCGCAGGCAGA	317	CGG
CCGAGCCAUGCAGCUGCAG	318	CGG
GUUCAACGGGCUGGAGGACC	319	GGG
GGUCCGCGAUCAUCUCCUCG	320	TGG
UGUGGACAUGAGCUGGCCUGG	321	AGG
AGCUCAGCAUGGACUCGUGC	322	AGG
ACCGCCCUCCUUCAGGCCACU	323	TGG
AUUGUCCGGCGAGGACGUGC	324	TGG
CCGGGCCAGCACGUCCUCGC	325	CGG
AGGCAACGCUCAGUCCUCCA	326	TGG
CUCCAGCUCCUGCUCCAAGC	327	CGG
GCAGGGAGCUGGAGGCCGGAG	328	TGG
CAGCAUCUGGUCGCUGAUGG	329	GGG
GAUGGGGGCUAUGAAGAGCU	330	CGG
ACCAAGUGGCUGAAGGGAGGG	331	CGG
UUGGAGCAGGAGCUGGAGGC	332	CGG
GAGGGAACUGAAGAGGAAGA	333	TGG
UUCCAGGUGACCUUCCUGG	334	AGG

gRNA sequenza guida che targetizza LSD1	SEQ ID NO:	Sequenza PAM del gene LSD1
AGUGCGACAGGUUCGCUACAA	335	CGG
UGUGGUCCACUGAUAAAUAUC	336	TGG
GGAUACUACAACUCACCCGA	337	TGG
UGGUACCGAGUGCAGUACCUC	338	AGG
UAUAAGGUGCUUCUAAUUGU	339	TGG
GCCACUAGUGCCAACAGUAU	340	TGG
GGAUCUGACCGCCUAUGCA	341	AGG
UGUAUACCACACCUUGCAUA	342	GGG
AAGAUGUAGCUUCUAGCAAC	343	CGG
UAGGGCAAGCUACCUUGUUA	344	AGG
UCUUAGUGAAAAGCAAACAC	345	AGG
UUUCUGAAACAGGAUCGUGU	346	GGG
AUGUAUACCACACCUUGCAU	347	AGG
ACAUCUGCAGUCCAAAGGAU	348	GGG
GGGACACAGGCUUUUUUAUG	349	AGG
AUAAGUGACGAUGUGAUUGU	350	TGG
GGGAUUUUGGCAACCUUAACA	351	AGG
GCAGUCCAAGGAUGGGAUU	352	TGG
AGUGCCAACAGUAUUGGAGC	353	TGG

UCAACUUUCGGCAUCUUAAG	354	AGG
AGAUGAUCCUGCAGCAACAU	355	AGG
AGUAGCCAUCUCCUUACUGUC	356	AGG
ACACACUACUUACUGUUUA	357	AGG
AAGAUGAGCAGAUUGAACAU	358	TGG
GAACUCGGCAGUAAUAUCUC	359	TGG
AACAUCUGCAGUCCAAAGGA	360	TGG
UGGUAGAGCAAGAGUUUAAC	361	CGG
GAAUAAGAGCCCCGAGCCCA	362	GGG
AUAAAUAAGGUUJUGACUCG	363	TGG
UGACCGCCUAUGCAAGGUG	364	TGG
UCGGCAGUAAUAUCUCUGGG	365	TGG
GGUCAGCAAACAAGUAAAUA	366	TGG
AAGGUAAUUAUUAUAGGCUC	367	TGG
GAAGGCAUUUACCUUUAUAG	368	AGG
AAGAACACUGGGUGUCUCGU	369	TGG
ACCAAGACCUGUUACCACCA	370	TGG
AUACUGUUGGCACUAGUGGC	371	AGG
UGCCCGAACAAAUGACACU	372	TGG
AGGAGAACUGCUGGUUAUCA	373	TGG
AGGUAAUUAUUAUAGGCUCU	374	GGG
AGUGAGCCUGAAGAACCAUC	375	GGG
AGGAGGUCCUUACUUGGUAG	376	GGG
AAGUGAGCCUGAAGAACAU	377	CGG
UUCAAGACGACAGUUCUGGA	378	GGG
AUAGGUAGAGUACAGAGAGA	379	TGG
UGAAAUGGAAACUUACUGUG	380	CGG
AAUGCUGGCCAAGGGACAC	381	AGG
GGAAAACAUCUGCAGUCCAA	382	AGG
GGCGCAAGCGGGCGAAGGUA	383	AGG
GGUCAUGAGGAAGUCGGCUC	384	TGG
UCGUUGGCGUGCUGAUCCU	385	GGG
GAGAGGUGGCACAAACUGAA	386	CGG
CAAACAAGUAAAUAUGGAAC	387	TGG
UCGACUUACAGCUUGUCCGU	388	TGG
CUUAGUGAAAAGCAAACACA	389	GGG
AGGAGGGAAUCCUAUGGCUG	390	TGG
AACUCGGCAGUAAUAUCUCU	391	GGG
AGUUGGAAGCGAAUCCCCCA	392	AGG
AGAGCCGACUUCCUCAUGAC	393	CGG
GAGCACCAUGCACUGUGGCU	394	GGG
UGGACCACAAACAGACCCAGA	395	AGG

AGGCCUUCUGCUAAAGCCAC	396	AGG
CUCUUCUGGAACCUCUUAUA	397	AGG
UAGGAGGUCCUUACUUGGUA	398	GGG
AUACCACACCUUGCAUAGGG	399	CGG
ACUGAUAAAUAUCUGGAAAAC	400	AGG
AGCCACCUGACAGUAAGGAA	401	TGG
UCAUCCGGUCAUGAGGAAGU	402	CGG
GGUGGCACAAACUGAACGGC	403	TGG
GAUGCCUGGCCAUUCUCAAA	404	GGG
AAUAAAUCUCAUCUUCUGAG	405	AGG
AGUUCUCUGUACCCUUCCCC	406	TGG
CUGCUUCUUGAGAAGUCAUC	407	CGG
GAUGAUGACUUUGAGUUCAC	408	TGG
UGUGUCCUUGGCCAGGCAU	409	TGG
AAUGCAGCUGCAGUUGUGGU	410	TGG
AGCUGAUCUUGGAGCCAUGG	411	TGG
GCUUCAGCACACCCAGGGGA	412	AGG
AACUUCCAAUGCCUGGCCAA	413	GGG
GUAGGAGGUCCUUACUUGGU	414	AGG
GGAAUAGCAGAGACUCCGGA	415	GGG
CCGCAAGAAAGAGGCCUCCGC	416	GGG
GCUGCUGCUUCAGCACACCC	417	AGG
UGGUAAAAGGACACUGUCA	418	AGG
GAGACAGACAAAUCUUGAU	419	TGG
GUGCCUGUGGCCUUUAGCAGA	420	AGG
CUUCAGCACACCCAGGGGA	421	GGG
GUUCUCUGUACCCUUCCCC	422	GGG
UGCUGCUUCAGCACACCCAG	423	GGG
GAAGAAGAUAGUGAAAACUC	424	AGG
AGUUCUGGAGGGUAUGGAGA	425	CGG
CUGCUGCUUCAGCACACCCA	426	GGG
UCCUCAGGUGGGGUUGAGG	427	GGG
GAAUAGCAGAGACUCCGGAG	428	GGG
GAAGCGAAUCCCCAAGGUA	429	AGG
AGGCUCUGGGGUUCAGGCU	430	TGG
AAGUCCUCCUGCUUGCCCUG	431	TGG

Preferibilmente, l'agente terapeutico comprendente almeno un silenziatore genetico che targetizza LSD1, Opzionalmente comprendente, inoltre, almeno un inibitore di PRMT6, è per l'uso nel trattamento della SBMA o di un cancro, più preferibilmente della SBMA.

- 5 Preferibilmente, l'agente terapeutico comprendente almeno un silenziatore genetico che

targetizza PRMT6, Opzionalmente comprendente, inoltre, almeno un inibitore di LSD1, è per l'uso nel trattamento di un cancro o della SBMA, più preferibilmente del cancro alla prostata.

Preferibilmente, l'agente terapeutico comprende almeno due silenziatori genetici, più
5 preferibilmente almeno due molecole di RNAi o almeno due agenti di editing genomico, in cui almeno uno targetizza PRMT6 e almeno uno targetizza LSD1.

Conformemente agli aspetti preferiti della presente invenzione, l'agente terapeutico dell'invenzione comprende almeno un silenziatore genetico di un coattivatore di AR e comprende, inoltre, un veicolo di veicolazione per la veicolazione del detto silenziatore genetico in una cellula, preferibilmente il detto veicolo di veicolazione essendo selezionato da: un vettore virale, microsfere, liposomi, nanoparticelle, microparticelle, particelle di oro colloidale, lipopolisaccaridi, polipeptidi, polisaccaridi, collagene, pegilazione di veicoli virali, composti di grafene, coniugati di colesterolo, complessi di ciclodestrano o polimeri di polietilenimmina. Preferibilmente, il detto veicolo di veicolazione è un vettore virale, più preferibilmente selezionato da: un vettore virale adeno-associato, un vettore lentivirale, un vettore adenovirale, un vettore retrovirale, un vettore virale alfa, un vettore virus del vaccino, un vettore virus dell'herpes simplex (HSV), un vettore virus della rabbia e un vettore Sindbis virus.
10
15

Conformemente a realizzazioni preferite, l'agente terapeutico comprende almeno una fonte di molecole di RNAi e un veicolo di veicolazione, comprendente la fonte di molecole di RNAi; più preferibilmente, il veicolo di veicolazione è un vettore virale, in modo maggiormente preferito un vettore virale adeno-associato ricombinante (“AAV ricombinante”).
20

L'AAV ricombinante è una particella virale contenente due elementi, un capsid AAV e un genoma del vettore comprendente sequenze codificanti non-AAV impacchettate all'interno del capsid AAV. Il rAAV è un “virus a replicazione difettosa” o “vettore virale”, in quanto esso è privo di qualsiasi gene rep AAV funzionale o gene cap AAV funzionale e non può generare progenie. In alcune realizzazioni, le uniche sequenze AAV sono le sequenze AAV delle ripetizioni invertite terminali (*inverted terminal repeat*, ITR), tipicamente ubicate alle estremità 5' e 3' estreme del genoma vettoriale, allo scopo di consentire al gene e alle sequenze regolatrici ubicate fra le ITR di essere impacchettate all'interno del capsid AAV.
25
30

Salvo quanto diversamente specificato, il capsid AAV, le ITR e gli altri componenti AAV selezionati qui descritti possono essere selezionati senza difficoltà fra qualsiasi AAV, inclusi, senza limitazione alcuna, gli AAV identificati quali AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh1O, AA Vhu37, AAVrh32.33, 5 AAV8bp, AAV7M8 e AAVAnc80, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9.47, AAV9(hul4), AAV 10, AAV 11, AAV 12, AAVrh8, AAVrh74, AAV-DJ8, AAV-DJ, AA Vhu68; in modo maggiormente preferito, il vettore virale è un vettore virale ricombinante AAV9.

Vantaggiosamente, risulta possibile clonare più di una fonte di silenziatori genetici nello stesso vettore, consentendo di utilizzare la stessa quantità di virus per targetizzare due geni.

La produzione della particella virale per la veicolazione di un silenziatore genetico conformemente all'invenzione può essere effettuata mediante tecniche note nel settore (si vedano, ad es., WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 15 B2).

Preferibilmente, il vettore per veicolare il silenziatore genetico in una cellula è un plasmide non virale che comprende una cassetta di espressione per l'espressione del silenziatore genetico. Opzionalmente, il plasmide o altre sequenze di acidi nucleici sono veicolati mediante un idoneo dispositivo, ad es., mediante eletrospray, elettroporazione.

20 In altre realizzazioni, il silenziatore genetico è accoppiato a diverse composizioni e nanoparticelle, fra cui, ad es., nanoparticelle d'oro o di silice, lipidi, polimeri, micelle, liposomi, esosomi, composizioni di lipidi cationici - acidi nucleici (lipoplessi), composizioni di poliglicani e altri polimeri, coniugati di acidi nucleici a base di lipidi e/o colesterolo, e altri. Maggiormente preferiti, per la veicolazione del silenziatore genetico 25 in una cellula, risultano i lipoplessi biocompatibili, come ad esempio quelli descritti in Nicoletti et al. 2022⁵.

Preferibilmente, la molecola di RNAi, il rispettivo precursore o il rispettivo equivalente sono incapsulati in una nanoparticella, più preferibilmente in una nanoparticella lipidica (LNP). Così come qui utilizzata, la dicitura "nanoparticella lipidica" si riferisce a un veicolo di trasferimento comprendente uno o più lipidi (ad es., lipidi cationici, lipidi non cationici e lipidi PEG-modificati). Esempi di idonei lipidi includono, ad esempio, i composti fosfatidilici (ad es., fosfatidilglicerolo, fosfatidilcolina, fosfatidilserina,

fosfatidiletanolammina, sfingolipidi, cerebrosidi e gangliosidi). Altresì contemplato è l'utilizzo di polimeri quali veicoli di trasferimento, da soli o in combinazione con altri veicoli di trasferimento. Polimeri idonei possono includere, ad esempio, poliacrilati, polialchilcianoacrilati, polilattide, copolimeri polilattide - poliglicolide, policaprolattoni, 5 destrano, albumina, gelatina, alginato, collagene, chitosano, ciclodestrine, dendrimeri e polietilenimmina.

Nanoparticelle lipidiche utili per l'RNA comprendono un lipide cationico atto a incapsulare e/o aumentare la veicolazione di una molecola di RNAi o del rispettivo precursore nella cellula target. Così come qui utilizzata, la dicitura "lipide cationico" si 10 riferisce a una qualsiasi di una serie di specie di lipidi che trasportano una carica positiva netta a un pH selezionato, come ad esempio il pH fisiologico. Le nanoparticelle lipidiche contemplate possono essere preparate includendo miscele lipidiche multicomponenti con rapporti variabili, le quali includono uno o più lipidi cationici, lipidi non cationici e lipidi PEG-modificati. Diversi lipidi cationici sono stati descritti in letteratura, molti dei quali 15 sono disponibili in commercio. La formulazione LNP può essere eseguita utilizzando procedure di routine comprendenti colesterolo, lipidi ionizzabili, lipidi helper, lipidi PEG e polimeri che formano un doppio strato lipidico attorno al mRNA incapsulato. Preferibilmente, LNP comprende un lipide cationico (ovvero, N-[l-(2,3-dioleoilossi) propil]-N, N, N- trimetilammonio cloruro (DOTMA), 1,2-dioleoil-3-trimetilammonio- 20 propano (DOTAP)) con lipide helper DOPE, un lipide ionizzabile Dlin-MC3-DMA, o lipidi ionizzabili a base di dichetopiperazina (cKK- E12). Preferibilmente, il polimero comprende una polietilenimmina (PEI), o un poli(-ammino) estere (PBAE).

Conformemente alle realizzazioni preferite dell'invenzione, l'agente terapeutico comprende almeno un inibitore a piccola molecola di PRMT6 e/o di LSD1; più 25 preferibilmente, l'agente terapeutico comprende almeno un inibitore a piccola molecola di LSD1, che è un inibitore di monoammino ossidasi (MAOI), in modo maggiormente preferito fenelzina, tranicipromina, o rispettive miscele. Opzionalmente, l'agente terapeutico dell'invenzione comprende un inibitore a piccola molecola insieme a un inibitore silenziatore genetico. Preferibilmente, sia il silenziatore genetico, sia l'inibitore 30 a piccola molecola inibiscono PRMT6, o sia il silenziatore genetico, sia l'inibitore a piccola molecola inibiscono LSD1; più preferibilmente, l'agente terapeutico comprende almeno un inibitore a piccola molecola di LSD1 e almeno un silenziatore genetico di

PRMT6 e/o almeno un silenziatore genetico di LSD1.

L'agente terapeutico dell'invenzione può essere somministrato a un soggetto da solo o in forma di formulazione farmaceutica comprendente uno o più veicoli, diluenti o eccipienti fisiologicamente accettabili.

5 La dicitura "diluenti o eccipienti farmaceuticamente (o "fisiologicamente") accettabili" si riferisce a un filler, a un diluente, a materiale di incapsulamento o a una formulazione ausiliaria, solidi, semisolidi o liquidi, non tossici, di qualsiasi tipo convenzionale, che possano opzionalmente essere inclusi nelle composizioni dell'invenzione e che non causino al paziente effetti tossicologici avversi significativi. Un eccipiente

10 farmaceuticamente accettabile è essenzialmente non tossico per i destinatari ai dosaggi e alle concentrazioni impiegati ed è compatibile con gli altri principi della formulazione. Il numero e la natura degli eccipienti farmaceuticamente accettabili dipendono dalla forma di somministrazione desiderata. Gli eccipienti farmaceuticamente accettabili sono noti e possono essere preparati mediante procedimenti noti nel settore.

15 Così come qui utilizzato, "veicolo farmaceuticamente accettabile" include qualsivoglia e tutti i solventi, mezzi di dispersione, rivestimenti, tensioattivi, antiossidanti, conservanti (ad es., agenti antibatterici, agenti antifungini), agenti isotonici, agenti ritardanti dell'assorbimento, sali, conservanti, farmaci, stabilizzatori di farmaci, gel, leganti, eccipienti, agenti disgreganti, lubrificanti, agenti edulcoranti, agenti aromatizzanti, coloranti, materiali simili e rispettive combinazioni, così come noti agli esperti del settore (si veda, ad esempio, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, qui incorporato mediante riferimento).

20 La formulazione corretta dipende dall'inibitore da somministrare e dalla modalità di somministrazione. Ad esempio, quando l'agente terapeutico comprende sia inibitori a piccole molecole, sia silenziatori genetici, ciascuno di essi è somministrato con una diversa formulazione a un soggetto che ne abbia necessità. Ad esempio, gli inibitori a piccole molecole possono essere somministrati quali formulazioni solide, mentre il silenziatore genetico può essere somministrato quale formulazione liquida comprendente un idoneo veicolo per l' veicolazione del silenziatore genetico.

25 30 Le formulazioni sistemiche includono quelle concepite per la somministrazione mediante iniezione, ad es., iniezione sottocutanea, endovenosa, intramuscolare, intratecale o intraperitoneale, così come quelle concepite per una somministrazione transdermica,

transmucosa, per inalazione, orale o polmonare.

Relativamente all'iniezione, l'agente terapeutico o la formulazione farmaceutica dell'invenzione possono essere formulati in soluzioni acquose, preferibilmente in buffer fisiologicamente compatibili fra cui soluzione di Hanks, soluzione di Ringer o buffer
5 salino fisiologico. La soluzione può contenere agenti di formulazione fra cui agenti di sospensione, stabilizzanti e/o disperdenti.

In alternativa, l'agente terapeutico o la formulazione farmaceutica possono essere in forma solida o possono essere in forma di polvere da costituire con un idoneo veicolo, ad es., acqua sterile priva di pirogeni, prima dell'uso. Relativamente alla somministrazione
10 transmucosa, nella formulazione vengono usati agenti penetranti idonei per la barriera da permeare. Tali agenti penetranti sono generalmente noti nel settore.

Relativamente alla somministrazione orale, ad es., la somministrazione di un agente terapeutico comprendente un inibitore a piccole molecole, l'agente terapeutico o la formulazione farmaceutica possono essere formulati facilmente combinando le molecole
15 con veicoli farmaceuticamente accettabili noti nel settore. Tali vettori consentono agli acidi nucleici dell'invenzione di essere formulati come compresse, pillole, confetti, capsule, liquidi, gel, sciroppi, fluidi, sospensioni e simili, per l'ingestione da parte di un paziente da trattare. Relativamente alle formulazioni orali solide fra cui, ad esempio, polveri, capsule e compresse, eccipienti idonei includono filler fra cui zuccheri, ad es.,
20 lattosio, saccarosio, mannitol sorbitolo; preparazioni cellulosiche fra cui amido di mais, amido di frumento, amido di riso, fecola di patate, gelatina, gomma adragante, metilcellulosa, idrossipropilmethylcellulosa, carbossimethylcellulosa sodica e/o polivinilpirrolidone (PVP); agenti di granulazione; e agenti leganti. Qualora lo si desideri, possono essere aggiunti agenti disgreganti, come ad esempio polivinilpirrolidone
25 reticolato, agar, acido alginico o un rispettivo sale, come alginato di sodio. Qualora lo si desideri, le forme di dosaggio solide possono essere rivestite con zuccheri o rivestimenti enterici, utilizzando tecniche standard. Relativamente alle preparazioni orali liquide fra cui, ad esempio, sospensioni, elisir e soluzioni, i veicoli, eccipienti o diluenti idonei includono acqua, glicoli, oli, alcol, ecc. Inoltre, possono essere aggiunti agenti aromatizzanti, conservanti, agenti coloranti e simili. Relativamente alla somministrazione
30 buccale, l'agente terapeutico o la formulazione farmaceutica possono assumere la forma di compresse, pasticche, ecc., formulate secondo modalità tradizionali.

Relativamente alla somministrazione per inalazione, l'agente terapeutico o la formulazione farmaceutica per l'uso conformemente alla presente invenzione sono comodamente veicolati in forma di spray aerosol, da flaconi in pressione o da un nebulizzatore, mediante l'utilizzo di un idoneo propellente. Oltre alle formulazioni descritte in precedenza, l'agente terapeutico o la formulazione farmaceutica per l'uso conformemente alla presente invenzione possono essere altresì formulati come preparazione di deposito. Tali preparazioni ad azione prolungata possono essere somministrate mediante impianto (ad esempio a livello sottocutaneo o intramuscolare) o mediante iniezione intramuscolare.

L'agente terapeutico o la formulazione farmaceutica conformemente alla presente invenzione possono essere somministrati per via endovenosa, intradermica, intraarteriosa, intraperitoneale, intralesionale, intracranica, intraarticolare, intraprostatica, intrapleurica, intratracheale, intranasale, intravitrea, intravaginale, intrarettale, topica, intratumorale, intramuscolare, sottocutanea, subcongiuntivale, intravascolare, mucosale, intrapericardica, intraombelicale, intraoculare, mediante inalazione (ad es. inalazione con aerosol), per iniezione, infusione, infusione continua, mediante un catetere, mediante una lavanda, in composizioni lipidiche (ad es., liposomi), o mediante qualsiasi procedimento o combinazione di quanto precede, così come noto a un esperto del settore (si veda, ad esempio, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, qui incorporato mediante riferimento).

Preferibilmente, relativamente alla somministrazione a un soggetto umano che ne abbia necessità, l'agente terapeutico comprendente un vettore per la veicolazione di un silenziatore genetico è idoneamente sospeso in una soluzione acquosa contenente soluzione fisiologica, un tensioattivo, e un sale o una miscela di sali fisiologicamente compatibili. In modo opportuno, la formulazione è regolata a un pH fisiologicamente accettabile, ad es., nell'intervallo di pH 6 a 9, o di pH 6,5 a 7,5, pH 7,0 a 7,7, o pH 7,2 a 7,8. Dato che il pH del liquido cerebrospinale è circa 7,28 a circa 7,32, o 7,2 a 7,4, relativamente a un'erogazione intratecale, può essere desiderato un pH entro tale intervallo; mentre, relativamente a un'erogazione endovenosa, può essere desiderato un pH di circa 6,8 a circa 7,2. Tuttavia, possono essere selezionati altri pH all'interno di intervalli più ampi e tali sottointervalli possono essere selezionati per altre vie di veicolazione.

Preferibilmente, la formulazione può contenere uno o più esaltatori della permeazione. Esempi di idonei esaltatori della permeazione possono includere, ad es., mannitolo, sodio glicocolato, sodio taurocolato, sodio desossicolato, sodio salicilato, sodio caprilato, sodio caprato, sodio laurilsolfato, poliossietilene-9-lauriletere, o EDTA.

- 5 Preferibilmente, la formulazione può contenere, oltre a un vettore (ad es., rAAV) e a uno o più veicoli, altri principi farmaceutici convenzionali, come ad esempio conservanti, o stabilizzatori chimici.

L’agente terapeutico comprendente un vettore per la veicolazione di un silenziatore genetico è somministrato in quantità sufficienti per fornire a una cellula un livello 10 sufficiente di silenziatore genetico, in modo da offrire un beneficio terapeutico senza effetti collaterali indesiderati, o con effetti fisiologici accettabili a livello medico, che possono essere determinati dagli esperti del settore medico. I dosaggi di un vettore da somministrare per la veicolazione dell’inibitore di PRMT6 e/o di LSD1 conformemente all’invenzione dipendono, principalmente, da fattori fra cui la condizione da trattare, l’età, 15 il peso e la condizione di salute del paziente, e possono quindi variare da paziente a paziente. Ad esempio, un dosaggio umano terapeuticamente efficace del vettore virale si trova, generalmente, nell’intervallo compreso fra circa 25 a circa 1000 microlitri a circa 100 mL di soluzione contenente concentrazioni comprese fra circa 1×10^9 a 1×10^{16} 20 genomi del vettore virale (per il trattamento di un soggetto medio di 70 kg di peso corporeo), incluse tutte le quantità intere e le frazioni all’interno dell’intervallo.

Il medico responsabile della somministrazione determina, in ogni caso, la concentrazione del o dei principi attivi in una composizione e la o le dosi adeguate al singolo soggetto. Le diciture “forma di dosaggio unitario” o “dose unitaria”, così come qui utilizzate, si riferiscono a unità fisicamente discrete idonee quali dosaggi unitari per soggetti umani e animali, ciascuna unità contenente una quantità predeterminata del composto, della composizione o della formulazione da somministrare, calcolata in una quantità sufficiente per produrre l’effetto desiderato in associazione con un diluente, vettore o veicolo farmaceuticamente accettabile. Le specifiche per le forme di dosaggio unitario per l’uso 25 nella presente invenzione dipendono dal composto particolare impiegato e dall’effetto da raggiungere, dalla farmacodinamica associata a ogni composto nell’ospite, e simili.

Preferibilmente, una dose unitaria di una formulazione farmaceutica per la somministrazione dell’agente terapeutico può comprendere, ad esempio, almeno circa 30

0,1% in peso, 1- 90% in peso, 2-75% in peso, 25-60% in peso, dell'agente terapeutico, sulla base del peso della dose unitaria, nonché qualsiasi intervallo ivi derivabile. In altri esempi non limitativi, la dose unitaria può altresì comprendere meno di 1 µg/kg/peso corporeo, o 1 µg/kg/peso corporeo, da 5 µg/kg/peso corporeo, 10 µg/kg/peso corporeo,
5 50 µg/kg/peso corporeo, 100 µg/kg/peso corporeo, 200 µg/kg/peso corporeo, 350 µg/kg/peso corporeo, 500 µg/kg/peso corporeo, 1 mg/kg/peso corporeo, 5 mg/kg/peso corporeo, 10 mg/kg/peso corporeo, 50 mg/kg/peso corporeo, 100 mg/kg/peso corporeo, 200 mg/kg/peso corporeo, 350 mg/kg/peso corporeo, o 500 mg/kg/peso corporeo, a 1000 mg/kg/peso corporeo o oltre per singola somministrazione, nonché qualsiasi intervallo ivi derivabile.
10 In esempi non limitativi di un intervallo derivabile dai numeri qui elencati, può essere somministrato un intervallo compreso di 5 mg/kg/peso corporeo a 100 mg/kg/peso corporeo, di 5 µg/kg/peso corporeo a 500 mg/kg/peso corporeo, ecc., sulla base dei numeri descritti in precedenza.

Preferibilmente, una formulazione farmaceutica conformemente all'invenzione, comprendente almeno un inibitore a piccola molecola, viene somministrata a una dose giornaliera di 1-100 mg, preferibilmente a una dose giornaliera di 5-100 mg, 10-100 mg, o 15-100 mg. Ad esempio, una formulazione farmaceutica comprendente un MAOI può essere somministrata a una dose di 15-30 mg, da una a tre volte al giorno, preferibilmente il dosaggio somministrato aumentando nel tempo.

20 Pertanto, possono essere ottenuti livelli terapeuticamente efficaci dell'agente terapeutico somministrando una pluralità di dosi ogni giorno. La quantità di agente terapeutico somministrato dipenderà, ovviamente, dal soggetto trattato, dal peso del soggetto, dalla gravità dello stato, dalla modalità di somministrazione e dalla valutazione del medico curante.

25 Preferibilmente, una dose terapeuticamente efficace delle molecole qui descritte fornirà un beneficio terapeutico senza provocare alcuna tossicità sostanziale. La tossicità delle molecole qui descritte può essere determinata mediante procedure farmaceutiche standard nelle colture cellulari o animali da esperimento, ad es., determinando la dose Massima tollerata (Ann. Pharm, Fr, 2010, 291-300). Il rapporto di dosaggio fra l'effetto
30 tossico e quello terapeutico rappresenta l'indice terapeutico. I dati ottenuti da tali saggi in colture cellulari e studi sugli animali possono essere utilizzati per la formulazione di un intervallo di dosaggio che non sia tossico per un uso umano.

Si comprenderà che tutte le possibili combinazioni degli aspetti preferiti della presente invenzione sono altresì descritte e, pertanto, analogamente preferite.

Gli esempi delle realizzazioni preferite della presente invenzione e le analisi della rispettiva efficacia sono riportati di seguito, per finalità illustrate e non limitative.

- 5 In particolare, così come mostrato negli esempi che seguono, gli agenti terapeutici conformemente all'invenzione sono in grado di normalizzare l'espressione dei coattivatori di AR *in vivo*. Ciò risulta particolarmente importante per LSD1, la cui ablazione genetica risulta letale, ma anche, in generale, dato che, nei soggetti trattati, i coattivatori di AR inibiti sono in grado di mantenere la loro funzione fisiologica.
- 10 Vantaggiosamente, gli amiR che targetizzano i coattivatori di AR esercitano un effetto terapeutico nei modelli di cancro alla prostata e di SBMA.
- 15 Inoltre, si dimostra che la targetizzazione dei coregolatori di AR sovraespressi che aumentano il GOF tossico dell'AR mutante modifica anche l'espressione dei geni coinvolti nelle vie disregolate nel muscolo affetto da SBMA e rappresenta una chiave per la fisiologia e l'omeostasi dei muscoli. Tali vie includono contrazione muscolare e assemblaggio delle miofibrille, glicolisi e metabolismo. Nonostante il numero di geni recuperati sia limitato rispetto al numero totale di geni disregolati nel muscolo affetto da SBMA, tale effetto è associato ad un miglioramento del fenotipo in un modello murino grave di SBMA. Inoltre, nonostante l'amiR sia veicolato in modo sistematico, la 20 sottoregolazione di LSD1 e di PRMT6 si è mostrata significativa solamente nel muscolo scheletrico, coerentemente con l'idea secondo cui le espansioni poliQ nell'AR inducono la trascrizione di tali coregolatori, i quali, a loro volta, potenziano la funzione dell'AR, cosicché mezzi per bloccare o attenuare tale meccanismo feed-forward hanno effetti sul muscolo scheletrico. Il fatto che il silenziamento del gene target non sia significativo in 25 altri tessuti è coerente con l'idea secondo cui tale meccanismo patogenico si verifica, specificamente, nel muscolo scheletrico.

ESEMPI

MATERIALI E METODI

Animali e trattamenti

- 30 I protocolli di cura animale sono conformi alle normative nazionali applicabili (art. 31, D.lgs. 26/2014) e alle linee guida del Consiglio dell'Unione Europea (2010/63/UE) e sono stati approvati dai comitati etici locali (Università di Trento e Padova, Italia) e dal

Ministero della Salute Italiano. Topi transgenici AR100Q e topi knock-in AR113Q sono stati genotipizzati. I topi sono stati castrati chirurgicamente. I topi sono stati sottoposti a iniezione intraperitoneale di soluzione fisiologica o di AAV di amiR-Prmt6/Lsd1 a 21 giorni di età e sono stati valutati settimanalmente durante le settimane 4–14. I topi sono stati sottoposti a eutanasia quando hanno perso >20% del peso corporeo rispetto alla misurazione del peso massimo. Per le attività di rotarod e di sospensione alla barra (*hanging wire*), i topi sono stati randomizzati, e sia il genotipo, sia l’iniezione di AAV sono stati celati all’operatore. Gli animali sono stati abituati a correre su un rotarod accelerato (4–40 giri/min) (Panlab, apparecchio Harvard, LE8205) per un massimo di 300 secondi. Si è registrata la latenza di caduta, e si è riportata la migliore performance su tre prove. Relativamente al test di sospensione alla barra, i topi sono stati posizionati in cima al coperchio di una gabbia in filo metallico, il quale è stato scosso dolcemente tre volte per far sì che i topi afferrassero i fili, e poi il coperchio è stato capovolto. Si è registrata la latenza di caduta — per un massimo di 60 secondi. Relativamente all’analisi della sopravvivenza, l’agonia ha rappresentato il momento in cui il topo aveva perso il 20% del peso corporeo o evidenziava incapacità di movimento, disidratazione e cachessia.

Tutti gli stock di *Drosophila* sono stati mantenuti su un mezzo standard di farina di mais e nutriti con 2 mM di DHT a 28°C in incubatori a illuminazione/oscurità controllate. Le linee Lsd1 e Dart8 sono state ottenute dal Vienna Drosophila Resource Center (VDRC, ID stock per DART8: v100228, e per dLsd1: v106147). La linea AR52Q è stata descritta in precedenza². Le immagini oculari sono state catturate mediante un microscopio dissezionatore Leica M205C dotato di camera Leica DFC450. La degenerazione oculare è stata quantificata come descritto in precedenza².

Campioni umani

Il controllo deanonimizzato (n=5) e i campioni di biopsie dei pazienti (n=5) sono stati ottenuti dalla Neuromuscular Bank of Tissues and DNA Samples, Telethon Network of Genetic Biobanks, and EuroBioBank Network (**Tabella 2**). Tutte le biopsie muscolari sono state considerate per finalità diagnostiche dopo avere ottenuto il consenso informato scritto da ogni paziente, ai sensi della Dichiarazione di Helsinki. Tutti i pazienti sottoposti a biopsia muscolare erano clinicamente malati ed evidenziavano debolezza e/o fascicolazione e/o atrofia muscolare. Nelle biopsie muscolari, si sono osservate variazioni miopatiche unitamente ad atrofia neurogena. I campioni di controllo sono stati ottenuti da

soggetti che non soffrivano di alcuno stato neurologico e neurodegenerativo. Il tessuto del midollo spinale lombare affetto da SBMA è stato ricevuto dal Dr. Lyle Ostrow (ALS Postmortem Tissue Core presso la Johns Hopkins University).

5 **Tabella 2. Informazioni cliniche dei pazienti affetti da SBMA.**

	Età al momento della biopsia (anni)	Inizio della patologia (anni)	Muscolo	Lunghezza di ripetizione CAG
Controllo	37	/	quadricep femorale	/
Controllo	42	/	vasto laterale	/
Controllo	68	/	vasto laterale	/
Controllo	45	/	vasto laterale	/
Controllo	68	/	vasto laterale	/
SBMA	54	60	quadricep femoris	44
SBMA	51	48	vasto laterale	44
SBMA	57	45	vasto laterale	46
SBMA	64	57	vasto laterale	42
SBMA	54	45	vasto laterale	49

Vettori

I transgeni per l'espressione di shRNA contro PRMT6 (shPRMT6 #1, SEQ ID NO: 232 e shPRMT6 #2, SEQ ID NO: 233) e il corrispondente scramble sono stati clonati in 10 costrutti lentivirali (pLKO.1-puro).

Gli RNA guida sono stati clonati in lentiCRISPR v1 (Addgene Plasmid 49535).

Le cellule HEK293T sono state trasfettate mediante fosfato di calcio con vettori lentivirali, unitamente a plasmidi pCMV-dR8.91 (Delta 8.9) contenenti geni gag, pol e rev e un plasmide envelope VSV-G. Dopo 16 ore dalla trasfezione, il mezzo è stato 15 sostituito con mezzo fresco e dopo 24 ore esso è stato raccolto, centrifugato a 1000 x g

per 10 minuti (per depositare e rimuovere, quindi, qualsiasi residuo cellulare), filtrato attraverso pori di 0,45- μ m e conservato a -80°C in aliquote. Allo scopo di quantificare i virus, 10 μ L di particelle virali sono stati lisati per 10 minuti a temperatura ambiente mediante l'aggiunta di un pari volume di tampone di lisi 2X [0,25% di Triton X-100, 50 mM di KCl, 100 mM di Tris-HCl pH 7,4, 40% di glicerolo e 0,8 U/ μ L di RNasi inibitore (RiboLock, Fermentas)]. I lisati sono stati aggiunti a un saggio RT-PCR a fase singola con 3,5 nM di MS2 RNA (Roche) quale modello, 500 nM di ogni primer e hot-start Taq (Truestart Hotstart Taq, Fermentas), il tutto in 20 mM di Tris-Cl pH 8,3, 5 mM di (NH₄)₂SO₄, 20 mM di KCl, 5 mM di MgCl₂, 0,1 mg/ml di BSA, 1/20.000 SYBR Green I (Invitrogen, #S7563) e 200 μ M di dNTPs. Il saggio di trascrizione inversa SG-PERT è stato eseguito conformemente al programma seguente: 42°C per 20 minuti per la reazione di trascrizione inversa, 95°C per 2 minuti per l'attivazione enzimatica, seguita da 40 cicli di denaturazione a 95°C per 5 secondi, accoppiamento a 60°C per 5 secondi, estensione a 72°C per 15 secondi e acquisizione a 80°C per 5 secondi. Si è ottenuta una curva standard utilizzando concentrazioni note di surnatanti a titolo elevato (gentilmente fornita dal Dr. Massimo Pizzato, Università di Trento, Italia). I lentivirus sono stati testati in vitro trasducendo le linee cellulari dei motoneuroni, e il knock-down maggiormente efficiente è stato osservato con shPRMT6 #1 (SEQ ID NO: 232). La mutagenesi di LSD1-LXXAA mutante è stata eseguita mediante Vector Builder (<https://en.vectorbuilder.com/>).

20 **Colture cellulari, trasfezione e trasduzione**

Le cellule MN1⁹ e HEK293T (ATCC) sono state poste in coltura e piastrate in un mezzo DMEM completo [Mezzo di Eagle Modificato da Dulbecco, integrato con 10% di siero fetale bovino (FBS), 1% di penicillina/streptomicina (pen/strep) e 1% di L-glutammina], e le cellule LNCaP in un mezzo RPMI completo (Gibco Roswell Park Memorial Institute, integrato con 10% di FBS, 1% di penicillina/streptomicina e 1% di L-glutammina). Le cellule C2C12 sono state poste in coltura e differenziate in miotubi. Le cellule sono state conservative in un incubatore umidificato con 5% di CO₂ a 37°C. Le cellule HEK293T sono state trasfettate con polietilenimmina (PEI) lineare MW 25.000 Da (Sigma-Aldrich) conformemente alle dimensioni del pozzetto. Il rapporto DNA: PEI (0,5% v/v) era pari a 1:1. Dopo 24 ore dalla trasfezione, il mezzo DMEM completo integrato con 10% di FBS è stato sostituito con DMEM integrato con FBS filtrato con filtro a carbone attivo (charcoal-stripped) e le cellule sono state trattate con un veicolo (etanolo) o 10 nM di

DHT e raccolte per la diversa analisi 24 h dopo il trattamento. Relativamente all'inibizione farmacologica, le cellule sono state trattate con l'inibitore catalitico di LSD1 trafilcipromina (TCP) e l'inibitore di PRMT adenosina dialdeide (AdOx), entrambi a una concentrazione finale di 10 μ M, invece per l'inibitore di LSD1 selettivo SP-2509, si è utilizzata una concentrazione finale di 100 nm. Le cellule MN-1 sono state trasfettate con Lipofectamine 2000 secondo le istruzioni del fabbricante (Thermo Fisher). Le cellule MN1 e LNCaP sono state trasdotte in modo transitorio con lentivirus (MOI 30) o trasfettate con 2 μ g di DNA, utilizzando il Reagente di Trasfezione Lipofectamine 2000 CD (ThermoFisher Scientific, 12566014). Il giorno successivo, le cellule trasfettate positivamente sono state selezionate con 10 μ g/ μ L di Blasticidin (PanReacApplichem, A3784,0025). Dopo 24 ore dalla selezione o dopo 48 dalla trasduzione, le cellule sono state indotte con 10 nM di diidrotestosterone (DHT) in mezzo DMEM o RPMI integrato con 10% di FBS charcoal-stripped, 1% di pen/strep, e 1% di L-glutammina.

Gli iPSC SBMA sono stati derivati e differenziati. Gli iPSC sono stati mantenuti su piastre di coltura tissutale rivestite con Matrigel (Corning, 354277) in mezzo E8 Flex (Thermo Fisher, A2858501). Il mezzo è stato sostituito ogni due giorni e gli iPSC sono stati splittati ogni 4-6 giorni utilizzando accutasi (StemCell Technology 07922). Il mezzo di coltura è stato integrato con 10 μ M di inibitore ROCK (Tocris, 1254) nel giorno del passaggio. Relativamente alla differenziazione, gli iPSC trasfettati in modo stabile sono stati indotti con Mezzo di Induzione Neurale (NIM) contenente 2 μ g/mL di doxiciclina e 10 nM di R1881. Dopo 48 ore dal trattamento con doxiciclina, i motoneuroni sono stati dissociati con accutasi in singole cellule e ripiastrati su superfici rivestite di PDL/Laminin nel Mezzo di Differenziazione Neurale (NDM) contenente 2 μ g/mL di doxiciclina e 10 nM di R1881. Il giorno 4, si è rimossa la metà del mezzo di coltura cellulare ed essa è stata sostituita con Mezzo Neuronale (NM) contenente 10 nM di R1881.

Immunocitochimica

Si è eseguita un'analisi per immunofluorescenza nelle cellule MN1. Relativamente alle MN IPSC-derivate, 6 dpi iMN sono stati lavati con DPBS, fissati con 4% di paraformaldeide per 10 min a temperatura ambiente e lavati nuovamente con DPBS prima della marcatura con anticorpi. Le cellule sono state anzitutto permeabilizzate con 0,1% di Triton X-100 e 0,01% di Tween-20 per 10 min a temperatura ambiente e poi bloccate con 10% di BSA in 0,1% di Triton X-100 e 0,1% di Tween (PBST) per 1 ora a temperatura

ambiente. I campioni sono stati successivamente incubati per tutta la notte a 4 °C con anticorpi primari in 3% di BSA in PBST: anti-PRMT6 (Santa Cruz), anti-LSD1 (abcam), anti-HB9 (DSHB) e anti-AR (GeneTex). In seguito all’incubazione per tutta la notte, i campioni sono stati lavati due volte con DPBS e incubati con anticorpi secondari fluorescenti (ThermoFisher) in 3% di BSA in PBST per 1 ora a temperatura ambiente. I vetrini sono stati montati utilizzando ProLong Diamond Antifade Mountant con DAPI (ThermoFisher). Relativamente all’analisi per immunofluorescenza del tessuto midollo spinale post-mortem, le sezioni congelate sono state fissate con 4% di PFA e incubate per tutta la notte a 4°C con anticorpi, così come descritto in precedenza per anti-LSD1 (Abcam), anti-AR[H280] (SantaCruz), e DAPI. Le immagini digitali sono state catturate mediante microscopio confocale Zeiss LSM 880 con obiettivo 40x.

Vitalità cellulare e saggio di ligazione di prossimità (PLA)

Le cellule MN1 AR24Q e AR100Q sono state piastrate in una piastra a 24 pozzi con una confluenza di 50000 cellule/pozzetto in DMEM completo, e dopo 24 ore dalla trasfezione DHT è stato aggiunto al mezzo; il giorno successivo, è stato eseguito un saggio MTT. In breve, MTT è stato aggiunto direttamente al mezzo in un rapporto 1:10 (50 µl/pozzetto) e lasciato nell’incubatore con 5% di CO₂ a 37°C per 30 - 45 minuti, fino alla comparsa di precipitati di colore viola visibili nella piastra. Il mezzo è stato poi sostituito con 200 µL di dimetilsolfossido (DMSO) per sciogliere il prodotto formazano in una soluzione di colore viola, e la piastra è stata mantenuta in agitazione per 10 minuti fino al completo scioglimento di tutto il precipitato. Infine, la soluzione è stata trasferita in una piastra a 96 pozzi e l’assorbanza a 570 nM e 690 nM è stata quantificata con uno spettrofotometro Tecan Infinite® 200 PRO. L’assorbanza finale è stata ottenuta sottraendo il segnale a 690 nM da quello a 570 nM.

Relativamente al PLA, le cellule sono state fissate con 4% di PFA per 20 minuti, lavate tre volte con 1X di PBS, permeabilizzate con 0,1% di Triton X-100 in PBS per 5 minuti, e sottoposte all’analisi PLA [Duolink In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit, Sigma (Merck), DUO92101]. Gli anticorpi primari seguenti sono stati incubati per tutta la notte a 4°C: anti-KDM1/LSD1 (Abcam, ab17721, 1:2000), anti-AR (AR 441, Santa Cruz Biotechnology, sc-7305, 1:2000), anti-PRMT6 (Bethyl, A300-929A, 1:2000) e anti-PRMT6 (Abcam, ab151191, 1:2000). I vetrini sono stati fotografati con un obiettivo a immersione in olio 63x, utilizzando il microscopio invertito Zeiss Axio Observer Z1; i

punti rossi PLA-positivi sono stati quantificati utilizzando il software ImageJ 1.51.

Colorazione EdU

Le cellule LNCaP sono state piastrate su vetrini coprioggetti pretrattati con poli-d-lisina

in una piastra a 12 pozetti con una confluenza di 160000 cellule/pozzetto in RPMI

5 completo, e dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule trasfettate positivamente sono state selezionate con 10 µg/µL di blasticidina (PanReacApplichem, A3784,0025). DHT è stato aggiunto al mezzo e, il giorno successivo, è stato eseguito il saggio EdU (Click-iT® Plus

EdU Alexa Fluor 594 Imaging Kits, Invitrogen, C10639), anzitutto incubando le cellule con 10 µM di EdU per 30 minuti. In seguito, il mezzo è stato sostituito con RPMI

10 completo fresco e, dopo 10 minuti, le cellule sono state lavate con PBS priscaldato a 37°C. Successivamente, le cellule sono state fissate con 4% di PFA freddo per 10 minuti,

lavate due volte per 5 minuti con 3% di BSA in PBS, permeabilizzate con 0,5% di Triton X-100 in PBS per 20 minuti. Infine, le cellule sono state lavate due volte e il cocktail di reazione Click-iT® Plus è stato aggiunto a ogni vetrino coprioggetti per 30 minuti a

15 temperatura ambiente, protetto dalla luce. Le cellule sono state poi lavate una volta con 3% di BSA in PBS e con PBS per 5 minuti ed è stato aggiunto Hoechst® 33342 (Component G, 5 µg/mL) per 30 minuti a temperatura ambiente, protetto dalla luce. Le

cellule sono state lavate due volte con PBS e i vetrini coprioggetti sono stati montati sulle slide. Ivetrini sono state fotografati con un obiettivo 20x utilizzando il microscopio

20 invertito Zeiss Axio Observer Z1, e le cellule rosse EdU-positive sono state quantificate usando il software ImageJ 1.51.

PCR in tempo reale quantitativa

L'RNA totale è stato estratto con TRIzol (Thermo Fisher Scientific), e l'RNA è stato

retrotrascritto utilizzando Superscript Reverse Trascrittoase III (Invitrogen, 18080093)

25 secondo le istruzioni del fabbricante. L'espressione genica è stata misurata mediante RT-qPCR, usando il supermix verde SsoAdvanced Universal Sybr (1725274 Bio-Rad) e

C1000 Touch Thermal Cycler - CFX96 Real-Time System (Bio-Rad). L'espressione genica è stata normalizzata sui livelli di espressione dell'actina. L'elenco completo delle sequenze di primer è riportato nella **Tabella 3**.

30

Tabella 3. Elenco primer RT-PCR

<i>Geni murini</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>Prmt6</i>	AGTCCATGCTGAGCTCCGT (SEQ ID NO: 189)	TCCATGCAGCTCATATCCA (SEQ ID NO: 190)
<i>Lsd1</i>	TGGAACTGGCCAAGATCAAG (SEQ ID NO: 191)	GCTTCTAGCAACC GGTTAAATTC (SEQ ID NO: 192)
<i>Actina</i>	GACAGGATGCAGAAGGAGATTACTG (SEQ ID NO: 193)	CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT (SEQ ID NO: 194)
<i>AR</i>	GCCCGAATGCAAAGGTCTT (SEQ ID NO: 195)	TGGCGTAACCTCCCTTGAAA (SEQ ID NO: 196)
<i>Musk</i>	ATCACACGCCCTTTGAAAC (SEQ ID NO: 197)	TGTCTTCCACGCTCAGAAC (SEQ ID NO: 198)
<i>Myog</i>	CTTGCTCAGCTCCCTCAAC (SEQ ID NO: 199)	TGGGAGTTGCATTCACTGG (SEQ ID NO: 200)
<i>Ncam</i>	ACAATGCTGCGAACTAAGGA (SEQ ID NO: 201)	TGCCACTTGACACAGGA (SEQ ID NO: 202)
<i>Cdkn1a</i>	AGGACCACGTGGCCTTGTC (SEQ ID NO: 203)	TTTCGGCCCTGAGATGTTC (SEQ ID NO: 204)
<i>Fkbp4</i>	GACCGAGTCTTGTCCACTACAC (SEQ ID NO: 205)	ATCCCAGCCTTGATGACCTCC (SEQ ID NO: 206)
<i>Fkbp5</i>	AAAGGACAATGACTACTGATGAGG (SEQ ID NO: 207)	CTGACAACATCCCTTGAGATGGAC (SEQ ID NO: 208)
<i>Tp53</i>	GGGACGGGACAGCTTGAG (SEQ ID NO: 209)	AGGACTTCCTTTTGCGGAAA (SEQ ID NO: 210)
<i>Ezh2</i>	CATACGCTCTCTGCGACGATG (SEQ ID NO: 211)	ACACTGTGGTCCACAAGGCTTG (SEQ ID NO: 212)
<i>Geni umani</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>PRMT6</i>	GAGTGCTACTCGGACGTTTC (SEQ ID NO: 213)	AGGATAACCCAGGCGGTAG (SEQ ID NO: 214)
<i>LSD1</i>	AGTGAGCCTGAAGAACCATC (SEQ ID NO: 215)	TCTGTTGTGGTCCACTGATAAT (SEQ ID NO: 216)
<i>AR</i>	TGGGAGAGAGACAGCTTGTA (SEQ ID NO: 217)	AGTACTGAATGACAGCCATCTG (SEQ ID NO: 218)
<i>ATPA2</i>	TACCGAATTGAAGGGTCTTCT	CGACATTGACTTCTGTCACG

	(SEQ ID NO: 219)	(SEQ ID NO: 220)
CDKN1A	AAGACCATGTGGACCTGTCA (SEQ ID NO: 221)	GGCTTCCTCTGGAGAAAGAT (SEQ ID NO: 222)
ACTINA	GGACTTCGAGCAAGAGATGG (SEQ ID NO: 223)	AGCACTGTGTTGGCGTACAG (SEQ ID NO: 224)

RNA-Seq

I campioni sono stati sottoposti a estrazione dell'RNA con Trizol, secondo il protocollo del fabbricante. L'RNA è stato quantificato usando Nanodrop e Qubit e la qualità è stata valutata mediante Agilent 2100 Bioanalyzer. L'RNA purificato è stato utilizzato quale input per la preparazione della libreria cDNA con TruSeq Stranded mRNA (Illumina), secondo il protocollo del fabbricante. La dimensione del frammento di libreria cDNA è stata determinata mediante BioAnalyzer 2100 HS DNA Assay (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Le librerie sono state sequenziate quali paired-end reads (lettura a estremità accoppiate) su NovaSeq6000.

Analisi computazionale

Relativamente alla RNA-seq, i dati sono stati analizzati mediante Rosalind (<https://rosalind.onramp.bio/>), con un'architettura HyperScale sviluppata da Rosalind Inc. (San Diego, CA). Le letture sono state rifinite utilizzando cutadapt (DOI:10.14806/ej.17.1.200). I punteggi di qualità sono stati valutati utilizzando FastQC. Le letture sono state allineate sull'genoma di *Mus musculus* (mm10) utilizzando STAR (PMID:23104886). Le letture dei singoli campioni sono state quantificate usando HTseq e normalizzate mediante la relativa espressione logaritmica usando DEseq2¹³, utilizzato anche per le analisi di espressione differenziale. I valori P sono stati rettificati per i test a ipotesi multiple usando il metodo di Benjamini e Hochberg. I geni espressi in modo differenziale fra modelli murini di SBMA non trattati (AR100Q) e trattati (amiR-Lsd1/Prmt6) e controlli WT erano quei geni con una variazione (fold-change) assoluta >4 e p rettificato < 0,01. Si è definito un set di "geni recuperati" quali geni che mostrano una direzione significativa ma opposta nelle analisi di espressione differenziale in AR100Q vs WT e amiR-Lsd1/Prmt6 vs AR100Q. In aggiunta, si è identificato un subset di geni recuperati, denominato "recupero totale", il quale non mostra alcuna espressione differenziale significativa fra amiR-Lsd1/Prmt6 e WT. La differenza fra geni recuperati

geni totalmente recuperati era data dai geni “parzialmente recuperati”. L’analisi di arricchimento funzionale dei geni recuperati è stata eseguita usando Metascape¹⁴, mediante l’utilizzo delle liste di geni seguenti: processi biologici GO, via KEGG e set di geni del Reattoma. Tutti i geni nel genoma sono stati utilizzati quale background di arricchimento. I termini con $p < 0,01$, un conteggio minimo di 3 e un fattore di arricchimento $>1,5$ sono stati raccolti e raggruppati in cluster sulla base delle somiglianze di partecipazione. Il termine maggiormente significativo a livello statistico all’interno di ogni cluster è stato scelto per rappresentare il cluster stesso. Nel confronto delle liste di geni A e B mediante l’utilizzo della misura del coefficiente di sovrapposizione, la cardinalità dell’intersezione fra A e B è stata divisa per la cardinalità minima fra le cardinalità dei set A e B.

Biochimica

Le cellule sono state lisate, relativamente all’analisi Western Blot, in un tampone RIPA (6 mM di Na₂HPO₄, 150 mM di NaCl, 4 mM di NaH₂PO₄, 150 mM di NaCl, 2 mM di EDTA pH 8,0, 1% di Na-desossicolato, 0,5% di Triton X-100), con inibitori freschi della proteasi (Sigma, P8340). I campioni sono stati incubati 20 minuti su ghiaccio e poi centrifugati per 15 minuti a 21.000 x g a 4°C. Il supernatante è stato raccolto e conservato a -80°C o ulteriormente elaborato per il western blotting.

I tessuti surgelati sono stati polverizzati usando un mortaio e pestello su ghiaccio secco, trasferiti in una Eppendorf fredda, risospesi in 2% di tampone SDS-RIPA (50 mM di Tris-HCl pH 8,0, 150 mM di NaCl, 1% di NP40, 0,5% di Na-desossicolato, 2% di SDS) con inibitori freschi della proteasi (Sigma, P8340). I lisati sono stati poi sonicati e centrifugati a 15.000 giri/min per 15 min a temperatura ambiente (RT).

La concentrazione proteica è stata misurata usando il metodo di test dell’acido bicinconinico (BCA) (PierceTM BCA[®] Protein Assay, Thermo Scientific). Relativamente al Western blotting, pari quantità di estratti proteici da tessuti o lisati cellulari sono stati bolliti a 95°C per 5 minuti in sample buffer 5X (62,5 mM di Tris-HCl, pH 6,8, 2% di SDS, 25% di glicerolo, 0,05% di blu di bromofenolo, 5% di β- mercaptoetanolo) e separati mediante SDS-PAGE. Le proteine sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa di 0,45 mm (Bio-Rad, 162-0115), bloccate per 1 ora in 5% di latte non grasso/albumina di siero bovino (BSA) in tampone TBS/0,1% Tween, e incubate con anticorpi primari per 2 ore a temperatura ambiente o per tutta la notte a 4°C. Gli anticorpi

secondari HRP-coniugati sono stati incubati per 1 ora a temperatura ambiente (diluizione 1:5.000 in soluzione di bloccaggio), e i segnali sono stati rilevati con Chemidoc (Bio-Rad) o Alliance Mini (Uvitex).

Relativamente ai saggi di immunoprecipitazione, le cellule sono state lavate due volte con

5 PBS ghiacciata, grattate, raccolte e centrifugate a 1.200 x g per 3 minuti a 4°C. I pellet sono stati lisati in tampone IP (50 mM di HEPES, 250 mM di NaCl, 5 mM di EDTA, 0,1% di NP40) contenente 1 mM di PMSF e inibitori freschi della proteasi (Sigma, P8340). I pellet cellulari sono stati omogeneizzati usando siringhe di 2,5 mL-22Gx1 ¼" e 1 mL-25Gx5/8", incubati su ghiaccio per 45 minuti, e centrifugati a 21.000 x g per 30
10 minuti a 4°C. Il supernatante è stato trasferito e quantificato mediante Pierce™ BCA® Protein Assay (Thermo Scientific). L'estratto proteico (1,5–4 mg) è stato incubato con anticorpi primari tutta la notte a 4°C su un rotore. In seguito, il complesso è stato incubato con beads di Protein A/G Plus-Agarose (sc-2003) per 2 ore a 4°C su un rotore. I complessi
15 antigeno–anticorpo sono stati lavati tre volte con tampone di lisi e una volta con tampone di lavaggio. La proteina legata è stata eluita con 35 µL di tampone 2X SDS e denaturata a 95° C per 5 minuti prima del caricamento su SDS-PAGE.

Relativamente ai saggi di immunoprecipitazione nel tessuto, i quadricipi sono stati lisati

in tampone IP (50 mM di HEPES, 250 mM di NaCl, 5 mM di EDTA, 0,1% di NP40) con inibitori freschi della proteasi (Sigma, P8340), incubati su ghiaccio per 30 minuti e centrifugati a 21.000 x g per 45 minuti a 4°C. Il supernatante è stato trasferito e quantificato mediante Pierce™ BCA® Protein Assay (Thermo Scientific). L'estratto proteico (2 mg) è stato pre-lavato con Pierce™ Protein A Magnetic Beads prelavate (30 uL, Thermo Fisher Scientific, cat #88845) per un'ora a 4 gradi. In seguito, le beads sono state eliminate e il lisato pre-lavato è stato incubato con 2 ug di anticorpo primario
20 (PRMT6, Bethyl, A300-929A) o immunoglobulina G di coniglio non immune (IgG) per tutta la notte a 4°C su un rotore. Il giorno successivo, i complessi antigeno-anticorpo sono stati incubati con Pierce™ Protein A Magnetic Beads nuove prelavate (20 uL, Thermo Fisher Scientific, cat #88845) per due ore a 4°C su un rotore. I complessi antigeno-anticorpo sono stati lavati quattro volte con tampone di lisi. La proteina legata è stata
25 eluita con 30 µL di NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) e 0,1 M di DTT e riscaldata a 70° C per 5 minuti prima del caricamento su un gel SDS-PAGE al 10%.

Per le diverse analisi sono stati usati gli anticorpi seguenti: anti-KDM1/LSD1 (Abcam,

ab17721, 1:1000), anti-PRMT6 (Proteintech, 15395-1-AP, 1:1000), anti-PRMT6 (Bethyl, A300-929A, 1:2000), anti-AR (per immunoprecipitazione: 441, Santa Cruz, sc-7305), anti-AR (per immunoblot: H-280, Santa Cruz, sc-13062, 1:1000), anti-FLAG (Sigma, 7425), anti-GFP (Roche, 11814460001, 1:1000), anti-calnexina (Enzo, ADI-SPA-860, 1:2500), anti-tubulina (Sigma, T7816, 1:10000). Le quantificazioni sono state eseguite utilizzando il software ImageJ 1.51.

La colorazione con nicotinammide adenina dinucleotide (NADH) e l'analisi sono state eseguite come descritto in precedenza.

Sono stati eseguiti i saggi ChIP, utilizzando 6×10^7 mioblasti C2C12 esperimenti AR24Q

10 o AR100Q. L'AR è stato immunoprecipitato con anticorpo anti-AR (Millipore #06-680, 14 µg, l'elenco dei primer è riportato nella **Tabella 4**).

Tabella 4. Elenco primer ChIP.

<i>Primer</i>	<i>Primer (5' - 3')</i>
Neg_Foreward	TCCCTGTGCCAAAGAGTAG (SEQ ID NO: 225)
Neg_Reverse	CCCTGAAGAATGAGGACGAG (SEQ ID NO: 226)
<i>Lsd1_promoter_ARE_Foreward</i>	CAGTCTGGCCTACAAAGTGAG (SEQ ID NO: 227)
<i>Lsd1_promoter_ARE_Reverse</i>	GATTGGTTTTCCGAGACAGG (SEQ ID NO: 228)
<i>Prmt6_promoter_ARE_Foreward</i>	ACTTGTCAATGGCGTTAGAGG (SEQ ID NO: 229)
<i>Prmt6_promoter_ARE_Reverse</i>	GATTCGTAGTCCGCTTCCTG (SEQ ID NO: 230)

15 Relativamente alla purificazione istonica, le cellule sono state seminate a una densità di 7000 cellule/cm² e poste in coltura in 10% di FBS, e le cellule sono state trasferite nel mezzo di differenziazione [DMEM, 2% siero di cavallo, penicillina/streptomicina (100U/ml) e L-glutammina (2mM)] quando hanno raggiunto una confluenza del 70-80% a 37°C in un'atmosfera umidificata contenente 5% di CO₂. Le cellule sono state reintegrate ogni tre giorni. Gli istoni sono stati estratti dai miociti mediante il

procedimento dell'estrazione acida. In breve, le cellule sono state lavate due volte con tampone fosfato salino (PBS) ghiacciato, lisate in 1 ml (5×10^6 cellule/ml) di tampone di lisi ipotonico (10 mM di Tris-HCl pH 8,0, 1 mM di KCl, 1,5 mM di MgCl₂, 1mM di DTT, 0,5 mM di PMSF, 1x inibitore di proteasi e fosfatasi) e incubate per 30 minuti su un rotore a 4° C. I nuclei sono stati risospesi in 400 µl di 0,4 N H₂SO₄ e incubati su ghiaccio per 30 minuti. Il supernatante contenente istoni è stato precipitato con 132 µl di TCA su ghiaccio per tutta la notte. Successivamente alla centrifugazione, il pellet è stato lavato due volte con 1 ml di acetone ghiacciato ed essiccato ad aria. Gli istoni sono stati sospesi in acqua e conservati a -80° C. Gli istoni sono stati quantificati mediante il saggio colorimetrico della proteina DC (Biorad, Cat. # 5000111), secondo le istruzioni del fabbricante, 5-10 µg di proteina sono stati usati per ulteriori analisi.

Anticorpi usati: Anti-H3K3me2 (Ab7766) e anti-H3 (Ab1791).

Sono stati eseguiti saggi della luciferasi. In breve, le cellule HEK293T sono state trasfettate con vettori che esprimono AR non-espanso e poliglutammina-espanso, unitamente a vettori che esprimono il gene reporter della luciferasi sotto il controllo di un canonico elemento rispondente agli androgeni (ARE-Luc). Allo scopo di normalizzare i dati per l'efficienza della trasfezione, le cellule esprimono il gene reporter Renilla sotto il controllo della timidina chinasi (TK-Ren) trasfettata con ARE-Luc in un rapporto di 1:10. Le cellule sono trattate con veicolo e DHT per 16 h e poi processate per il saggio della luciferasi, secondo le istruzioni del fabbricante (Promega).

Generazione di miRNA artificiali (amiR) che targetizzano LSD1 e PRMT6

Gli amiR che targetizzano PRMT6 o LSD1 nelle cellule murine e umane sono stati disegnati mediante lo strumento online BLOCK-iT RNAi Designer: gli oligonucleotidi top e bottom sono sintetizzati, accoppiati e clonati nel plasmide pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR (SEQ ID NO: 231) utilizzando il kit BLOCK-iT Pol II miR RNAi (Invitrogen), allo scopo di generare fonti di amiR per esprimere gli amiR di interesse in una cellula che riceve il plasmide; il plasmide comprende una cassetta di resistenza alla spectinomicina. Gli oligonucleotidi top e bottom sono stati generati conformemente alle istruzioni di Invitrogen. In breve, le sequenze oligo top sono generate combinando gli elementi seguenti (dall'estremità 5' a 3'):

1. 5' TGCTG
2. Complementare inverso della sequenza target senso di interesse di 21 nucleotidi.

Questa è la sequenza che codifica il miRNA maturo.

3. Sequenza ad anello terminale.
4. Nucleotidi 1-8 (5'-3') della sequenza target senso.
5. Nucleotidi 11-21 (5'-3') della sequenza target senso

5 Allo scopo di generare la sequenza oligo bottom, sono eseguite le fasi seguenti:

1. Rimuovere 5' TGCT dalla sequenza oligo top (la nuova sequenza inizia con G).
2. Prendere il complementare inverso della sequenza dalla fase 1.
3. Aggiungere CCTG all'estremità 5' della sequenza dalla fase 2.

La Tabella 5 che segue riporta le sequenze 5'-3' degli oligonucleotidi top e bottom usati

10 per generare i precursori di amiR degli esempi, in cui, negli oligonucleotidi top, il complementare inverso della sequenza target senso di interesse di 21 nucleotidi è sottolineato e la sequenza codificante l'anello terminale è in grassetto.

La cassetta di espressione degli amiR comprende quindi (da 5' a 3') le seguenti regioni contigue: una regione 5' che fiancheggia il miR, lo stelo target-specifico, l'anello 15 terminale, la regione complementare allo stelo e la regione 3' che fiancheggia il miR.

Tale cassetta amiR può essere clonata all'interno dell'area non tradotta 3' di ogni estremità di gene reporter espressa dallo stesso sotto il controllo di un promotore RNA polimerasi di tipo II.

Quale controllo negativo, si è utilizzata la sequenza di amiR di controllo dal plasmide

20 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-neg-control (fornito con il kit), contenente una sequenza che non targetizza alcun gene di vertebrato noto (amiR di controllo: **SEQ ID NO: 169**: AAATGTACTGCGCGTGGAGAC). Le cellule E. coli Top-10 competenti sono state trasformate, e i cloni positivi sono stati selezionati usando il primer forward EGFP 5' GTCCTGCTGGAGTTCTG-3' (**SEQ ID NO: 170**).

25 Le sequenze di amiR contro PRMT6 e LSD1 sono state sottoclonate a valle di EGFP sotto il controllo del promotore CAG in un vettore di virus adeno-associato (AAV) derivato da pAAV-CAG-EGFP (Addgene #37825), così come descritto in precedenza¹⁵.

Tabella 5. Oligonucleotidi (oligo) per la generazione degli amiR

Target: <i>Prmt6</i> murino

amiR-Prmt6	SEQ ID NO:	Sequenze oligo (T=top; B=bottom)
#1	139	T: TGCTGAGCACTCGTAGTACAGCTGGT GTTTGGCCACTGACTGACACCAGCTGCTACGAGTGCT
	140	B: CCTGAGCACTCGTAGCAGCTGGTGTAGTCAGTGGCCAAAACACCAGCTGTACTACGAGTGCTC
#2	141	T: TGCTGCGGAGTAGCAGCTCGTAGTACAG GTTTGGCCACTGACTGACTGTACTACGTGCTACTCCG
	142	B: CCTGCGGAGTAGCACGTAGTACAGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTACTACGAGTGCTACTCCGC
#3	143	T: TGCTGTTCAAGGATGCCCTAACGCGGTAG GTTTGGCCACTGACTGACCTACCGCTGGCATCCTGAA
	144	B: CCTGTTCAAGGATGCCAGCGGTAGGTAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTACCGCTTAGGCATCCTGAAC
#4	145	T: TGCTGTCTTCAGGATGCCCTAACGCGGTAG GTTTGGCCACTGACTGACACCGCTTACATCCTGAAGA
	146	B: CCTGTCTTCAGGATGTAAGCGGTGTCAGTCAGTCAGTGGCCAAAACACCGCTTAGGCATCCTGAAGAC
#5	147	T: TGCTGTAGCGCAGAAGTATGCGCAGA GTTTGGCCACTGACTGACTCTGCGCACTCTGCGCTA
	148	B: CCTGTAGCGCAGAAGTGCAGAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTCTGCGCATACTCTGCGCTAC
#6	149	T: TGCTGAATCAGACCATGTTGCCCTTC GTTTGGCCACTGACTGACGAAAGGCAATGGTCTGATT
	150	B: CCTGAATCAGACCATGCCCTTCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGAAAGGCAACATGGTCTGATT
#7	151	T: TGCTGTATTAGATTAGAGTGCTCGCG GTTTGGCCACTGACTGACCGCGAGCACTAACTAATA
	152	B: CCTGTATTAGATTAGTGCTCGCGTCAGTCAGTGGCCAAAACCGCGAGCACTCTAATCTAATAAC

Target: *Lsd1* murino

amiR-Lsd1	SEQ ID NO:	Sequenze di oligonucleotidi (T=top; B=bottom)
-----------	------------	--

#1	153	T: TGCTGTTCTCTGTATTCTACCTGG <u>GTTTGGCCACTGACTGACCCAAGGTAATACAGAGAAA</u>
	154	B: CCTGTTCTCTGTATTACCTGGTCAGTCAGTGGCCAAACCAAGGTAGAATACAGAGAAC
#2	155	T: TGCTGTTACTTGTTGCTGACGAC <u>GTTTGGCCACTGACTGACTGTCGTCAAAACAAGTAAA</u>
	156	B: CCTGTTACTTGTTGACGACAGTCAGTCAGTGGCCAAACACTGTCGTCAAGCAAACAGTAAAC
#3	234	T: TGCTGTTGATGAGAGGTATACAT <u>CACGTTGGCCACTGACTGACGTGATGTACCTCTCATCAA</u>
	235	B: CCTGTTGATGAGAGGTACATCACGTCAAGTCAGTGGCCAAACGTGATGTACCTCTCATCAAC

Target: PRMT6 umano		
amiR- Prmt6 (SEQ ID miR maturo)	SEQ ID NO:	Sequenze di oligonucleotidi (T=top; B=bottom)
#1 (Seq ID No: 171)	157	T: TGCTGAGCACGCTGTATCCGTTG <u>GTTTGGCCACTGACTGACCAACAAACGTACAGCGTGCT</u>
	158	B: CCTGAGCACGCTGTACGTTGGTCAGTCAGTGGCCAAACCAACAAACGGATAACAGCGTGCTC
#2 (Seq ID No: 172)	159	T: TGCTGATAATAAGCACGCTGTAT <u>CCGGTGGCCACTGACTGACCGGATAACAGTGCTTATTAT</u>
	160	B: CCTGATAATAAGCACTGTATCCGGTCAGTCAGTGGCCAAACCGGATAACAGCGTGCTTATTATC
#3 (Seq ID No: 173)	161	T: TGCTGTAAGGTGTGAGGTGTCAGGG <u>GTTTGGCCACTGACTGACTCCCTGACCTCACACCTTA</u>
	162	B: CCTGTAAGGTGTGAGGTCAAGGGAGTCAGTCAGTGGCCAAACACTCCCTGACACCTCACACCTTAC

Target: LSD1 umano

amiR- Lsd1 (SEQ ID miR maturo)	SEQ ID NO:	Sequenze di oligonucleotidi (T=top; B=bottom)
#1 (Seq ID No: 174)	163	T: TGCTGATAACTGTGAACCTCGGTGGAC <u>TTTTGGCCACTGACTGACGT</u> CCACCGTTCACAGTTATC
	164	B: CCTGATAACTGTGAACGGTGGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTCCACCGAGTTCACAGTTATC
#2 (Seq ID No: 175)	165	T: TGCTGT <u>GACGCTCTAAATAACTGTGA</u> TTTTGGCCACTGACTGACTCACAGTTTAGAGCGTCA
	166	B: CCTGTGACGCTCTAAACTGTGAGTCAGTCAGTGGCCAAAACTCACAGTTATTAGAGCGTCA
#3 (Seq ID No: 176)	167	T: TGCTGTTAGGAACCTTGACAGTGTCA <u>TTTTGGCCACTGACTGACTGACACTGAAGGTTCTAA</u>
	168	B: CCTGTTAGGAACCTTCAGTGTCA <u>GACTCAGTCAGTGGCCAAAAC</u> TGACACTGTCAAGGTTCTAAC

Si prevede che gli oligonucleotidi usati per generare gli amiR #1, #2 e #3 che targetizzano PRMT6 umana, clonati in un vettore e veicolati in una cellula, generino in tale cellula amiR rispettivamente di sequenza SEQ ID NO: 171, 172, 173 e che gli oligonucleotidi usati per generare gli amiR #1, #2 e #3 che targetizzano LSD1 umana, clonati in un vettore e veicolati in una cellula, generino in tale cellula amiR rispettivamente di sequenza SEQ ID NO: 174, 175 e 176.

Produzione e titolazione virale

Il sierotipo AAV 9 (AAV9) è stato prodotto utilizzando una leggera variante del metodo di trasfezione transitoria priva di adenovirus. In breve, le cellule aderenti HEK293 cresciute in flaconi cilindrici sono state trasfettate con tre plasmidi contenenti la proteina helper dell'adenovirus, i geni AAV Rep e Cap e la cassetta di espressione transgenica affiancata da ITR. Tre giorni dopo la trasfezione, le cellule sono state raccolte, lisate mediante sonicazione e trattate con benzonasi (Merck-Millipore). I vettori sono stati purificati utilizzando due turni di ultracentrifugazione successivi in gradienti di densità di cloruro di cesio. Sono stati raccolti i capsidi pieni. Il prodotto finale è stato formulato in

tampone fosfato salino sterile contenente 0,001% di Pluronic F-68 (Sigma) e conservato a -80°C. I titoli dei campioni di vettori AAV sono stati i seguenti: amiR di controllo: $3,8 \times 10^{12}$ vg/mL; amiR-Prmt6: $4,18 \times 10^{13}$ vg/mL; amiR-Lsd1: $9,8 \times 10^{12}$ vg/mL; amiR-Prmt6/Lsd1: $3,3 \times 10^{13}$ vg/mL.

5 Analisi statistica

Allo scopo di confrontare le misure fra i gruppi, sono stati usati student's t-test a due-campioni e test di analisi di varianza (ANOVA) a una-via, seguiti dai test di significatività onesta di Tukey, rispettivamente, per due e più di due confronti fra gruppi. Allo scopo di valutare nel tempo il peso corporeo e le differenze di comportamento fra gruppi e trattamenti dei genotipi, si sono usati test ANOVA a due vie con genotipo, iniezione e tempo quali variabili di previsione, seguiti da test post hoc. Relativamente a tutti i test, la soglia di significatività è stata impostata a $p < 0,05$.

ESEMPIO 1

15 L'espressione di LSD1 e di PRMT6 è stata verificata nei tessuti di topi transgenici affetti da SBMA che esprimevano la mutazione AR100Q umana, di topi knock-in affetti da SBMA in cui l'esone 1 dell'AR era stato sostituito con l'esone 1 dell'AR umano codificante un AR poliQ-espanso con 113Q, e di campioni disponibili di biopsie da pazienti. I tessuti analizzati includevano muscolo scheletrico, fegato, midollo spinale, tronco encefalico e cuore. I topi maschi AR100Q erano non-sintomatici a 4 settimane di età (stadio presintomatico), hanno iniziato a mostrare segnali di atrofia muscolare e di disfunzione motoria entro le 8 settimane di età (inizio), e hanno manifestato segnali di denervazione entro le 12 settimane di età (stadio tardivo). L'analisi PCR real-time ha evidenziato che i livelli di trascritto di *Lsd1* e *Prmt6* erano aumentati significativamente del doppio nel muscolo scheletrico (quadricipite) e nel fegato dei topi maschi affetti da SBMA allo stadio presintomatico rispetto ai topi maschi wildtype (WT) (**Figura 1a**). Nel tronco encefalico, nel midollo spinale e nel cuore, i livelli di trascritto di *Lsd1* e *Prmt6* erano significativamente maggiori solamente nel tronco encefalico a 4 settimane di età e in misura inferiore rispetto al muscolo scheletrico e al fegato. Nel muscolo, la sovraregolazione è stata rilevata prima dell'inizio della disfunzione motoria e della denervazione ed è stata costante e persistente in tutte le fasi della malattia (4–12 settimane). Il western blotting ha confermato la sovraregolazione di LSD1 e PRMT6 a

livello di proteine nel muscolo quadricipite affetto da SBMA, ma non nel midollo spinale, paragonati ai controlli (**Figura 1b**).

Nel muscolo dei topi femmina AR100Q, i livelli di trascritto di *Lsd1* e *Prmt6* erano sovrapregevoli solamente nello stadio tardivo della patologia e ad un livello inferiore (di

5 1,5 volte per *Lsd1* e di 1,8 volte per *Prmt6*) rispetto ai topi maschi (**Figura 1c**). Inoltre, *Lsd1* e *Prmt6* erano significativamente sovrapregevoli, di 5–10 volte, nel muscolo estensore lungo delle dita (EDL) a contrazione rapida dei topi maschi AR100Q, e la sovraespressione si era normalizzata mediante la castrazione chirurgica, coerentemente con la natura dipendente dagli androgeni della SBMA (**Figura 1d**). In aggiunta, i livelli 10 di trascritto di *Lsd1* e *Prmt6* erano significativamente sovrapregevoli, rispettivamente di 4 volte e 3 volte, nel muscolo scheletrico dei topi maschi knock-in AR113Q rispetto ai controlli WT (**Figura 1e**). Risultati simili si sono ottenuti nei mioblasti C2C12 che sovraesprimevano AR100Q differenziati in miotubi, suggerendo che tale fenomeno si verifica nel muscolo in modo cellula-autonomo (**Figura 1f**). Notevolmente, anche i livelli 15 di trascritto di *LSD1* e *PRMT6* erano sovrapregevoli di 1,5 e 2,5 volte nel muscolo dei pazienti affetti da SBMA (**Figura 1g**), così sottolineando la rilevanza di tali osservazioni rispetto alla patologia.

ESEMPIO 2

Allo scopo di determinare se l'AR poliQ-espanso influenza direttamente la trascrizione

20 di *Lsd1* e *Prmt6*, elementi responsivi agli androgeni (ARE) putativi sono stati ricercati negli enhancer e nei promotori distali/centrali di *Lsd1* e *Prmt6*. Mediante analisi bioinformatica, un ARE putativo è stato rilevato nel promotore di entrambi i geni (**Fig. 1h**). In un saggio di immunoprecipitazione di cromatina (ChIP) nei mioblasti C2C12 che esprimevano l'AR con un tratto poliQ normale (AR24Q) o patogenico (AR100Q), si è 25 rilevata occupazione di AR non espanso in corrispondenza dell'ARE di LSD1, la quale è stata aumentata dal poliQ espanso. In corrispondenza dell'ARE di PRMT6, un legame specifico è stato rilevato solamente per l'AR poliQ-espanso. Tali risultati forniscono un meccanismo molecolare che sottende alla sovraespressione di *Lsd1* e *Prmt6* nelle miofibre SBMA.

30 Considerati insieme, tali risultati indicano che *Lsd1* e *Prmt6* sono sovraespresse in un muscolo in modo cellula-autonomo, principalmente quale conseguenza di un GOF di AR tossico dipendente dagli androgeni.

ESEMPIO 3

La relazione fra AR, PRMT6 ed LSD1 è stata ulteriormente analizzata nel contesto della patogenesi della SBMA. Allo scopo di comprendere se LSD1 forma un complesso con l'AR poliQ-espanso, AR24Q o AR65Q con tag Flag sono stati espressi con o senza LSD1 nelle cellule di rene di embrione umano 293T (HEK293T), e le cellule sono state processate per saggi di co-immunoprecipitazione. Notevolmente, che la sovraespressione di LSD1 di per sé non modificava l'espressione dell'AR in tali condizioni sperimentali (**Figura 11a**). Il pull-down di AR normale e poliQ-espanso con tag Flag co-immunoprecipitava LSD1 (**Figura 11a**). Oltre a LSD1, almeno tre ulteriori isoforme di proteina derivate dallo splicing alternativo di *Lsd1* (LSD1-2a, LSD-8a e LSD1-2a/8a) formavano un complesso con l'AR normale e poliQ-espanso, sia in assenza, sia in presenza di DHT (**Figura 11b**).

L'analisi per immunofluorescenza ha mostrato che l'AR normale e poliQ-espanso si localizzano con LSD1 endogena nelle cellule MN1 derivate dai motoneuroni trattate con veicolo o DHT, nei IPSC derivati dai pazienti differenziati in motoneuroni, e nel midollo spinale di un paziente affetto da SBMA. Notevolmente, AR, LSD1 e PRMT6 erano tutti presenti nei nuclei dei motoneuroni derivati da IPSC umani. Allo scopo di valutare le interazioni proteina–proteina nei comparti sottocellulari delle cellule intatte, si è fatto ricorso a un saggio di ligazione di prossimità (PLA), il quale si basa su anticorpi secondari oligonucleotide-coniugati che rilevano le interazioni proteina–proteina *in situ* (**Figura 2a**). Si è altresì valutata l'interazione fra AR poliQ-espanso e PRMT6, la quale aumenta in presenza del ligando diidrotestosterone (DHT). AR24Q e AR100Q formavano un complesso con LSD1 endogena in modo indipendente da DHT.

Nonostante LSD1 sia un coattivatore dell'AR normale, il fatto che essa operi o meno anche come coattivatore dell'AR poliQ-espanso non è chiaro. Allo scopo di risolvere tale questione, l'attività dell'AR è stata valutata esprimendo AR24Q e AR65Q sotto la guida dal promotore del citomegalovirus e misurando l'attività di una luciferasi reporter sotto il controllo di un elemento rispondente agli androgeni. Sono stati applicati entrambi gli approcci GOF (sovraespressione) e LOF (knock-down). Nelle cellule HEK293T, la sovraespressione di LSD1 ha aumentato la transattivazione di AR24Q e AR65Q di 1,4 volte nelle cellule trattate con DHT, e non ha avuto effetto nelle cellule trattate con veicolo, indicando che LSD1 opera quale coattivatore trascrizionale per l'AR (**Figura**

2b). Risultati simili sono stati ottenuti esprimendo AR12Q e AR55Q sotto il controllo del promotore eucariotico, fattore di allungamento 1 α (**Figura 12a**). Inoltre, LSD1-2a, LSD1-8a e LSD1-2a/8a transattivavano l'AR normale e poliQ-espanso in misura simile a LSD1 nelle cellule HEK293T (**Figura 12b**) e nelle cellule MN1 (**Figura 2c, Figura 12c**).

5

ESEMPIO 4

LSD1 endogena è stata soppressa mediante tecnologia CRISPR/Cas9. Utilizzando Cas9 con diversi gRNA singoli nelle cellule HEK293T, si è ottenuto un knock-down parziale di LSD1, mentre l'uso concomitante di due gRNA ha generato un'elevata delezione in-frame degli esoni di LSD1 che codificano le aree catalitiche essenziali, in tal modo producendo un frammento di LSD1 morto a livello enzimatico (**Figura 2d, Figura 12d**). Il knock-out parziale (50%–70%) e completo di LSD1 ha ridotto la transattivazione di AR24Q e AR65Q rispettivamente del 40%–50% e dell'80%, indicando un effetto doswedipendente di LSD1 endogena sulla transattivazione dell'AR indotta dagli androgeni (**Figura 2d**). In modo coerente, la transattivazione dell'AR poliQ-espanso si è altresì dopo knock-down di LSD1. In aggiunta, il knock-down CRISPR-Cas9 di LSD1 ha diminuito in modo significativo la transattivazione di AR24Q e AR100Q nelle cellule MN1 (**Figura 2e**). A livello collettivo, tali risultati evidenziano che LSD1 forma un complesso con e opera quale coattivatore di AR poliQ-espanso, e che il knock-down CRISPR-Cas9 di LSD1 è in grado di diminuire la transattivazione di AR poliQ-espanso.

10
15
20

ESEMPIO 5

Sia LSD1, sia PRMT6 presentano un motivo LXXLL (**Figura 3a**), il quale media l'interazione dei cofattori di trascrizione con i recettori degli steroidi tramite la superficie della funzione di attivazione 2 (AF-2) nel dominio di legame del ligando. In modo coerente, LSD1 non ha transattivato l'AR recante la mutazione E897K (in cui E è acido glutammico e K è lisina) che interrompe il reclutamento del cofattore tramite AF-2 (**Figura 3b**). Una LSD1 con un motivo LXXLL difettoso (mutato in LXXAA, in cui A è alanina) non ha altresì transattivato l'AR (**Figura 3c**). Il mutante LSD1 inattiva a livello catalitico K685A non ha transattivato l'AR normale e poliQ-espanso (**Figura 3d**). Inoltre, il trattamento delle cellule trasfettate in modo simulato (mock) con l'inibitore catalitico di LSD1 tranilcipromina (TCP) ha ridotto la transattivazione dell'AR poliQ-espanso indotta da DHT (**Figura 3e**); il trattamento delle cellule con l'inibitore di LSD1 selettivo

SP-2509, il quale inibisce l’associazione di LSD1 con CoREST ma non influenza l’attività enzimatica di LSD1, non ha modificato la transattivazione dell’AR poliQ-espanso, ulteriormente supportando la rilevanza dell’attività catalitica di LSD1 per la transattivazione dell’AR. Notevolmente, si è rilevata una ridotta metilazione della lisina 5 dell’istone 3 (H3K4me2) nei miotubi C2C12 che esprimono AR100Q, così confermando che LSD1 è sovraattivata nei miotubi SBMA (**Figura 3f**). Considerate insieme, tali osservazioni indicano che LSD1 richiede la propria attività catalitica e la superficie AF-2 dell’AR per transattivare l’AR sia normale sia poliQ-espanso, tramite un meccanismo che coinvolge la modifica istonica.

10 ESEMPIO 6

PRMT6 e LSD1 sono quivi mostrate essere entrambe coattivatori di AR e sovraespresso nel muscolo scheletrico affetto da SBMA. Si è quindi testato se esse contribuiscono o meno in modo sinergico al GOF tossico dell’AR poliQ-espanso. Anzitutto si è verificato se LSD1 e PRMT6 interagiscono o meno fra loro nelle cellule HEK293T, dopo avere verificato che né la sovraespressione né il silenziamento di PRMT6 modificano 15 l’espressione di LSD1 espressa in modo endogeno ed esogeno e viceversa (**Figura 13a**). L’immunoprecipitazione di PRMT6 ha precipitato LSD1, indicando che PRMT6 e LSD1 interagiscono nelle cellule HEK293T. Inoltre, la PLA nelle cellule MN1 che esprimono AR24Q e AR100Q ha evidenziato che PRMT6 endogena interagiva con LSD1 endogena, 20 e che tale interazione non era modificata da DHT (**Figura 4a**). Pertanto, LSD1 e PRMT6 interagiscono fra loro e con l’AR tramite la superficie AF-2. Le cellule knock-down CRISPR-Cas9 *Lsd1* MN1 sono state trasdotte con lentivirus esprimente shRNA scramble o due shRNA contro *Prmt6*: shPRMT6 #1 (SEQ ID NO:232) e shPRMT6 #2 (SEQ ID NO:233) per il silenziamento di *Prmt6* endogena.

25 Mediante Western blotting si è verificato che il knock-down di *Lsd1* o *Prmt6* non ha modificato i livelli di PRMT6 e LSD1, rispettivamente, né i livelli di AR (**Figura 4b**). Le interazioni proteina–proteina sono state successivamente valutate mediante PLA nelle cellule MN1. In modo sorprendente, l’interazione dell’AR normale e poliQ-espanso con LSD1 è diminuita in modo significativo dopo silenziamento di PRMT6, così come 30 l’interazione dell’AR con PRMT6 dopo silenziamento di LSD1, anche se tale interazione è aumentata in modo aberrante dall’espansione poliQ (**Figura 4a**). In un saggio di immunoprecipitazione, si è confermata l’interazione AR/LSD1/PRMT6 nel muscolo

quadriplice dei topi affetti da SBMA WT e knock-in che esprimevano AR113Q (**Figura 4c**).

In seguito, si è valutato se LSD1 e PRMT6 transattivavano in modo cooperativo AR. La sovraespressione di LSD1 da sola, di PRMT6 da sola, e di entrambi i coattivatori insieme ha aumentato la transattivazione di AR normale rispettivamente di 1,3, 3,1 e 4,5 volte, e quella di AR poliQ-espanso di 1,5, 3,4 e 6,6 volte (**Figura 4d**). Notevolmente, la transattivazione dell'AR poliQ-espanso mediante LSD1/PRMT6 era aumentata rispetto a AR normale. La transattivazione di AR mediante PRMT6 è regolata in modo negativo mediante la fosforilazione in corrispondenza dei siti di consenso AKT, ²¹⁰RXRXXS²¹⁵ e ⁷⁸⁷RXRXXS⁷⁹² (in cui R è arginina e S è serina). In modo interessante, la transattivazione dell'AR mediante LSD1 e PRMT6 era aumentata significativamente mediante le sostituzioni fosfo-difettose con alanina (S215A, S792A) rispetto ad AR65Q con residui S215 e S792 intatti, suggerendo che la transattivazione dell'AR mediante LSD1 e PRMT6 è modulata in modo negativo mediante la fosforilazione in corrispondenza dei siti di consenso AKT (**Figura 13b**).

ESEMPIO 7

Si è assunto un approccio LOF farmacologico e genetico per valutare l'effetto dell'inibizione di LSD1 e PRMT6 endogene (cellule trasfettate in modo simulato, *mock*) e sovraespresso sull'attività di AR mediante saggi trascrizionali. TCP e l'inibitore di PRMT adenosina dialdeide (AdOx) hanno ridotto la transattivazione dell'AR normale e poliQ-espanso indotta da DHT (**Figura 4d**), indicando che l'AR richiede la funzione sia di LSD1, sia di PRMT6 per la transattivazione completa. In modo significativo, l'effetto della sovraespressione di LSD1 sulla transattivazione dell'AR è stato ridotto non solamente mediante TCP, così come previsto, ma anche mediante AdOx. Analogamente, l'effetto della sovraespressione di PRMT6 è stato attenuato mediante AdOx, così come mediante TCP. Il trattamento combinato con TCP/AdOx ha ulteriormente attenuato la transattivazione dell'AR sia nelle cellule trasfettate in modo simulato, sia nelle cellule che sovraesprimevano LSD1, PRMT6 e LSD1/PRMT6. Tuttavia, AdOx è un inibitore pan-PRMT, e TCP può avere effetti aggiuntivi sugli enzimi diversi da LSD1.

ESEMPIO 8

LSD1 e *PRMT6* endogene sono state silenziate geneticamente mediante la tecnologia CRISPR/Cas9 (**Figura 2d, Figura 4e**).

Il knock-down di *LSD1* e *PRMT6* con due RNA guida indipendenti, da soli e insieme, ha attenuato la transattivazione dell'AR normale e poliQ-espanso indotta da DHT (**Figura 4e**). Inoltre, la transattivazione indotta da PRMT6 dell'AR normale e poliQ-espanso è stata significativamente ridotta mediante il silenziamento genetico di *LSD1* endogena
5 (**Figura 13c**).

ESEMPIO 9

Allo scopo di determinare se *LSD1* modifica il fenotipo della SBMA e coopera in modo sinergico con *PRMT6* per aumentare la tossicità *in vivo*, mosche SBMA sono state incrociate con mosche che esprimevano interferenza del RNA (RNAi) targetizzando

10 l'ortologo di *Drosophila* di *LSD1*, *dLsd1*, e *Dart8*, ottenuti dal Vienna *Drosophila* Resource Center (VDRC, ID stock per *DART8*: v100228, e *dLsd1*: v106147). Quale controllo, sono state usate mosche che esprimevano un AR privo del tratto poliQ (AR0Q). Le mosche AR0Q alimentate con DHT non hanno evidenziato alcun fenotipo (**Figura 5a**). Allo scopo di modellizzare la SBMA, sono state utilizzate mosche che esprimevano
15 un AR con 52Q (AR52Q). Le mosche AR52Q hanno sviluppato la degenerazione del lato posteriore dell'occhio. Il silenziamento della *dLsd1* di circa il 40% non ha modificato la tossicità dell'AR poliQ-espanso, mentre il silenziamento di *Dart8* di circa il 50% ha avuto un effetto significativo, seppur modesto, sulla tossicità dell'AR poliQ-espanso (**Figura 5a–c**). Coerentemente con l'effetto sinergico sulla transattivazione dell'AR poliQ-espanso, il silenziamento sia di *dLsd1*, sia di *Dart8* insieme ha soppresso fortemente il fenotipo degenerativo indotto da DHT provocato dall'AR poliQ-espanso. Tale prova supporta la cooperazione sinergica di *LSD1* e *PRMT6* nell'aumentare il GOF tossico *in vivo* dell'AR poliQ-espanso e il fatto che il silenziamento di entrambi i coattivatori riduce
20 in modo sinergico il GOF tossico dell'AR mutato.

ESEMPIO 10

I risultati descritti in precedenza supportano lo sviluppo di una strategia terapeutica che targetizza i coregolatori di AR, conformemente alla presente invenzione.

83 e 51 miRNA artificiali (amiR) sono stati disegnati per silenziare, rispettivamente, *Lsd1* e *Prmt6* murini. Utilizzando gli allineamenti migliori che targetizzano tutte le isoforme note di *Lsd1* e *Prmt6* murine, sono stati selezionati gli amiR top di gamma per la validazione *in vitro* (**Figura 6a, Tabella 5**). Nelle cellule MN1, l'amiR-*Lsd1*#1 ha silenziato l'espressione di *LSD1* del 50%, mentre gli amiR-*Lsd1*#2 e #3 hanno silenziato

l'espressione del 70%. Dato che il knock-out di LSD1 è letale a livello embrionale, mentre la sua aploinsufficienza non è associata a conseguenze gravi nel topo, l'amiR-Lsd1#1 è stato selezionato per ulteriori analisi. Gli amiR di *Prmt6* #2, #6 e #7 hanno silenziato in modo significativo *Prmt6* in misura simile (~50%); l'amiR-*Prmt6* #6 è stato selezionato per ulteriori analisi.

Le cellule MN1 che esprimono AR100Q, le quali hanno evidenziato una vitalità cellulare ridotta rispetto alle cellule MN1 che esprimono AR24Q in presenza di DHT, hanno avuto un aumento significativo della vitalità cellulare dopo silenziamento simultaneo di *Lsd1* e *Prmt6* (**Figura 6b**), coerentemente con i risultati ottenuti dalle mosche SBMA.

Per passare *in vivo*, un sottotipo di virus adeno-associato 9 (AAV9) che esprime la proteina fluorescente verde (GFP) è stato usato quale fonte di amiR (**Figura 6c**). Allo scopo di impostare le condizioni dell'infezione virale, una singola iniezione intraperitoneale di amiR-*Lsd1/Prmt6* è stata eseguita a concentrazioni di 2^{10} e 8^{10} particelle di virioni a 3 settimane di età. Mediante l'analisi della biodistribuzione dell'AAV9 che esprime l'amiR di controllo, le particelle virali sono state rilevate in diversi tessuti, inclusi fegato, cuore, quadriplice e midollo spinale (**Figura 6d**). Il Western blotting ha rilevato espressione di GFP in diversi tessuti, muscolo scheletrico incluso (**Figura 6e**). La trasduzione dell'amiR-*Lsd1/Prmt6* nei topi AR100Q ha ridotto in modo significativo i livelli di trascritto di *Lsd1* e *Prmt6*, senza effetti sui livelli di trascritto dell'AR murino e umano, nel muscolo scheletrico (**Figura 6f**). Il Western blotting ha confermato la minore espressione delle proteine di LSD1 e PRMT6 nel muscolo scheletrico, ma non nel midollo spinale, nel fegato, nel tessuto adiposo bianco e nei polmoni, con l'eccezione di LSD1 che era ridotta in modo significativo nel cuore (**Figura 6g and Figura 14**).

Dato che LSD1 e PRMT6 sono scrittori epigenetici che modificano l'espressione genica e che AR è un fattore di trascrizione attivo in diversi tessuti, i livelli di trascritto dei geni target di AR, LSD1 e PRMT6 sono stati misurati in tessuti diversi dal muscolo scheletrico. Il trattamento non ha modificato l'espressione dei geni target selezionati nella maggior parte dei tessuti, in tal modo escludendo un effetto generale della trascrizione genica (**Figura 15**). Tali osservazioni evidenziano che la veicolazione AAV9-mediata di amiR-*Lsd1/Prmt6* rappresenta una strategia efficace per il silenziamento dei coregolatori di AR *in vivo* senza effetti sull'espressione genica di AR.

ESEMPIO 11

L'efficacia degli amiR dell'Esempio 10 è stata testata nei topi AR100Q.

Anzitutto, l'analisi trascrittomica mediante RNA-seq è stata eseguita nel muscolo quadricepide di controlli di 13 settimane di età, di topi AR100Q trattati con amiR-

5 *Lsd1/Prmt6* e di topi WT. 6.583 geni espressi in modo differenziale (DEG) (4.158 geni sovraregolati e 2.425 geni sottoregolati, GSE193539) sono stati identificati nei muscoli affetti da SBMA non trattati rispetto ai muscoli WT (numero di volte assoluto della variazione $\log_2 > 2$, p corretto $< 0,01$) (**Figura 7a**), coerentemente con le osservazioni recenti di un elevato numero di geni alterati nel muscolo anteriore tibiale a 11 settimane
10 nello stesso modello murino SBMA. L'effetto del trattamento è stato analizzato nei topi WT e AR100Q, 1.129 DEG (488 geni sovraregolati e 641 geni sottoregolati) sono stati rilevati specificamente nei topi AR100Q. Si osservi che 285 geni erano completamente recuperati, evidenziando livelli trascrizionali comparabili a quelli dei topi WT, e 389 geni evidenziavano un recupero parziale (**Figura 7b**).

15 Inoltre, mediante l'esecuzione di un'analisi di arricchimento funzionale sui geni recuperati, si è ottenuta una significatività statistica per diversi termini fra cui “contrazione del muscolo scheletrico”, “sviluppo della struttura muscolare”, “assemblaggio miofibrillare”, “trasporto ionico del calcio del reticolo sarcoplasmatico”, “trimerizzazione della catena del collagene”, “assemblaggio miofibrillare e
20 metabolismo”, “metabolismo fruttosio glicogeno”, “nitrosilazione delle proteine”, “generazione dei metaboliti precursori ed energia”, e “processo metabolico della purina nucleoside monofosfato” (**Figura 7c,d**). In modo interessante, la maggior parte (~80%) dei processi biologici GO identificati in precedenza quali arricchiti nei muscoli dei topi femmina che esprimono AR poliQ-espanso e trattati con androgeni ha rilevato un
25 coefficiente di sovrapposizione $\geq 0,5$ con i processi biolGO arricchiti dai geni recuperati (65% con coefficiente di sovrapposizione pari a 1). Ciò suggerisce che i geni in tali categorie sono disregolati in modo trascrizionale mediante AR mutante e parzialmente o totalmente normalizzati all'atto del silenziamento di *Lsd1* e *Prmt6*.

Confrontando i dati con le analisi trascrittomiche pubblicate sui muscoli affetti da SBMA
30 che esprimono AR113Q (modello knock-in), AR97Q (un altro modello transgenico), o AR WT solamente nel muscolo (HSA-AR)¹¹, si è notato che 52 dei 153 (34%) geni disegolati nel modello HSA-AR sono stati recuperati mediante il silenziamento di *Lsd1*

e *Prmt6*. Analogamente, 58 dei 204 (28%) e 31 dei 159 (20%) geni disregolati rispettivamente nei modelli AR97Q e AR113 sono stati recuperati. Inoltre, solamente il 17% dei geni disregolati in un modello LOF di AR¹² è stato recuperato mediante il trattamento con amiR, evidenziando una riduzione limitata delle funzioni fisiologiche 5 dell'AR. A livello complessivo, i dati dimostrano un effetto del silenziamento genetico, conformemente alle realizzazioni preferite dell'invenzione, sul GOF tossico dell'AR poliQ-espanso.

ESEMPIO 12

In seguito, è stato effettuato uno studio preclinico per valutare l'effetto del silenziamento 10 di *Lsd1/Prmt6* sul fenotipo patologico murino. Un gruppo randomizzato di topi transgenici maschi AR100Q e di fratelli WT è stato assegnato a un amiR di controllo o all'amiR-*Lsd1/Prmt6*. Si è anzitutto verificato che la strategia terapeutica di silenziamento genetico non modificasse il peso corporeo e la funzione motoria dei topi 15 WT, così escludendo effetti indesiderati dalla manipolazione genetica dei geni target (Figura 8a). Ciò risulta particolarmente importante per *Lsd1*, per cui la delezione nel topo è letale a livello embrionale. In seguito, l'effetto del trattamento è stato analizzato sul fenotipo SBMA. I topi AR100Q hanno evidenziato un minore peso corporeo e disfunzioni 20 motorie a partire da circa 8 settimane di età. Il trattamento con amiR-*Lsd1/Prmt6* ha aumentato in modo significativo il loro peso corporeo a 9–11 settimane di età e ha migliorato la forza muscolare (test di sospensione alla barra) e la coordinazione motoria (test del rotarod) (Figura 8a).

Il muscolo affetto da SBMA è caratterizzato da un cambiodel tipo di fibra da glicolitico a ossidativo. Coerentemente con il ruolo di LSD1 sul metabolismo muscolare, l'amiR-*Lsd1/Prmt6* ha ridotto ($p = 0,05$) il numero di fibre ossidative dal 49% nei topi trattati con veicolo al 37% nei topi trattati con amiR-*Lsd1/Prmt6* (Figura 8b). Un aspetto chiave della patologia del muscolo scheletrico nella SBMA è dato dalla denervazione funzionale associata alla sovaregolazione dei geni, ad esempio del recettore associato ai muscoli tirosina chinasi (*Musk*), della miogenina (*MyoG*), e della molecola di adesione delle cellule neurali (*NCAM*), i quali sono associati alla comunicazione disfunzionale fra il motoneurone e la miofibra innervata⁸. *Musk*, *MyoG* e *NCAM* erano sovaregolati nel muscolo dei topi AR100Q e ridotti in modo significativo mediante il trattamento (Figura 25 30 8c). Occorre notare che tali geni sono regolati da LSD1. L'AR100Q forma il 2% degli

aggregati SDS-resistenti nel muscolo, che possono essere rilevati quali specie a peso molecolare elevato (HMW) che si accumulano nella porzione di impilamento di un gel di poliacrilammide⁸. Coerentemente con i risultati secondo cui PRMT6 aumenta l'aggregazione dell'AR poliQ-espanso, il Western blotting ha evidenziato che il silenziamento di *Lsd1* e *Prmt6* ha ridotto l'accumulo delle specie HMW nel muscolo, aumentando, al contempo, la quantità di AR monomerico (**Figura 8d**). Insieme, tali risultati evidenziano che il silenziamento di *Lsd1* e *Prmt6* attenua il fenotipo di un modello murino grave di SBMA.

ESEMPIO 13

La strategia di silenziamento genetico è stata validata anche nelle cellule umane, 3 amiR sono stati disegnati per silenziare *LSD1* e *PRMT6* umane (**Tabella 5**). Il silenziamento target è stato verificato nelle cellule HEK293T e nella linea cellulare del cancro alla prostata sensibile agli androgeni, LNCaP, in quanto LSD1 e PRMT6 sono sovraespresso nel cancro alla prostata e correlano con l'aggressività del cancro (**Figura 9a**) ^{4,7}. Nelle cellule HEK293T, il silenziamento sia di *LSD1*, sia di *PRMT6* ha modificato l'espressione dei due geni regolati dall'AR e dei rispettivi coregolatori, in particolare *ATP2A2*, il quale codifica SERCA2, e *CDKNIA*, il quale codifica p21^{CIP1} (**Figura 9b**). Nelle cellule LNCaP, si è osservata una riduzione significativa della proliferazione nelle cellule che targetizzano *LSD1* o *PRMT6*, così evidenziando che tali amiR esercitano un effetto biologico nelle cellule del cancro alla prostata (**Figura 9c**). Tali osservazioni validano il silenziamento amiR-mediato dei due coregolatori di AR fondamentali nelle cellule umane, suggerendo una traslazione potenziale di tale strategia ai pazienti affetti da SBMA ed optionalmente da altre malattie GOF AR-associate, specificamente il cancro alla prostata e i tipi di cancro influenzati dal genere.

25

Sequenze

SEQ ID NO: 1

>NM_018137.3

Proteina arginina metiltransferasi 6 (PRMT6) di homo sapiens, mRNA

gtgccgcgtacgcccggccggagccggcagagccccaagatgtcgacggccaaagaaaaggcttg
 agtcggggggcgccggcgaaggaggggaggaaactgaagaggaagatggcgccggagcgggaggccct
 ggagcgaccccgaggactaagcggaaacgggaccagctgtactacgagtctactcgacgtttcggtc
 cacgaggagatgtcgccggaccgcgtccgcaccatgcctaccgcctggatcctcggaactggcag
 cactgcgaggcaagacggtaactggacgtggcgccggcaccggcattctgagcatcttctgtgcccaggc
 cggggcccgccgtgtacgcggtagaggccagcgcctggcaacaggcccggaggtggcggttc
 aacgggtggaggaccgggtgcacgtcctgcggaccagtggagacttagagttgcggaaacagggtgg

SEQ ID NO: 2

35 >NM_001009999.3
Lisina dimetilasi 1A (KDM1A) di homo sapiens, variante di trascritto
1, mRNA
ggcgcgtgcgtacgcgacggcggtggcgccgcggcagcgtgaagcgaggcgaggcaaggctttcg
gaccacggagcgacagagcgagcgccctacggccgtcgccgcccggccgagatgttatctgg
gaagaaggccgcagcccgccggcggctgcagcgcagcaaccggacggaggctggccctggaca
gcaggcggctccgagaacgggtctgaggtggccgcgcagcccgccggcctgtcgggccagccgaggtcg
ggccggggcggtggggagcgcacaccccaagaagaagacgcctccgcggcctgcggggccctggggct
ggcggAACCCCGGGGTCGCAGGGCTCAAGGCCGCTACTGTCTGCTGGTCTGCAGCCCCATG
gaaactggaatagcagagactccggagggcgctggaccagccggcgaagcgggcgaaggttagagtaca
gagagatggatgaaagcttggccaacctctcagaagatgagttattcagaagaagagagaaatgcca
agcagagaaggaaaagaagcttccccaccacccctcaagccccacactgaggaagaaaatgaaagtgg
cctgaagaaccatcgggcaagcaggaggacttcaagacgcacaggcttgagggtatggagacggcaag
catcaggtgtggagggcgagcttccagagccacttcctcatgaccggatgacttctcaagaagcagc
ctgtttccagatattatcagtggaccacacagaccagaaggtttctttcattagaaaccgcaca
ctgcagttgtggataatccaaagattcagactgacatttggactctccaaacaatttagaagcac
cttataacagtgatactgtctgtccaccaggagttcacagttatttagagcgtcatggcttatcaactt
cgccatctataagaggataaaaccctaccaactaaaaagacagggaaaggtaattataggctctgg
gtctcaggcttggcagcagactgcacagttacaaggatggatgtcacactttggaaagccagg
atcgtgtgggtggacgagttgccacatttcgcaaaggaaactatgttagctgtatcttggagccatgttgt
aacaggcttggagggaaatcctatggctgttgtcagcaaacaagtaatatggaaactggccaagatcaag
aaaaatgcactttatgaagccaaacggacaagctgacactgtcaaggttcttaaagagaaaatgaaa
tgttagagcaagatgttacccgggtctagaagactacatcttacacttgcattcaactagacttcaatgt
cctcaataataagcctgtgtccctggccaggcattggaaagttgtcattcagttacaagagaagcatgtc

aaagatgagcagattgaacatttggaaagaagatagtaaaactcaggaagaatttgcataata
 agatggtaatttggaaagagaaaattaaagaactccatcagaatacaaaagaagcatctgaagtaagcc
 acccagagatattactgccgagttcttagtggaaacacaggatctgaccgcctatgcaaggaa
 tatgatgaatttagctgaaacacaaggaaagctagaagaaaaacttcaggagttggaaagcgaatccccaa
 5 gtatgtatatctctcatcaagagacagacaaatacttgattggcatttgcataatcttgcatttgctaa
 tgcccacacccctctcaactctcccttaagcactggatcaggatgtactttgatgcactggcagc
 cacctgacagtaaggaaatggctactcggtgtgcgtgtggcttagcagaaggcctagacattaaactga
 atacagcagtgcacaggttcgctacacggcttcaggatgtgaagtgtatgcatttttgcatttttgc
 10 gagtcaccccttattataaatgcgacgcagttctgttgcattccctgggtgtgcatttttgc
 ccaccagccgttcagttgtgccacccctccctgagtggaaaacatctgcagtcacccctgggtgtgc
 gcaacctaacaagggttgtgtttgtcggtttgtccatgtggatccaaggatgtcaatttgc
 15 tggcactgtggcaggagaagctgtgttatcatggaaaacataactgtacgtgttgc
 ttggcactgtggcaggagaacatacgatccgtactaccacccacaggtcatgttgc
 20 agaaggcggaaagaattgcagaccgtttggggccatgtatacgctgcctcgccaggccacaccagg
 gttcctgcacagcactcccaagcatgtgagacagatgcattctaaaggaaagaggccatgtgc
 ctgcattgtgatggagcttctgatggacaaaggagcttgcctcatttgc
 cctgatcagctgtgatggagcttgcatt
 25 atcatcttagtcccttgggtgtgggttt
 aattt

SEQ ID NO: 3-53: SEQUENZE di PRMT6 umana TARGET degli amiR (cDNA)

SEQ ID NO:	SEQUENZA TARGET (5'-3' cDNA)
3	gggaactgaagagaaagatgg
4	aacaggtggatgccatcgtga
5	tcagcgaccagatgctggaaat
6	caggtgaaggcagcactatgg
7	gtgaaggcagcactatggtg
8	actatggtggtggacatgagct
9	ggagatcggtgtgcaggattt
10	agatcggtgtgcaggatttt
11	ccatgcattggcttgcattct
12	atgcattggcttgcattctgg
13	tgcattggcttgcattctgg
14	gcatggcttgcattctgg
15	ttgcattctggttccaggta
16	tggagcaagacacggacgttt
17	cacggacgttccaggagagat
18	caacaacggatacagcgtgct
19	caacggatacagcgtgcttatt
20	aacggatacagcgtgcttatt
21	cggatacagcgtgcttattat
22	ggatacagcgtgcttattatt
23	cagcgtgcttattattggca

24	cgtgcttattattgggcattt
25	gcttattattgggcatttagc
26	attattgggcatttagcctca
27	gtagtaccaaggacttgtatt
28	atccctgacacacctcacacctt
29	tccctgacacacctcacacctta
30	ccctgacacacctcacaccttat
31	tgacacacctcacaccttatcta
32	acacacctcacaccttatctaag
33	cacaccttatctaagtctgaa
34	acacaccttatctaagtctgaa
35	tcatacatttccagtgact
36	catacatttccagtgact
37	tccagtgacttttagtatct
38	tacgacttttagtatctctcca
39	aggtgcctgtaggctatggta
40	cctgtaggctatggtacttct
41	ggctatggtaacttcttcctca
42	gttctcattactctgaccaca
43	ttctcattactctgaccacat
44	actctgaccacatacatcata
45	acatacatcatagggtgctaa
46	catacatcatagggtgctaaa
47	atacatcatagggtgctaaag
48	acatcatcatagggtgctaaagt
49	catcatagggtgctaaagttg
50	tcatagggtgctaaagttgat
51	gggtgctaaagttgatgaaca
52	gcataccataagaaactcagaa
53	cagccaaatgtgaaagttgtg

SEQ ID NO: 54-138: SEQUENZE di LSD1 umana TARGET degli amiR (cDNA)

SEQ ID NO:	SEQUENZA TARGET (5'-3' cDNA)
54	ggaaactggaatagcagagac
55	gaaactggaatagcagagact
56	gacgacagttctggagggtat
57	acgacagttctggagggtatg
58	acagttctggagggtatggag
59	tttccagagccacttcctca
60	ttcctcatgaccggatgactt
61	catgaccggatgacttctcaa
62	gaccggatgacttctcaagaa

63	acactgcagttgtgggtggat
64	cactgcagttgtgggtggata
65	ctgcagttgtgggtggataat
66	cagttgtgggtggataatcca
67	tgtccaccgagttcacagttt
68	gtccaccgagttcacagtttat
69	caccgagttcacagttattttta
70	ccgagttcacagttatttttaga
71	cgagttcacagttatttttagag
72	tcacagttatttttagagcgtca
73	cacagttatttttagagcgtcat
74	agttatttttagagcgtcatgtt
75	ttatttttagagcgtcatggtct
76	tattttagagcgtcatggtctt
77	ggtggacgagttgccacat
78	gacgagttgccacat
79	ttgccacat
80	tgcacat
81	catttcgaaaggaaactatg
82	gccatggtaacagg
83	ggtaacagg
84	agg
85	ggaatcctatggctgtgg
86	atcctatggctgtgg
87	caagctgacactgtcaagg
88	aagctgacactgtcaagg
89	ctgacactgtcaagg
90	tgacactgtcaagg
91	gacactgtcaagg
92	actgtcaagg
93	ctgtcaagg
94	tgtcaagg
95	gtcaagg
96	agagcaagag
97	gagcaagag
98	aagag
99	ctccatcag
100	cagcaata
101	ctgaagtaa
102	taaaggccaccc
103	ccagagatattact
104	cagagatattact
105	gagatattact

106	agatattactgccgagttctt
107	gatattactgccgagttctta
108	tgaccgcctatgcaaggaat
109	gccctatgcaagaatatgat
110	cctatgcaaggaatatgatga
111	cagacaataacttgattggca
112	ctctctcaactctctccctta
113	tctctcaactctcccttaa
114	taagcactgggatcaggatga
115	tgggatcaggatgatgacttt
116	tcaggatgatgactttgagtt
117	aggatgatgactttgagttca
118	atgactttgagttcactggca
119	gtggcttagcagaaggccta
120	tttagcagaaggcctagacat
121	tagcagaaggcctagacatta
122	aaggcctagacattaaactga
123	aggcctagacattaaactgaa
124	agcccaaagaaaactgtggtgt
125	cccaaagaaaactgtggtgtct
126	aagaaaactgtggtgtctcggt
127	agaaaactgtggtgtctcggt
128	agccgattccacgactcttct
129	gccgattccacgactcttct
130	cgattccacgactcttcttg
131	cgactctttgcgggagaa
132	actcttcttgcgggagaaaca
133	tcttcttgcgggagaaacata
134	gagaacatacgatccgttaact
135	agaacatacgatccgttaacta
136	ctgcgagaagcgggagaatt
137	tgcgagaagcgggagaattg
138	cgagaagcgggagaattgca

- SEQ ID NO: 139-168: Oligo clonati per generare precursori di amiR che targetizzano
5 *Prmt6* e *Lsd1* murine e umane (vedere Tabella 5)
- SEQ ID NO: 169: amiR di controllo
aaatgtactgcgcgtggagac
- 10 SEQ ID NO: 170: primer forward EGFP
gtcctgctggagttcg
- SEQ ID NO: 171-173: amiR maturi che targetizzano hPRMT6 (5'->3'):

SEQ ID NO:	amiR maturo
171	agcacgcuguauccguuguug
172	aauaaaggcacgcuguauccg
173	uaaggugugaggugucaggga

SEQ ID NO: 174-176: amiR maturi che targetizzano hLSD1 (5'->3'):

SEQ ID NO:	amiR maturo
174	aauacugugaacucgguggac
175	ugacgcucuaaaauaacuguga
176	uuaggaaccuugacaguguca

- 5 SEQ ID NO: 177-179: precursori di amiR che targetizzano hPRMT6 (5'->3'); la sequenza targettante è sottolineata.

SEQ ID NO:	precursore di amiR
177	<u>agcacgcuguauccguuguug</u> guuuuggccacugacugacccaacaacguacagcgugcu
178	<u>aauaaaggcacgcuguauccg</u> guuuuggccacugacugacccggauacagugcuuauuuau
179	<u>uaaggugugaggugucaggga</u> guuuuggccacugacugacuccugaccucacaccuua

SEQ ID NO: 180-182: precursori di amiR che targetizzano hLSD1(5'->3'); la sequenza targettante è sottolineata.

SEQ ID NO:	precursore di amiR
180	<u>aauacugugaacucgguggac</u> guuuuggccacugacugacguccaccguucacaguuaau
181	<u>ugacgcucuaaaauaacuguga</u> guuuuggccacugacugacucacaguuuuuagagcgguca
182	<u>uuaggaaccuugacaguguca</u> guuuuggccacugacugacugacacugaaggguuccuua

10

SEQ ID NO: 183-185 fonti di amiR che targetizzano hPRMT6 (5'->3'); la sequenza targettante è sottolineata.

SEQ ID NO:	fonte di amiR
183	<u>agcacgttatccgttgtttggccactgactgaccaacaacgtacagcggtct</u>
184	<u>ataataaggcacgttatccgttgtttggccactgactgacggatacagtgtttattat</u>
185	<u>taaggtgtgagggttcaggagtttggccactgactgactccctgacctcacaccta</u>

- 15 SEQ ID NO: 186-188 fonti di amiR che targetizzano hLSD1 (5'->3'); la sequenza targettante è sottolineata.

SEQ ID NO:	fonte di amiR
186	<u>ataactgtgaactcggtggacgtttggccactgactgacgtccaccgttacagttat</u>
187	<u>tgacgcctaaataactgtgagtttggccactgactgactcacagtttagagcgta</u>
188	<u>ttaggaaccttgacagtgtcagttggccactgactgactgacactgaaggttcctaa</u>

SEQ ID NO: 189-224 primer RT-PCR

Primer geni murini	SEQ ID NO:	5' - 3'
Prmt6 for	189	agtccatgctgagctccgt
Prmt6 rev	190	tccatgcagctcatatcca
Lsd1 for	191	tggaaactggccaagatcaag
Lsd1 rev	192	gcttctagcaaccggtaaattc
Actina for	193	gacaggatgcagaaggagattactg
Actina rev	194	ctcaggaggagcaatgatcttgat
AR for	195	gcccgaaatgcaaagggtctt
AR rev	196	tggcgtaaccccttggaaa
Musk for	197	atcaccacgccttggaaac
Musk rev	198	tgtttccacgctcagaatc
Myog for	199	cttgctcagctccctcaac
Myog rev	200	tgggagttgcattcactgg
Ncam for	201	acaatgctgcgaactaagga
Ncam rev	202	tgcacttgacacagga
Cdkn1a for	203	aggaccacgtggccttgc
Cdkn1a rev	204	tttcggccctgagatgttc
Fkbp4 for	205	gaccgagtcttgcactacac
Fkbp4 rev	206	atcccaaggccttgcaccc

Fkbp5 for	207	aaaggacaatgactactgatgagg
Fkbp5 rev	208	ctgacaacatcccttttagtggac
Tp53 for	209	gggacgggacagctttgag
Tp53 rev	210	aggacttccttttgcggaaa
Ezh2 for	211	catacgctttctgtcgacgatg
Ezh2 rev	212	acactgtggtccacaaggcttg

Primer geni umani	SEQ ID NO:	5' - 3'
Prmt6 for	213	gagtgctactcgacgttc
Prmt6 rev	214	aggatacccaggcggtag
Lsd1 for	215	agtgagcctgaagaaccatc
Lsd1 rev	216	tctgttgtggccactgataat
AR for	217	tgggagagagacagcttga
AR rev	218	agtactgaatgacagccatctg
ATPA2 for	219	taccgaattgaagggtcttct
ATPA2 rev	220	cgacattgacttctgtcacg
Cdkn1a for	221	aagaccatgtggacctgtca
Cdkn1a rev	222	ggcttcctttggagaagat
Actina for	223	ggacttcgagcaagagatgg
Actina rev	224	agcactgtgtggcgtacag

SEQ ID NO: 225-230 Primer ChIP

Primer	SEQ ID NO:	5' - 3'
Neg_For	225	tccctgtgcccaaagagtag
Neg_Rev	226	ccctgaagaatgaggacgag
LsdI_promoter_ARE_For	227	cagtctggcctacaaagttag
LsdI_promoter_ARE_Rev	228	gattggttttccgagacagg
Prmt6_promoter_ARE_For	229	acttgtcatggcgtagagg
Prmt6_promoter_ARE_Rev	230	gattcgttagtccgcattcctg

SEQ ID NO: 231

pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR (Vettore di espressione BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi)

5 gttgacattgattattgacttagttataatagtaatcaattacgggtcattagttcatagccatatat
 ggagttccgcgttacataacttacggtaaatggccgcctggctgaccgcacacccccccattg
 acgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgcataataggactttccattgacgtcaatgggtggagt
 atttacggtaactgcccacttggcagtagatcaatgttatcatatgccaatgcgttatggccatttgcgt
 caatgacggtaatggccgcctggcattatgcccagtagatcatgaccttatggactttcctacttggcag
 10 tacatctacgtattatgtcatcgctattaccatggtgatgcgggtttggcagtagatcatcaatggcgtggat
 agcggtttgcactcacgggatttccaagtctccaccattgacgtcaatgggagttttggcaca
 aaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgcaccattgacgcataatggcggtaggcgtgt
 cggggaggtctatataaggcagagctctggctaacttagagaacccactgttacttgcattatcgaaa
 ttaatacgaactcactataggagttccaaagctggctagttaaagctatcaacaatgttgcataaaaaagca
 15 ggctttaaaaccatggtagcaaggcgaggagctgttcacccgggtggcgcatttcgtcgagctgg
 acggcgacgtaaacggccacaagttcagcgttccggcgaggcgaggcgatgcacccatcgcaagct
 gaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctccgtgcctggccaccctctgtgaccacccatcc
 tacggcgtagtgcattccgcctaccggaccatgaagcagcacgacttcaagtccgcattgc
 ccgaaggctacgtccaggagcgcaccattttcaaggacgacggcaactacaagacccgcggcagg
 20 gaagttcgaggcgacaccctggtaaccgcattcgagctgaaggcatcgacttcaaggaggacggcaac
 atcctggggcacaagctggagttacaactacaacagccacaaggcttatcatccggcacaagcagaaga
 acggcatcaaggtgaacttcaagacccgcacaacatcgaggacggcagcgtcagctcgccgaccacta
 ccagcagaacaccccatcgccgacggccgtgtgcgtccgacaaccactacgtgacgacccagtc
 gcccgtgacaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggctgtggagttcgacccgcgg
 25 tcactctcgccatggacgactgtacaagtaagctaaagcttgcatttcgtggccgtcgatcgatcc
 tagtgagtgcaccactggatccctggaggctgtatgtctcaggacacaaggctgttacta
 gcactcacatggaaacaatggcccgatctggccgcactcgagatcttagaccctgttacta
 agtgggtatctagagggcccggttcgtatggggaggctactgaaacacggaaaggagacaata
 cggaaaggacccgcgtatgcggcaataaaaagacagaataaaacgcacgggtgtggcgttgc
 30 ataaacgcggggttcggcccagggtggcactctgtcgataccaccgtgacccatggggcaata
 cgcccggttcttccctttccaccacccaccccaagttcggtgaaggcccagggtcgacggcaac
 gtcggggccggcaggccctgcacatgcattccctatacgatggatctgcgcacgtggctctagg
 gcaatgcgtctggccgtgtcaaaaatctgtatggatctgcgcacgtggctctagggtatcccc
 cggccctgtacggcgcattaagcgcgggggtgtgggttacgcgcacgtgcgtaccc
 35 cggccctgtacggcgcatcccttcgttcttcccttcgtccacgttcgcggcttccgtca
 gctctaaatcggggtctccctttaggggtccgatttagtgcattacggcactcgacccaaaaacttg
 attagggtatgggtacgttagggccatgcgcctgtatagacggttttcgcccttgcacgtggagtc
 cacgtttaatagtggacttgcattgtgtcagttagggtgtggaaagtccccaggctcc
 40 gatttataagggatttgcgatttgcgcatttgcgcatttgcgttggaaatggacttacaaaat
 cgaattaattctgtggatgtgtcagttagggtgtggaaatggacttacaaaat
 atgcaaaacatgcattgtcagcaaccagggtgtggaaatggacttcc
 caggctccaggcaggcaggaaatggacttcc

SEQ ID NO: 232 shPRMT6 #1

caccggcaauucugagcaucuu.

50 SEQ ID NO: 233 shPRMT6 #2
cgcacauacuuucuqcqcuacaaa

55 SEQ ID NO: 236-334 Sequenze guida gRNA che targetizzano PRMT6 umana

SEQ ID NO:	5'-3'
236	GCUGUACUACGAGUGCUACU
237	GGCAAGACGGUACUGGACGU
238	ACUGCGAGGAAGACGGUAC
239	GAUACCCAGGCGGUAGGCAU
240	GGUGCAAGUGGAGCAAGACA
241	CAGAUGGCAAAGCCAUGCAU
242	UAUGGCUCGGCGCCCAUGCA
243	AGCCAGGUGAAGCAGCACUA
244	GCCCAUCCACUCGCUCACGA
245	UCCUCCACGCGCGAACCAAG
246	GGCAGCACUGCGAGGCAAGA
247	GCCAUCGUGAGCGAGUGGAU
248	CCGAAGGAUACCCAGGCGGU
249	GGCAACUCUACAGUCUCCAC
250	GGGGGCUAUGAAGAGCUCGG
251	AUCGUUGUGCAGGGAUUGUC
252	CACUCGGAGAUCGUUGUGCA
253	UGUGCAGGGAUUGUCCGGCG
254	ACGAUGGCAUCCACCUGUUC
255	GUGGCCCAUGAGACAGCGCG
256	GCGACCCCGGAGGACUAAGC
257	CCAGGC GGUAGGCAUCGGUG
258	UGGAUGCCAUCGUGAGCGAG
259	CGGUAGAGGCCAGCGCCAUC
260	GCAGUGCUGCCCAGUUCCGA
261	CCCAGUUCCGAAGGAUACCC
262	CCUACCGCCUGGGUAUCCUU
263	CCUGGGUAUCCUUCGGAACU
264	CGCACCGAUGCCUACCGCCU
265	CGUUCCCGCUUAGUCCUCG
266	UCAGCCACUUGGUUCGGCGCG
267	GGCUAUGAAGAGCUCGGCGG
268	ACAGAAGAUGCUCAGAAUGC
269	GUGAGCGAGUGGAUGGGCUA
270	CCUGCACAAACGAUCUCCGAG
271	UCAGCGACCAGAUGCUGGAA
272	ACGGUACUGGACGUGGGCGC
273	AGCGCGUGGCGAAGCCCUC
274	CCCGGCCACUCACUGGAAAC
275	GGGAGGUGGUGCGGUUCAAC
276	GGCCGGGUGAAAAGGCGAGG

277	UCUACAGUCUCCACUGGUCC
278	CAGCUAGAGCUCUCCCCGCGC
279	GUUUCUCCGACUCCCCCUCCA
280	CCGGCGCGUACGCGGUAG
281	GUGGAGGACGGAGCUCAGCA
282	GUGUCUUGCUCACUUGCAC
283	AGUCCUCCGGGGUCGCUCCA
284	UCUAGCUGAGCAAAGCGCUG
285	GUGGACAUGAGCUGCCUGGA
286	CCAGAUGGCAAAGCCAUGCA
287	CGAACCAAGUGGCUGAAGGA
288	GUUGAACCGCACCAACCUCCC
289	AAGGCGAGGUGGGACAGCACC
290	GCGCUGUCUCAUGGGCCACU
291	AUGAAGAGCUCGGCGGAGGC
292	GGCCAGCGCCAUCUGGCAAC
293	CAGGCGACGGGGUUGUCCC
294	CAGGAGCUGGAGGCCGGAGU
295	UCUGAGCAUCUUCUGUGCCC
296	CGGAACUGGGCAGCACUGCG
297	AGGCGAGGUGGGACAGCACCA
298	CGGGGCCCGCGCGUGUACG
299	GGUCCACGAGGAGAUGAUCG
300	CCAGGCGCCAUUCCAGCAUC
301	CCCCAUCAGCGACCAGAUGC
302	AGUGGAGACUGUAGAGUUGC
303	GCAGCACGCGCAGGCGACGG
304	AGGGGAGUCGGAGAAACCCC
305	UCACCUGGCUCCAGAAGCCC
306	GAAGACCAAAGACUUUGCCA
307	GGUGAAGCAGCACUAUGGUG
308	UGUAGCGCAGCAGCACGCGC
309	CUGGACGUGGGCGCGGGCAC
310	GCGCUACAAAGUGGGAGACC
311	GUGCUGCUGCGCUACAAAGU
312	GCGAACCAAAGUGGCUGAAGG
313	GGCGAGGUGGGACAGCACCAG
314	CCAGGUGACCUUCCUGGAG
315	GAAGGUACCCUGGAACCAGA
316	AGUUCGAAGGAUACCCAGG
317	GCAGCAGCACGCGCAGGCGA
318	CCGAGCCAUGCAGCUGCAG

319	GUUCAACGGGCUGGAGGACC
320	GGUCCGCGAUCAUCUCCUCG
321	UGUGGACAUGAGCUGGCCUGG
322	AGCUCAGCAUGGACUCGUGC
323	ACCGCCCUCCUUCAGCCACU
324	AUUGUCCGGCGAGGACGUGC
325	CCGGGCCAGCACGUCCUCGC
326	AGGCAACGCUCAGGUCCUCCA
327	CUCCAGCUCCUGCUCCAAGC
328	GCAGGAGCUGGAGGCCGGAG
329	CAGCAUCUGGUCGCUGAUGG
330	GAUGGGGGCUAUGAAGAGCU
331	ACCAAGUGGCUGAAGGAGGG
332	UUGGAGCAGGAGCUGGAGGC
333	GAGGGAACUGAAGAGGAAGA
334	UUCCAGGUGACCUUCCCCUGG

SEQ ID NO: 335-431 Sequenze guida gRNA che targetizzano PRMT6 umana

SEQ ID NO:	5'-3'
335	AGUGCGACAGGUUCGCUACA
336	UGUGGUCCACUGAUAAAUC
337	GGAUACUACAACUCACCCGA
338	UGGUAGCAGUGCAGUACCUC
339	UAUAAGGUGCUUCUAAUUGU
340	GCCACUAGUGCCAACAGUAU
341	GGAUCUGACCGCCCUAUGCA
342	UGUAUACCACACCUUGCAUA
343	AAGAUGUAGCUUCUAGAAC
344	UAGGGCAAGCUACCUGUUA
345	UCUUAGUGAAAAGCAAACAC
346	UUUCUGAACAGGAUCGUGU
347	AUGUAUACCACACCUUGCAU
348	ACAUCUGCAGUCCAAAGGAU
349	GGGACACAGGCUUUAUUAUG
350	AUAAGUGACGAUGUGAUUGU
351	GGGAUUUGGCAACCUUAACA
352	GCAGUCCAAAGGAUGGGAUU
353	AGUGCCAACAGUAUUGGAGC
354	UCAACUUCGGCAUCUUAAG
355	AGAUGAUCCUGCAGCAACAU
356	AGUAGCCAUUCCUUACUGUC

357	ACACACUACUUACUGUUUA
358	AAGAUGAGCAGAUJUGAACAU
359	GAACUCGGCAGUAAAUCUC
360	AACAUCUGCAGUCCAAGGA
361	UGGUAGAGCAAGAGUUUAAC
362	GAAUAAGAGCCCCGAGCCC
363	AUAAAUAAGGUUUGACUCG
364	UGACCGCCCUAUGCAGGUG
365	UCGGCAGUAAAUCUCUGGG
366	GGUCAGCAAACAAGUAAAUA
367	AAGGUAAAUAUUAUAGGCUC
368	GAAGGC AUU ACC UU AUAG
369	AAGAACUGUGGUGUCUCGU
370	ACCAAGACCUGUUACCACCA
371	AUACUGUUGGCACUAGUGGC
372	UGCCCGAACAAA UUGACACU
373	AGGAGAACUGCUGGUUAUCA
374	AGGUAAAUAUUAUAGGCUCU
375	AGUGAGCCUGAAGAACCAUC
376	AGGAGGUCCUUACUUGGUAG
377	AAGUGAGCCUGAAGAACCAU
378	UUCAAGACGACAGUUCUGGA
379	AUAGGUAGAGUACAGAGAGA
380	UGAAAUGGAAACUUACUGUG
381	AAUGC CUGGCCAAGGGACAC
382	GGAAAACAUCUGCAGUCAA
383	GGCGCAAGCGGGCGAAGGUA
384	GGUCAUGAGGAAGUCGGCUC
385	UCGUUGGCUGCUGAUCCCCU
386	GAGAGGUGGCACAAACUGAA
387	CAAACAAGUAAAUAUGGAAC
388	UCGACUUACAGCUUGUCCGU
389	CUUAGUGAAAAGCAAACACA
390	AGGAGGGAAUCCUAUGGCUG
391	AACUCGGCAGUAAAUCUCU
392	AGUUGGAAGCGAAUCCCCCA
393	AGAGCCGACUUCCUAUGGAC
394	GAGCACCAUGCACUGUGGU
395	UGGACCACAACAGACCCAGA
396	AGGCCUUCUGCUAAAGCCAC
397	CUCUUCUGGAACCUCUUAUA
398	UAGGAGGUCCUUACUUGGU

399	AUACCACACCUUGCAUAGGG
400	ACUGAUAAAUCUGGAAAAC
401	AGCCACCUGACAGUAAGGAA
402	UCAUCCGGUCAUGAGGAAGU
403	GGUGGCACAAACUGAACGGC
404	GAUGCUCUGGCCAUUCUCAAA
405	AAUAAUACUCAUCUUUCUGAG
406	AGUUCUCUGUACCCUUCCCC
407	CUGCUUCUUGAGAAGUCAUC
408	GAUGAUGACUUUGAGUUCAC
409	UGUGUCCCUGGCCAGGCAU
410	AAUGCAGCUGCAGUUGUGGU
411	AGCUGAUCUUGGAGCCAUGG
412	GCUUCAGCACACCCAGGGGA
413	AACUUCCAAUGCUGGCCAA
414	GUAGGAGGUCCUACUUGGU
415	GGAAUAGCAGAGACUCCGGA
416	CCGCAAGAAAGAGGCCUCCGC
417	GCUGCUGCUUCAGCACACCC
418	UGGUAAAAGGACACUGUCA
419	GAGACAGACAAAACUUGAU
420	GUGCCUGUGGCUUUAGCAGA
421	CUUCAGCACACCCAGGGGA
422	GUUCUCUGUACCCUUCCCCU
423	UGCUGCUUCAGCACACCCAG
424	GAAGAAGAUAGUGAAAACUC
425	AGUUCUGGAGGGUAUGGAGA
426	CUGCUGCUUCAGCACACCCA
427	UCCUCAGGUGGGCUUGAGG
428	GAAUAGCAGAGACUCCGGAG
429	GAAGCGAAUCCCCAAGGUA
430	AGGCUCUGGGUCUCAGGCU
431	AAGUCCUCCUGCUUGCCCCUG

Riferimenti

1. Dejager, S., et al. A Comprehensive endocrine description of Kennedy's disease
5 revealing androgen insensitivity linked to CAG repeat length. J Clin Endocrinol Metab 87, 3893-3901 (2002).

2. Pandey, U.B., et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 447, 859-863 (2007).
3. Yamamoto, T., et al. An open trial of long-term testosterone suppression in spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve* 47, 816-822 (2013).
5. 4. Yoshimatsu, M., et al. Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer* 128, 562-573 (2011).
10. 5. Nicoletti L, Paoletti C, Tarricone G, Andreana I, Stella B, Arpicco S, Divieto C, Mattu C, Chiono V. Lipoplexes for effective in vitro delivery of microRNAs to adult human cardiac fibroblasts for perspective direct cardiac cell reprogramming. *Nanomedicine* 45, 102589 (2022)
6. Metzger, E., et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 437, 436-439 (2005).
15. 7. Kahl, P., et al. Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. *Cancer Res* 66, 11341-11347 (2006).
8. Chivet, M., et al. Polyglutamine-Expanded Androgen Receptor Alteration of Skeletal Muscle Homeostasis and Myonuclear Aggregation Are Affected by Sex, Age and Muscle Metabolism. *Cells* 9(2020).
20. 9. Pennuto, M. & Basso, M. In Vitro and In Vivo Modeling of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. *J Mol Neurosci* 58, 365-373 (2016).
10. Zibetti, C., et al. Alternative splicing of the histone demethylase LSD1/KDM1 contributes to the modulation of neurite morphogenesis in the mammalian nervous system. *J Neurosci* 30, 2521-2532 (2010).
25. 11. Mo, K., et al. Microarray analysis of gene expression by skeletal muscle of three mouse models of Kennedy disease/spinal bulbar muscular atrophy. *PLoS One* 5, e12922 (2010).
12. MacLean, H.E., et al. Impaired skeletal muscle development and function in male, but not female, genomic androgen receptor knockout mice. *FASEB J* 22, 2676-2689 (2008).
30. 13. Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550 (2014).

14. Zhou, Y., et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* 10, 1523 (2019).
15. Parrini, M., et al. Restoring neuronal chloride homeostasis with anti-NKCC1 gene therapy rescues cognitive deficits in a mouse model of Down syndrome. *Mol Ther* 29, 3072-3092 (2021).

RIVENDICAZIONI

1. Agente terapeutico comprendente almeno un inibitore di almeno un coattivatore del recettori degli androgeni (AR), per l'uso nel trattamento di una patologia associata al guadagno di funzione di AR e/o alla sovraespressione di un coattivatore di AR, in cui
5 detto almeno un inibitore di almeno un coattivatore di AR è almeno un silenziatore genetico che targetizza un coattivatore di AR, o almeno un inibitore a piccola molecola di un coattivatore di AR, o una loro combinazione, e in cui il detto almeno un coattivatore del recettore degli androgeni è selezionato tra la proteina arginina metiltransferasi 6 (PRMT6), la demetilasi 1 specifica della lisina (LSD1), o loro combinazioni.

10

2. L'agente terapeutico per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui la patologia associata al guadagno di funzione di AR e/o alla sovraespressione di un coattivatore di AR è: Atrofia Muscolare Spinale Bulbare (SBMA) o cancro; preferibilmente il cancro è cancro alla prostata.

15

3. L'agente terapeutico per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, in cui l'almeno un silenziatore genetico è selezionato tra: una molecola di RNA interferente (RNAi), o un rispettivo precursore o una rispettiva fonte, o un loro equivalente; un agente di editing genomico; o loro combinazioni; opzionalmente, detto agente terapeutico comprendendo almeno un silenziatore genetico e almeno un inibitore a piccola molecola di un coattivatore di AR.

20

4. L'agente terapeutico per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, comprendente almeno un silenziatore genetico che è una molecola di RNAi che targetizza PRMT6, o un rispettivo precursore o una rispettiva fonte, o un loro equivalente, e/o almeno un silenziatore genetico che è una molecola di RNAi che targetizza LSD1, o un rispettivo precursore o una rispettiva fonte, o un loro equivalente.

25

5. L'agente terapeutico per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, comprendente almeno un silenziatore genetico che è un sistema CRISPR/Cas che targetizza PRMT6, e/o comprendente almeno un silenziatore genetico che è un sistema CRISPR/Cas che targetizza LSD1.

6. L'agente terapeutico per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, comprendente almeno un inibitore a piccola molecola di LSD1 costituito da un inibitore monoammino ossidasi, preferibilmente comprendente fenelzina, tranilcipromina, o rispettive miscele.

7. L'agente terapeutico per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, comprendente almeno una molecola di RNAi, o un rispettivo precursore o una rispettiva fonte, o un loro equivalente, targetizzante:

10 - una qualsiasi delle sequenze SEQ ID NO: 3-53 di PRMT6, preferibilmente una qualsiasi delle sequenze SEQ ID NO: 18, 21 o 29, o un rispettivo trascritto; più preferibilmente detta molecola di RNAi essendo un miRNA artificiale (amiR) comprendente la, o consistente nella, sequenza SEQ ID NO: 171-173, o un precursore di amiR comprendente la, o consistente nella, sequenza SEQ ID NO: 177-178, o una fonte 15 di amiR comprendente la, o consistente nella, sequenza SEQ ID NO: 183-185, o un loro equivalente;

e/o

20 - una qualsiasi delle sequenze SEQ ID NO: 54-138 di LSD1, preferibilmente una qualsiasi delle sequenze SEQ ID NO: 68, 72 o 90, o un rispettivo trascritto; più preferibilmente detta molecola di RNAi essendo un miRNA artificiale (amiR) comprendente la, o consistente nella, sequenza SEQ ID NO: 174-176, o un precursore di amiR comprendente la, o consistente nella, sequenza SEQ ID NO: 180-182, o una fonte di amiR comprendente la, o consistente nella, sequenza SEQ ID NO: 186-188, o un loro equivalente.

25

8. L'agente terapeutico per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, comprendente almeno un silenziatore genetico di un coattivatore di AR e ulteriormente comprendente un veicolo di veicolazione per la veicolazione di detto silenziatore genetico in una cellula; preferibilmente detto veicolo di veicolazione essendo selezionato da: un vettore virale, microsfere, liposomi, lipoplessi, nanoparticelle, microparticelle, particelle di oro colloidale, lipopolisaccaridi, polipeptidi, polisaccaridi, collagene, pegilazione di veicoli virali, compositi di grafene, coniugati di colesterolo, complessi di ciclodestrano,

o polimeri di polietilenimmina; preferibilmente in cui detto veicolo di veicolazione è un vettore virale, più preferibilmente selezionato da: un vettore virale adeno-associato, un vettore lentivirale, un vettore adenovirale, un vettore retrovirale, un vettore virale alfa, un vettore di virus del vaccino, un vettore di virus dell'herpes simplex (HSV), un vettore di virus della rabbia e un vettore di Sindbis virus.

9. Un miRNA artificiale che targetizza PRMRT6 comprendente la, o consistente nella, sequenza SEQ ID NO: 171-173, o una rispettiva fonte o un rispettivo vettore, o un loro equivalente.

10

10. Un miRNA artificiale che targetizza LSD1 comprendente la, o consistente nella, sequenza SEQ ID NO: 174-176, o una rispettiva fonte o un rispettivo vettore, o un loro equivalente.

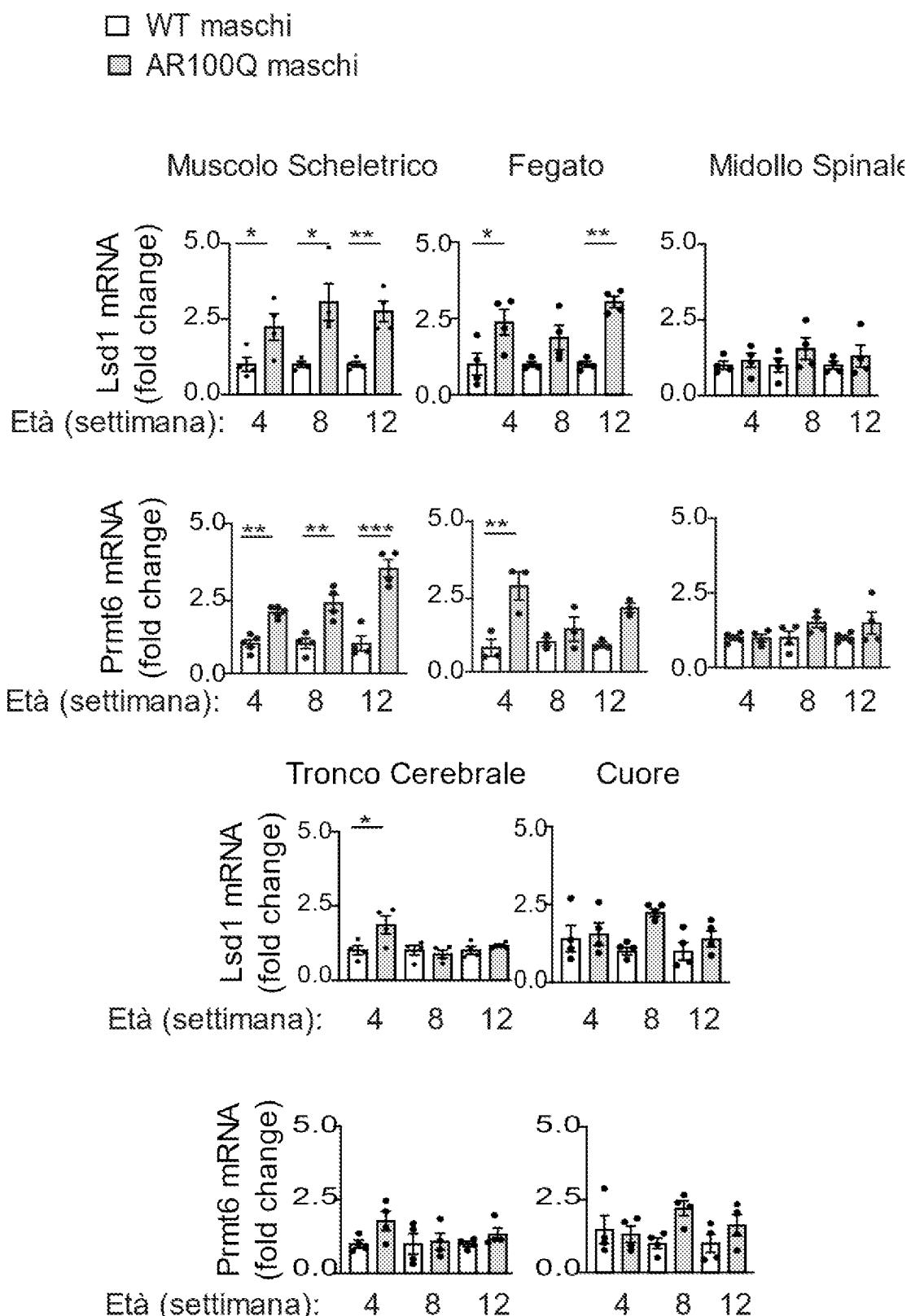
a

Fig. 1

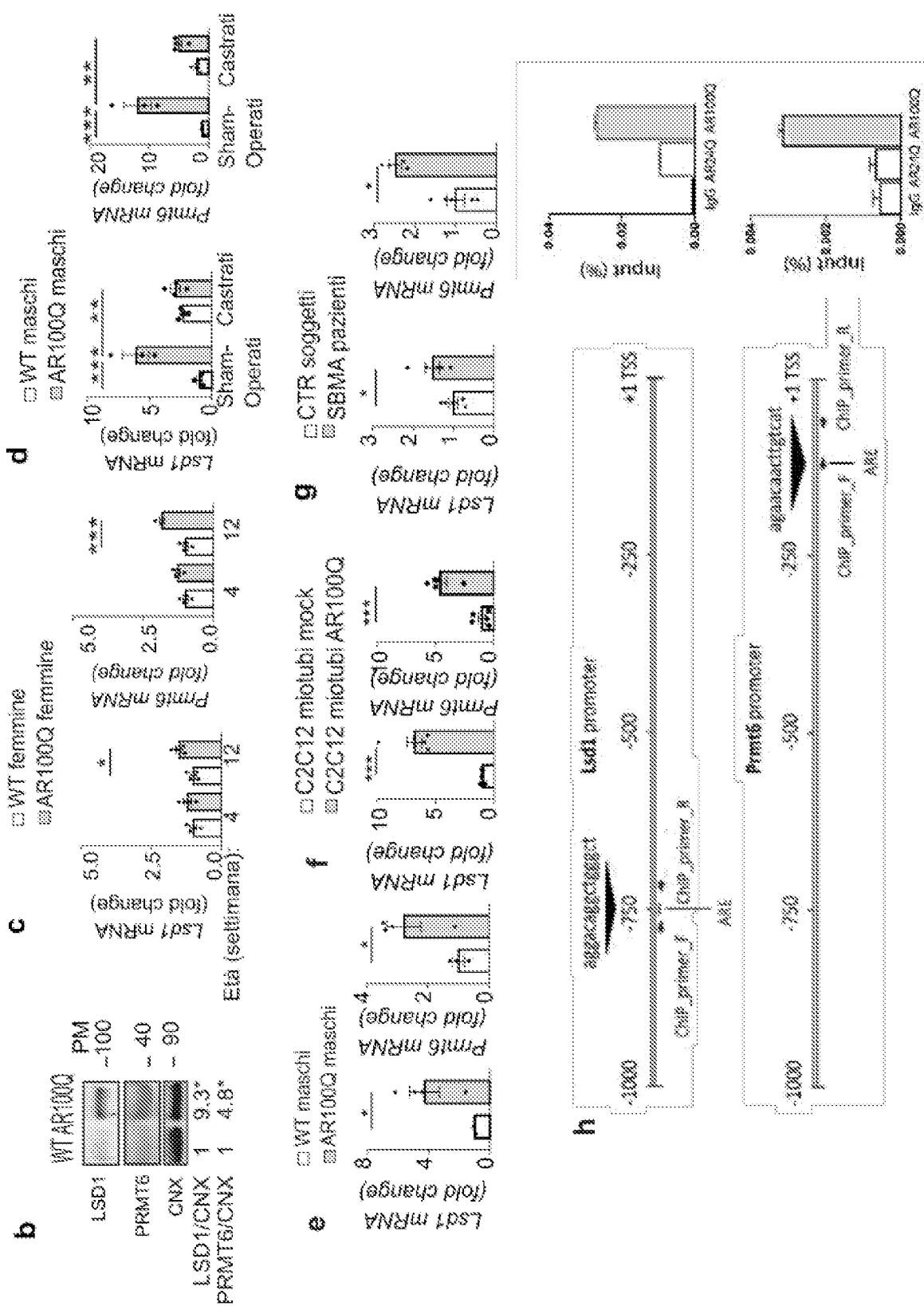


Fig. 1

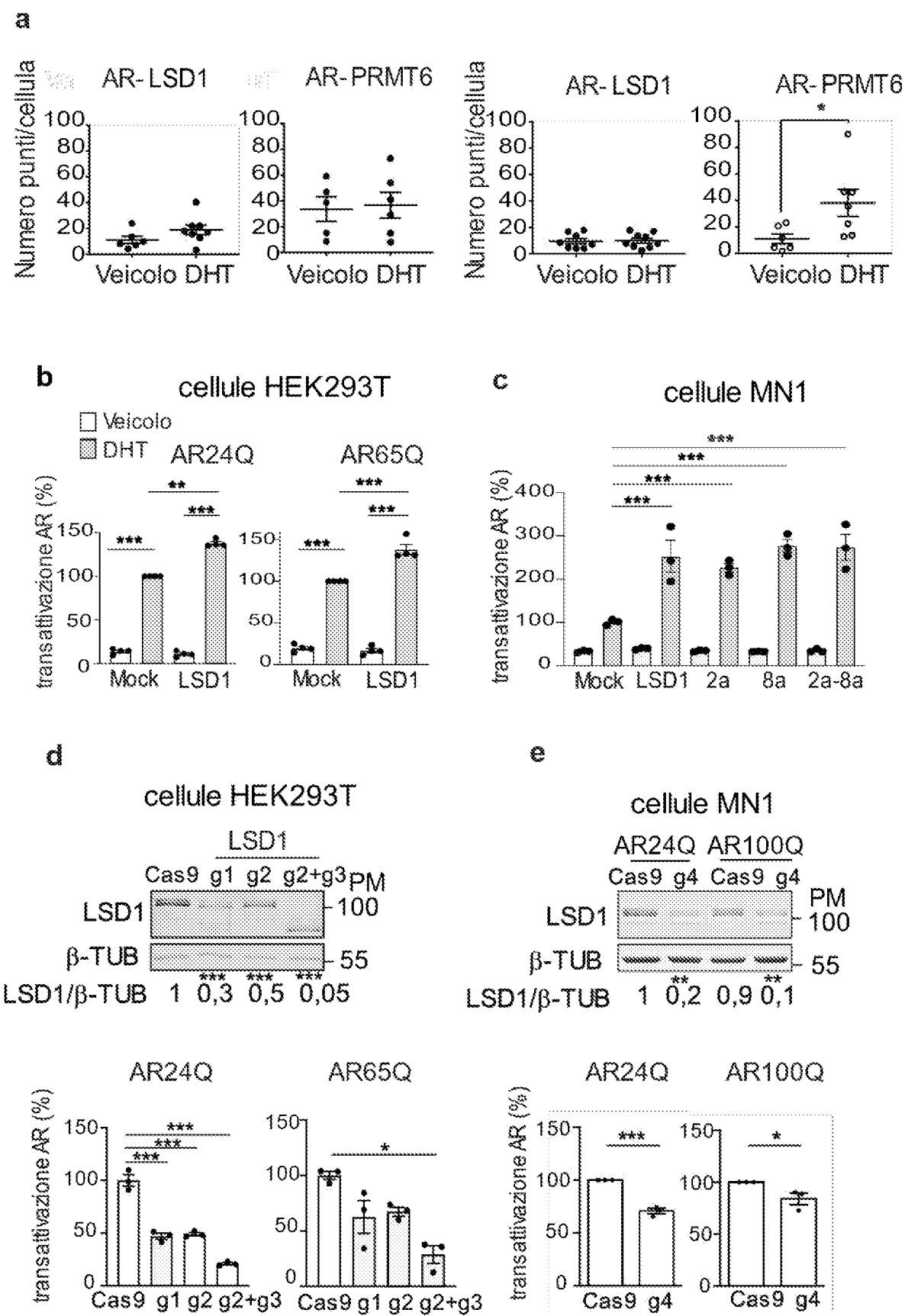


Fig. 2

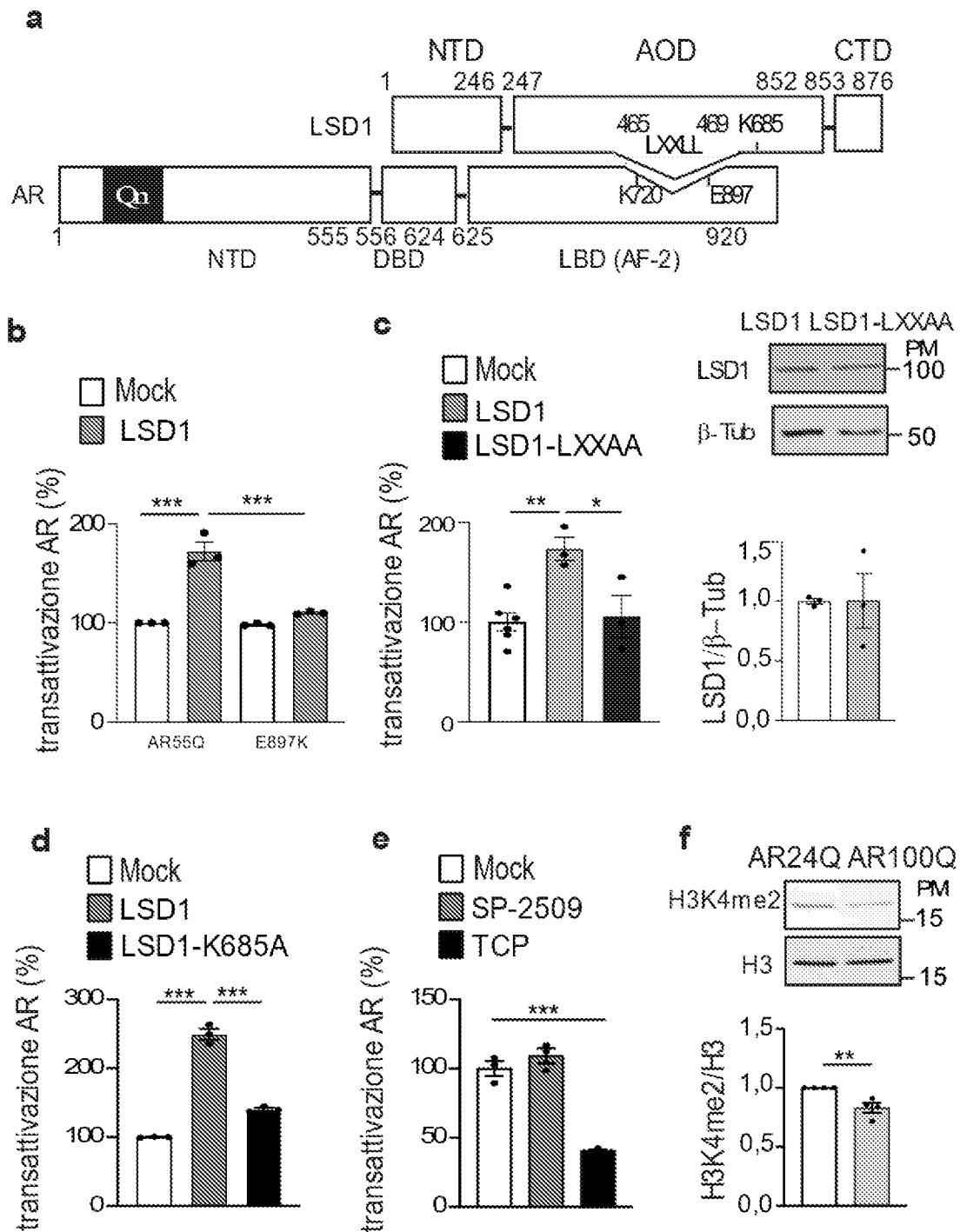


Fig. 3

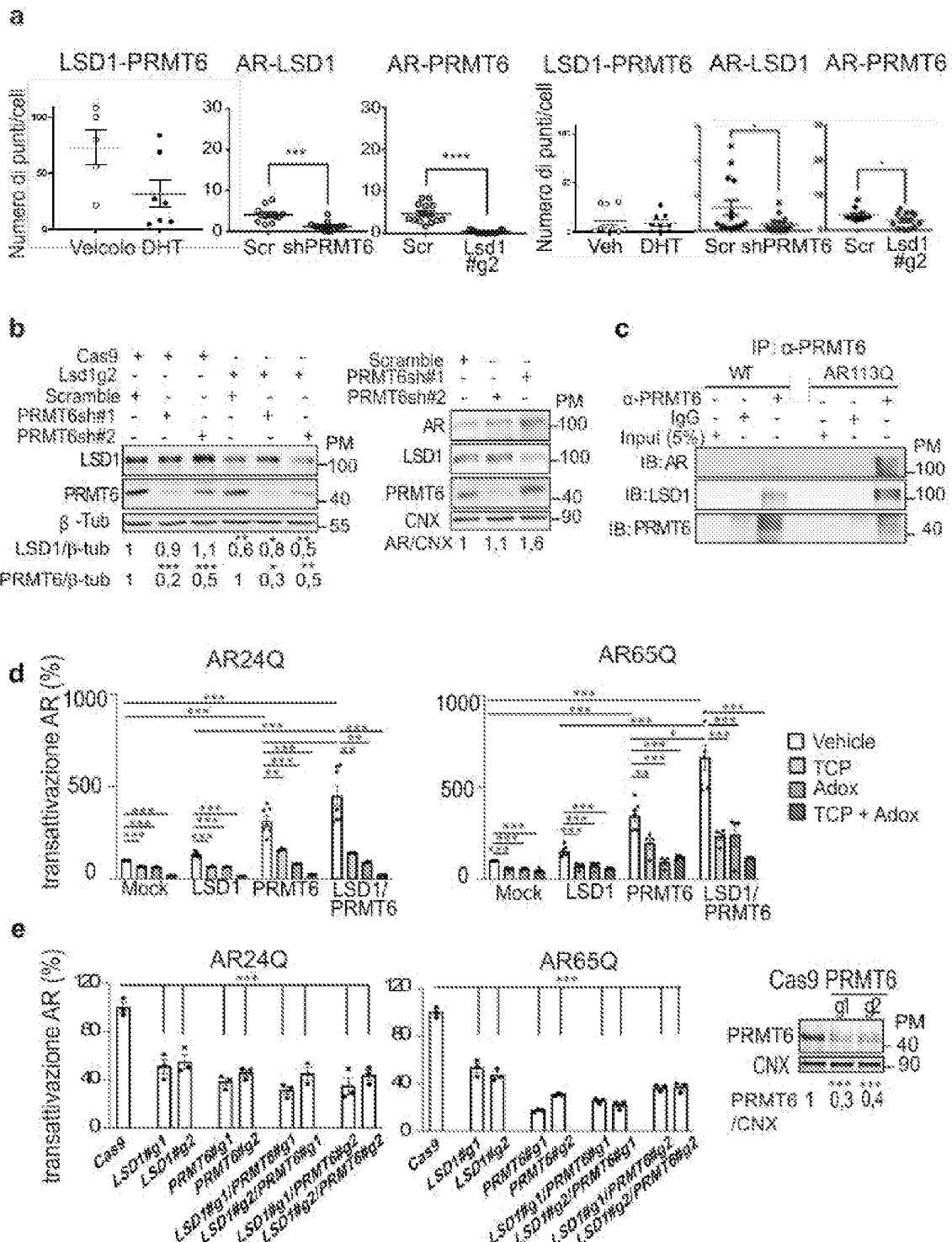


Fig. 4

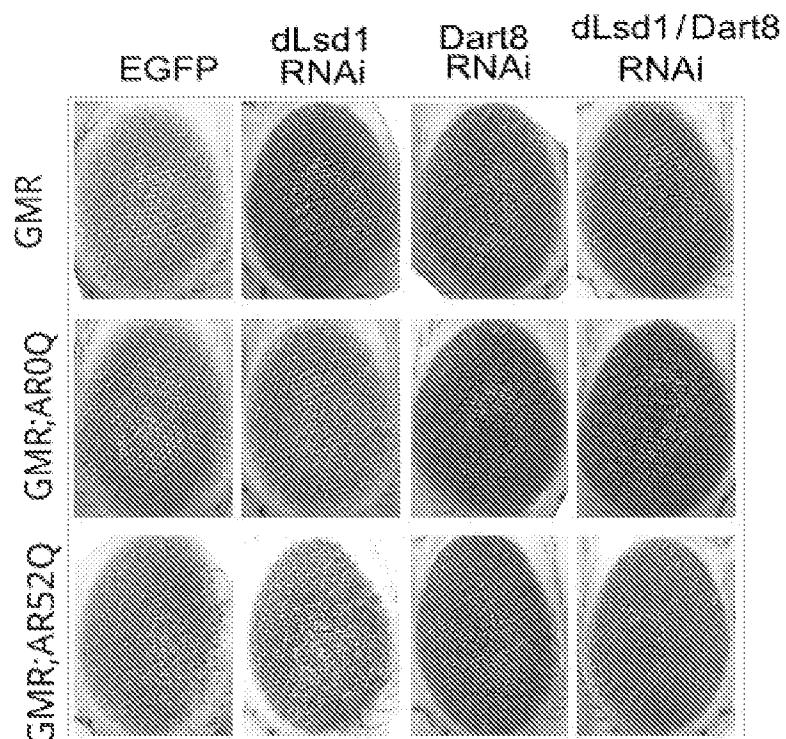
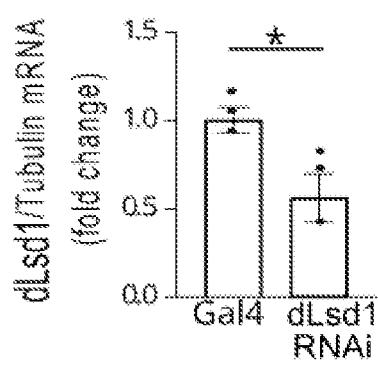
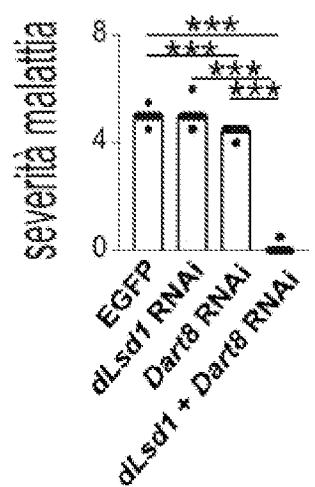
a**b****c**

Fig. 5

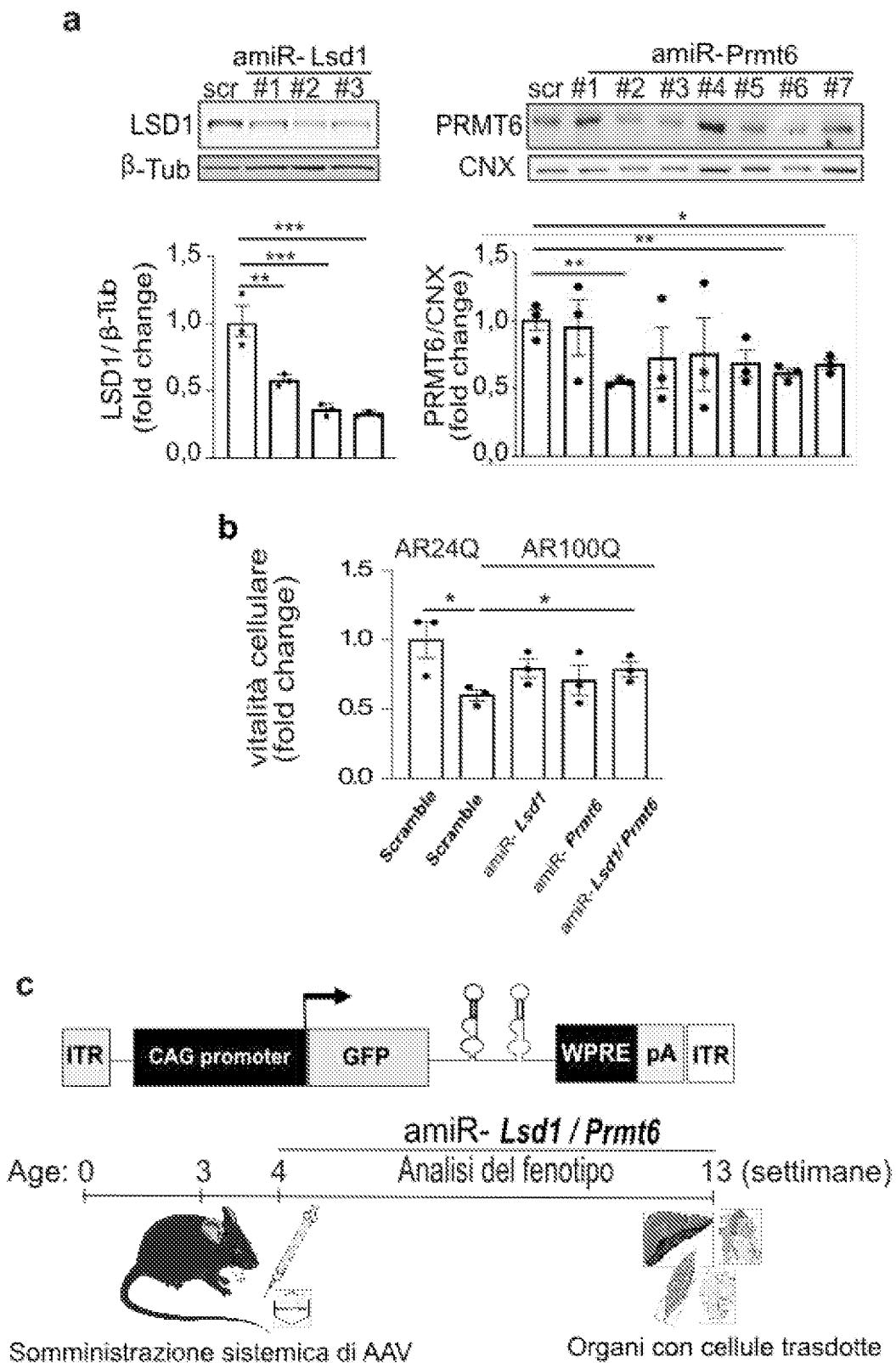


Fig. 6

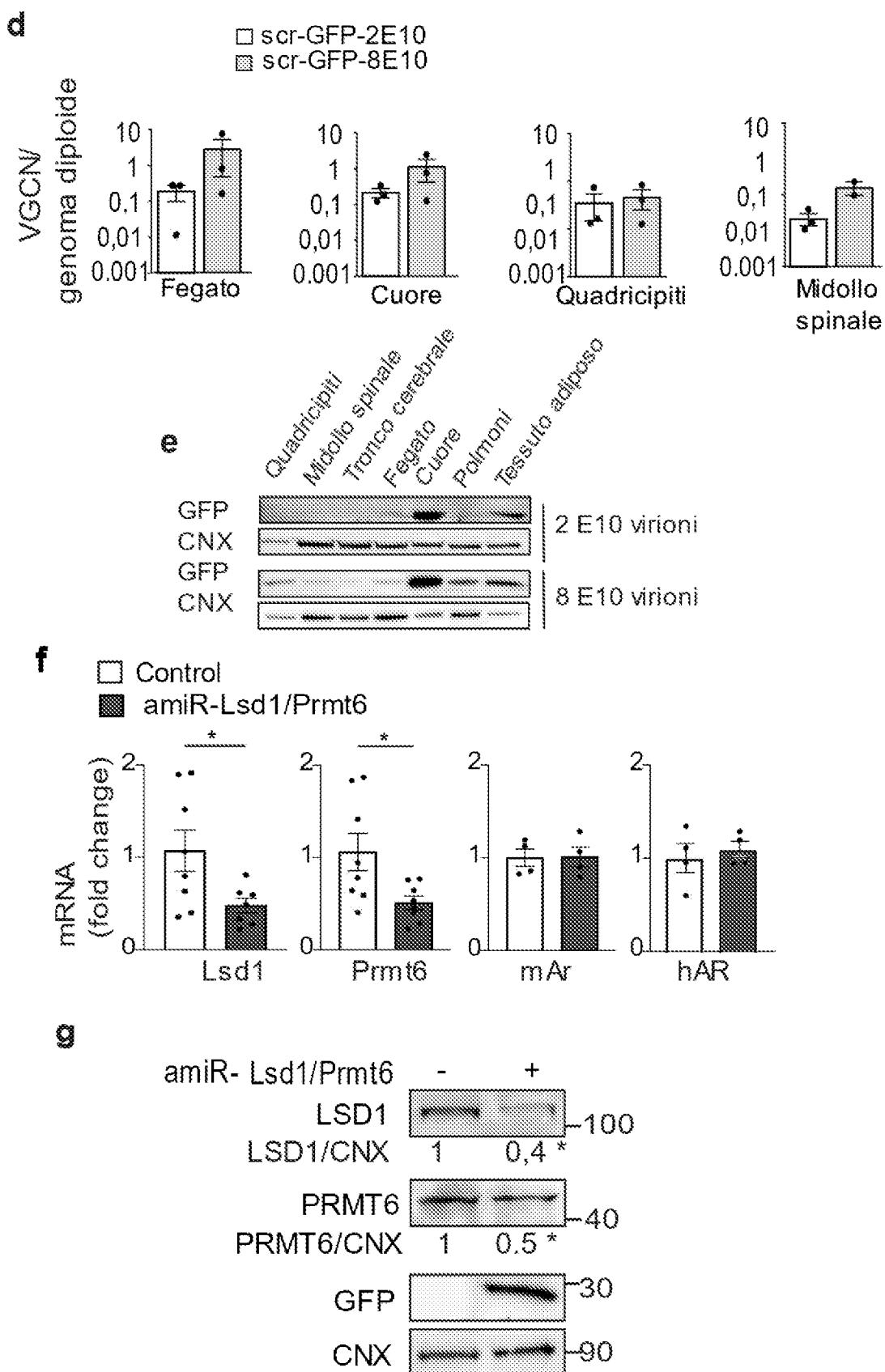


Fig. 6

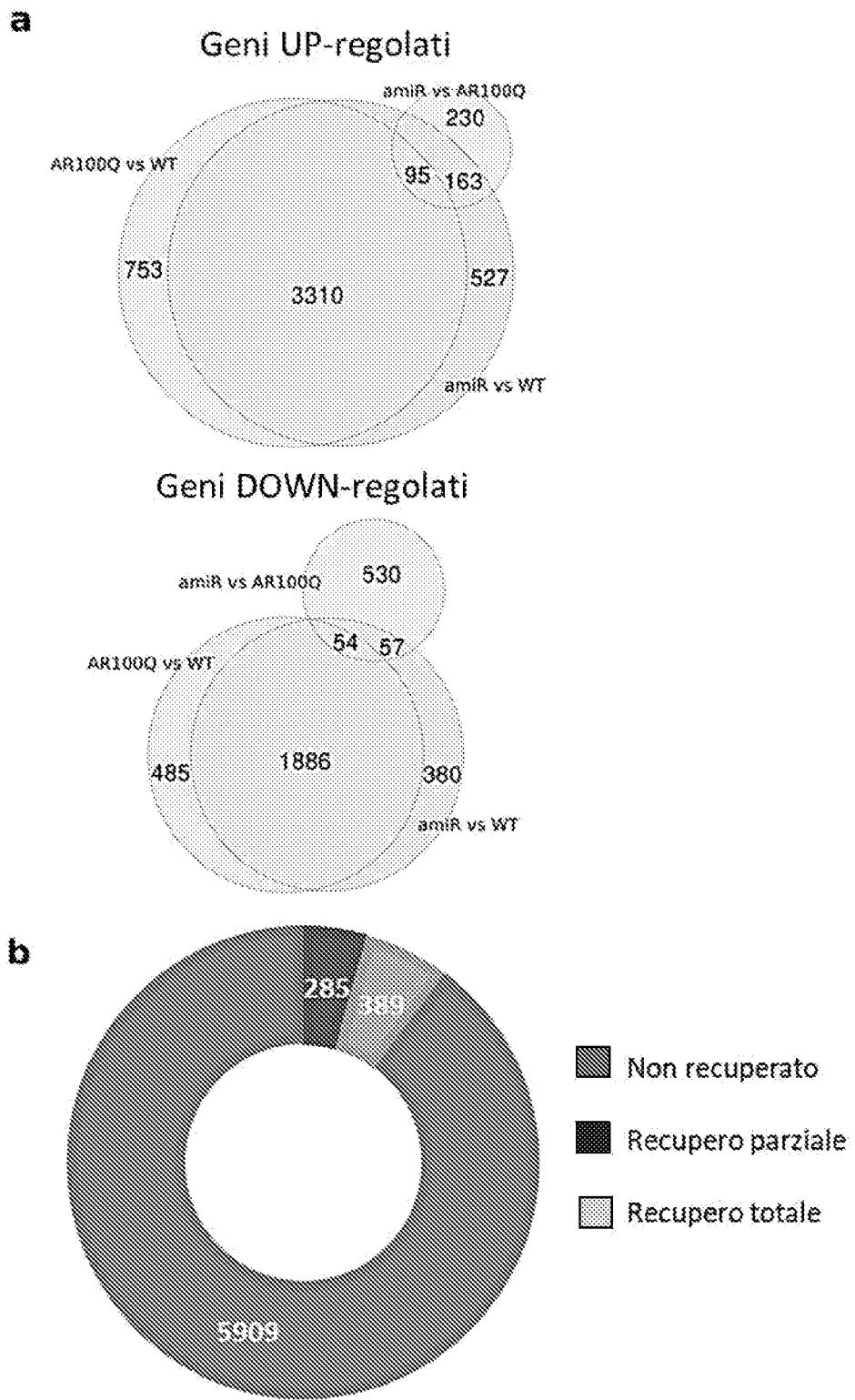


Fig. 7

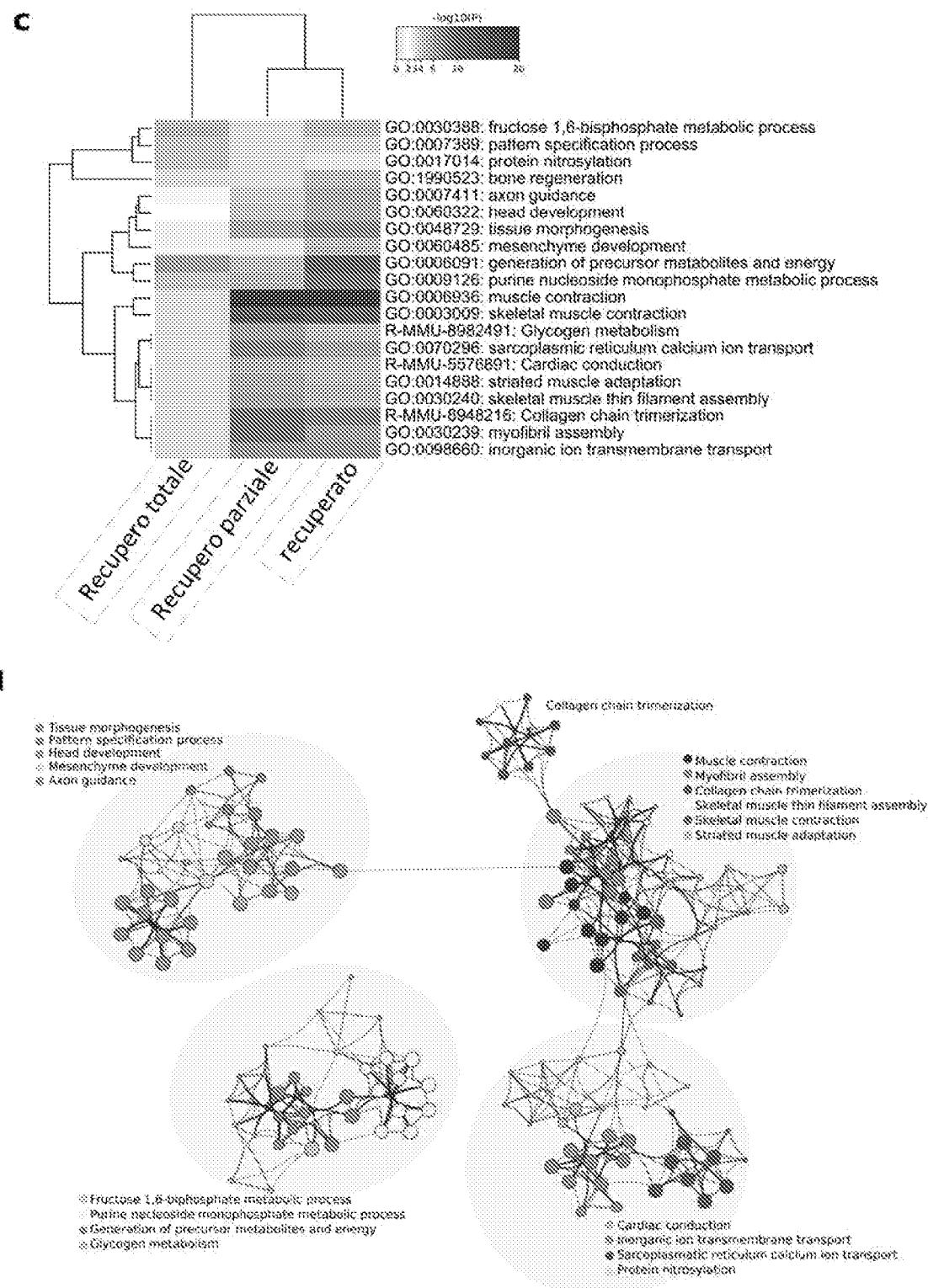


Fig. 7

11/19

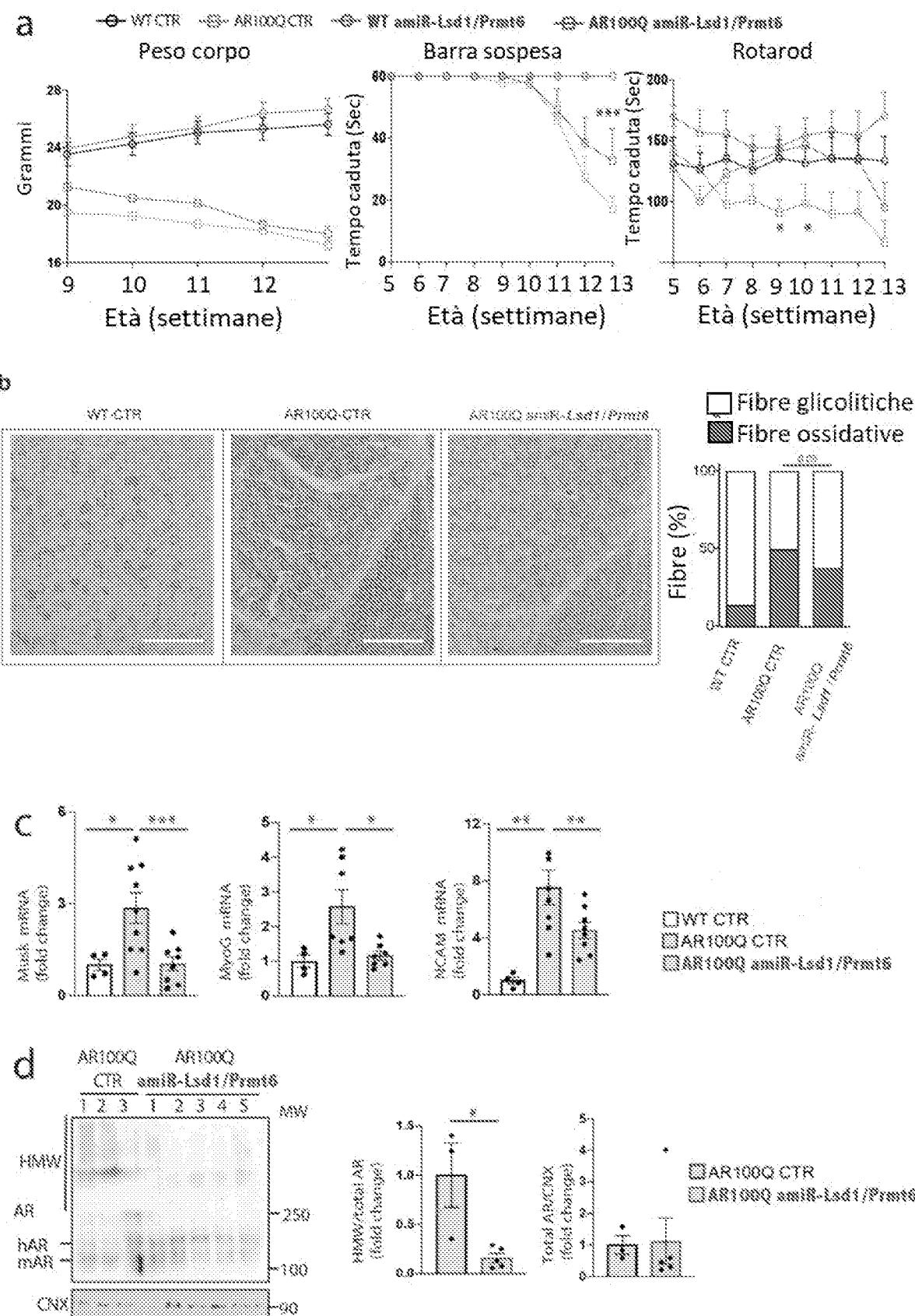


Fig. 8

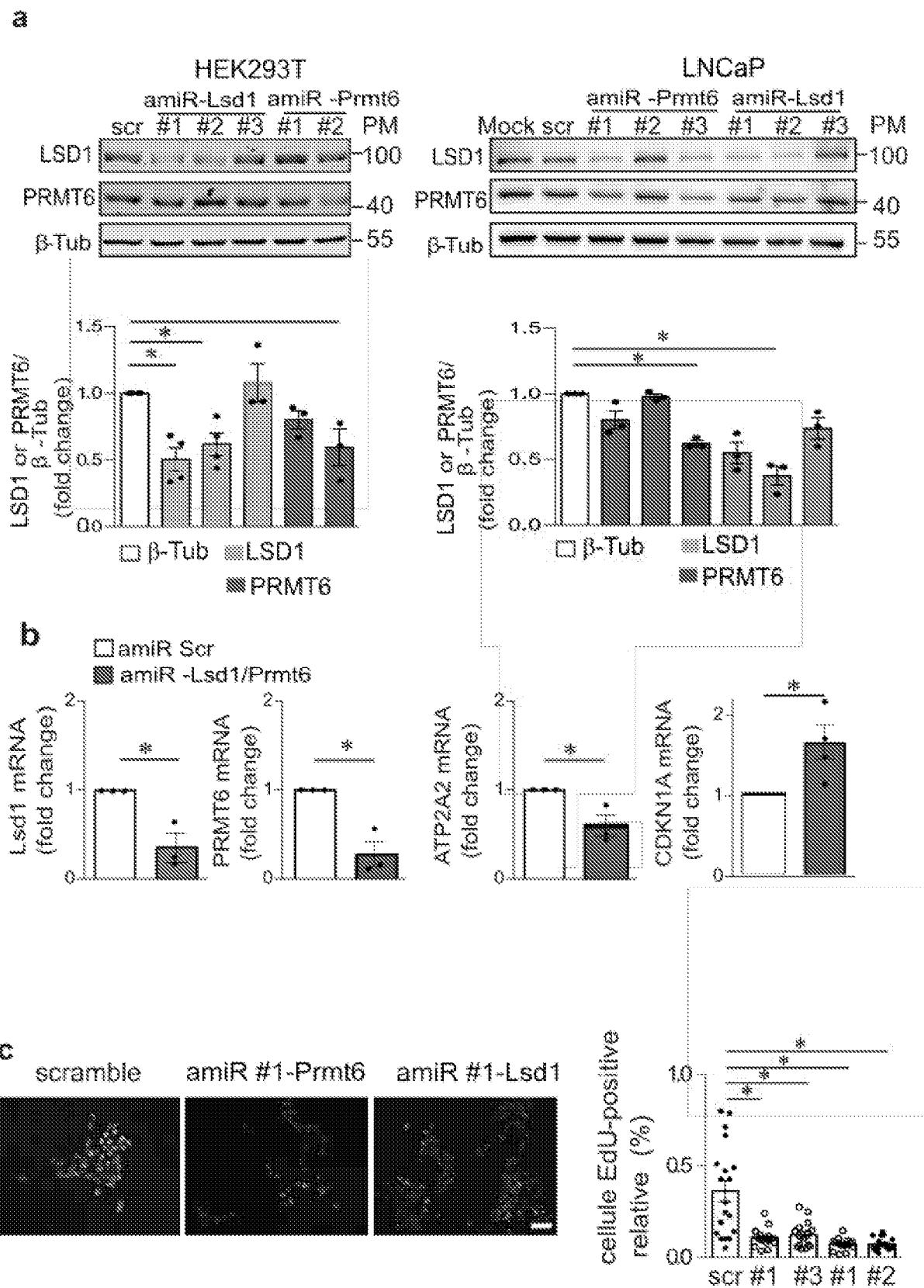


Fig. 9

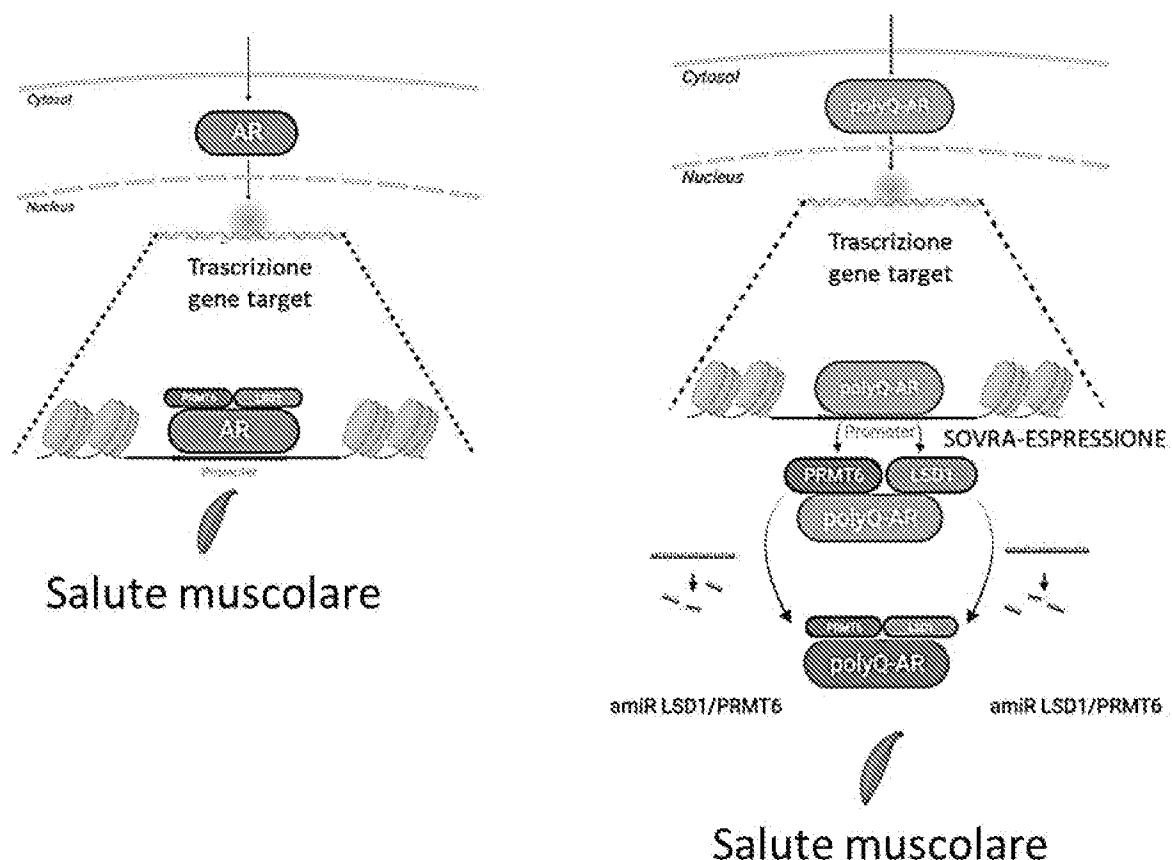


Fig. 10

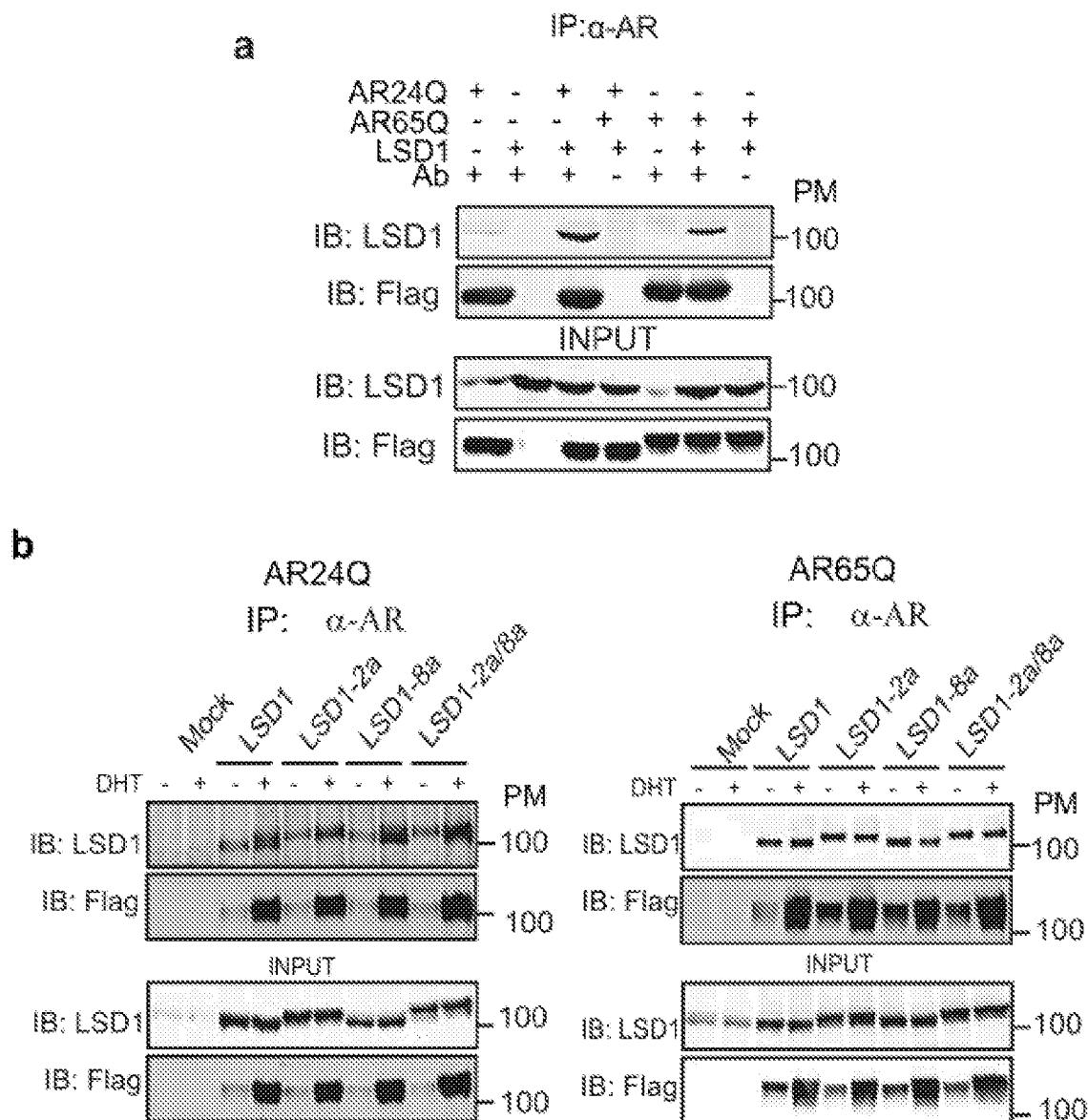


Fig. 11

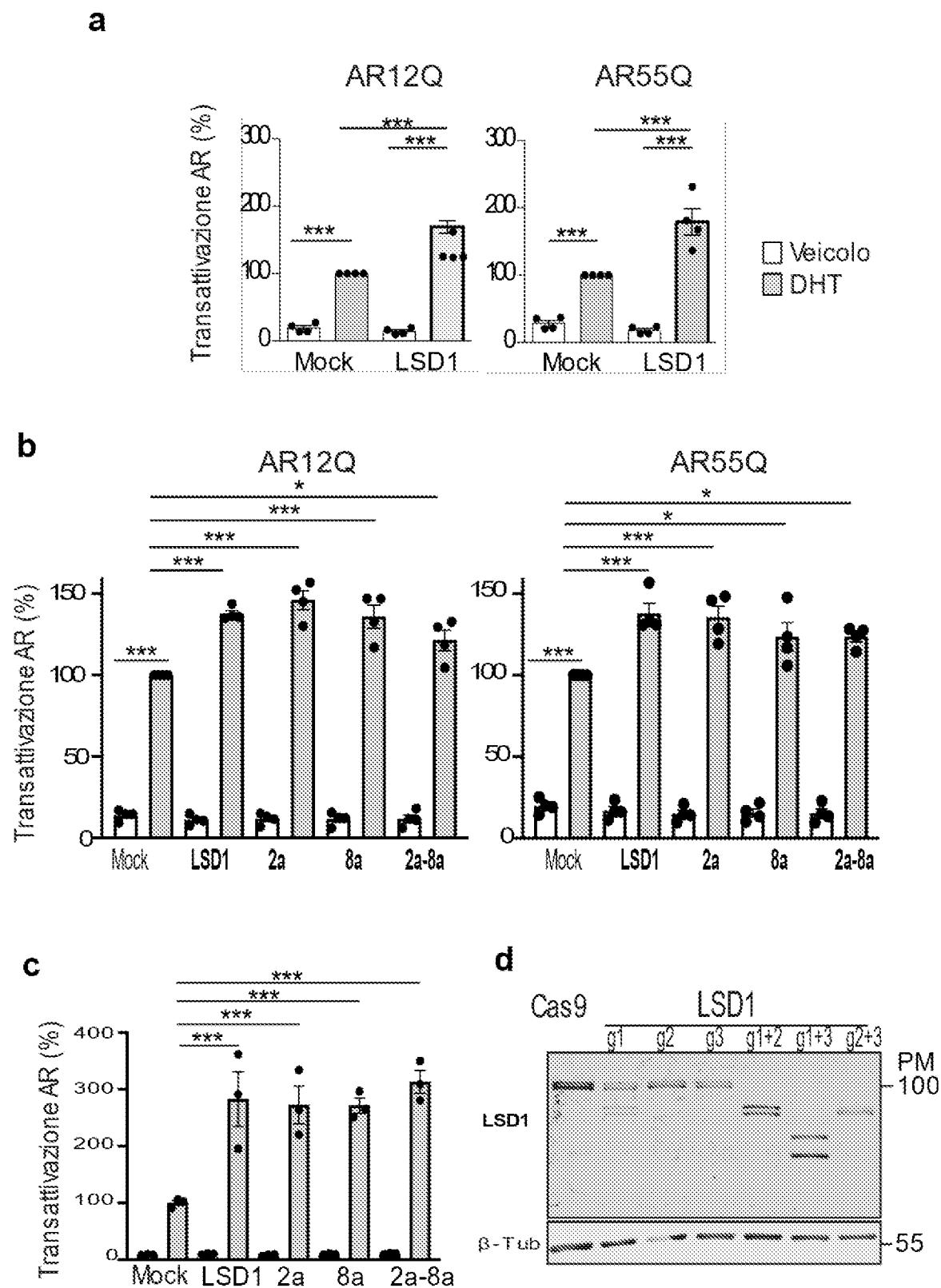


Fig. 12

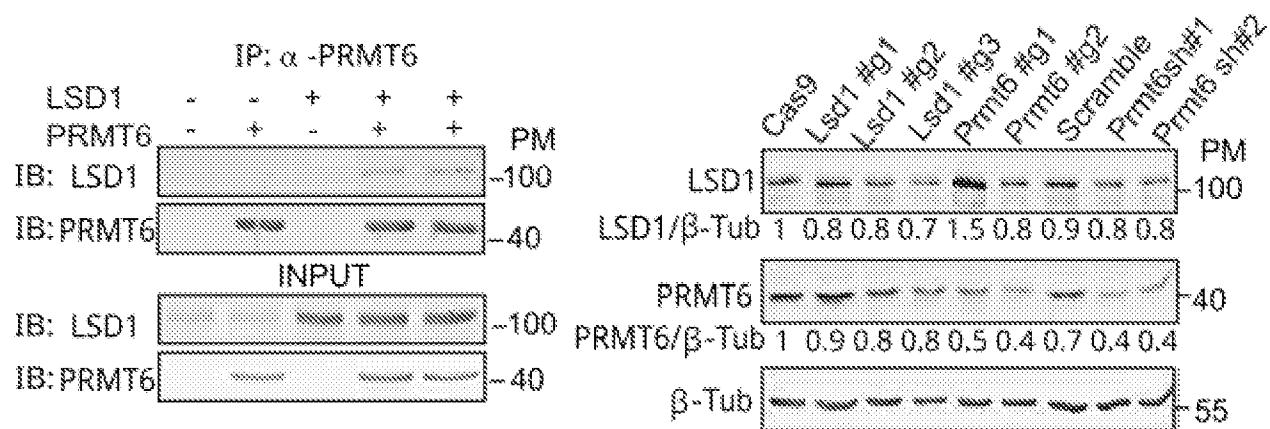
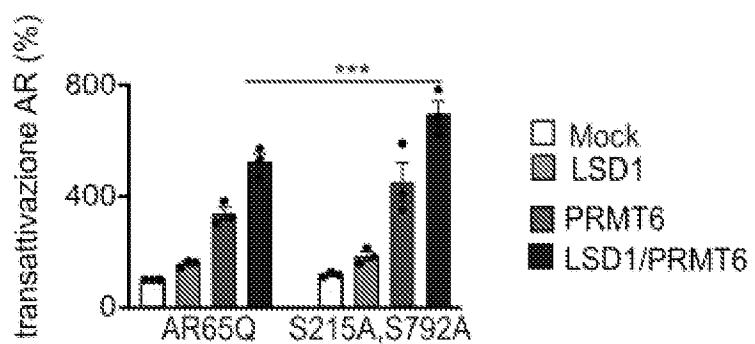
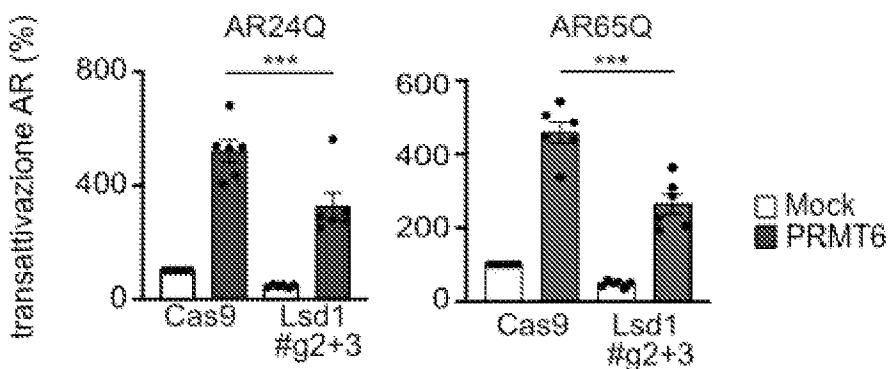
a**b****c**

Fig. 13

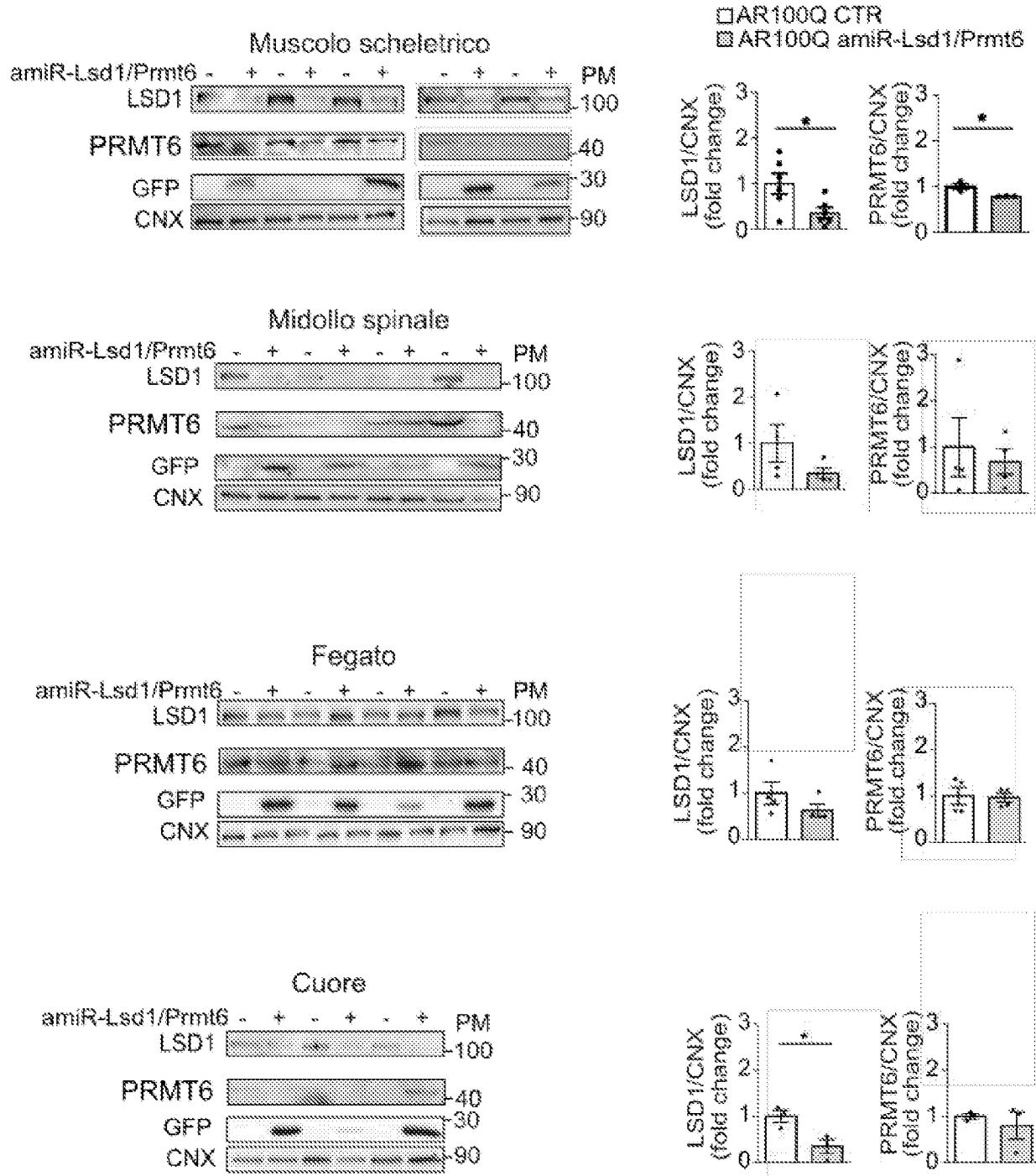


Fig. 14

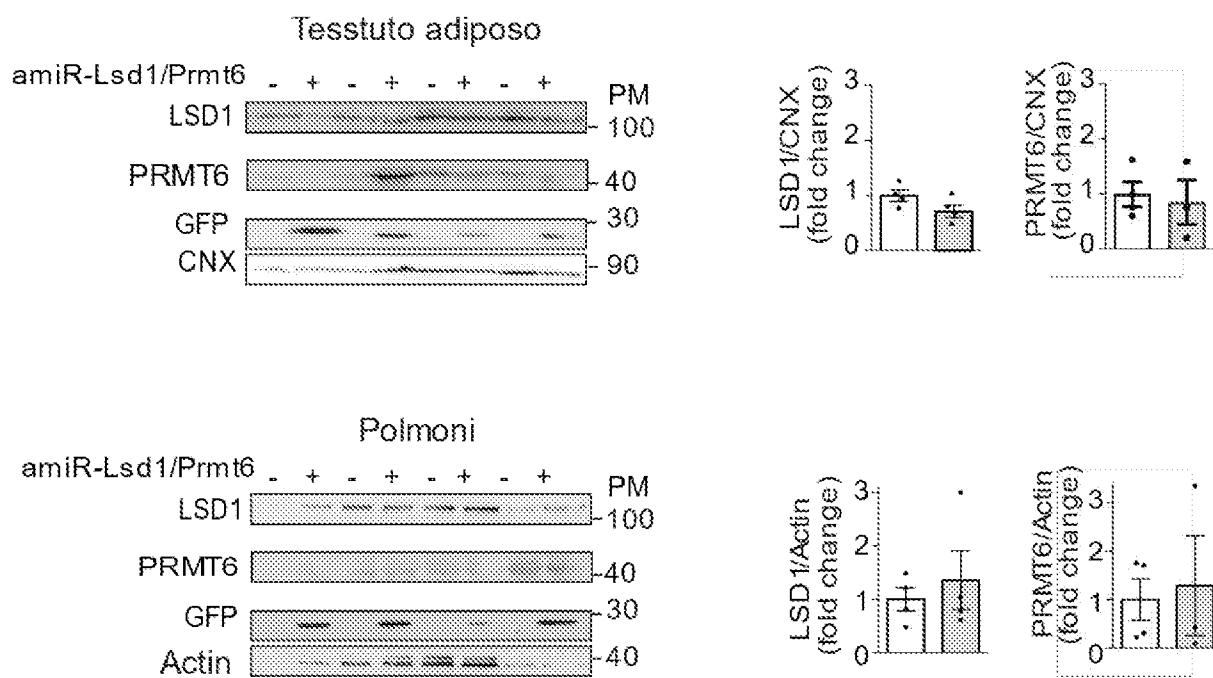


Fig. 14

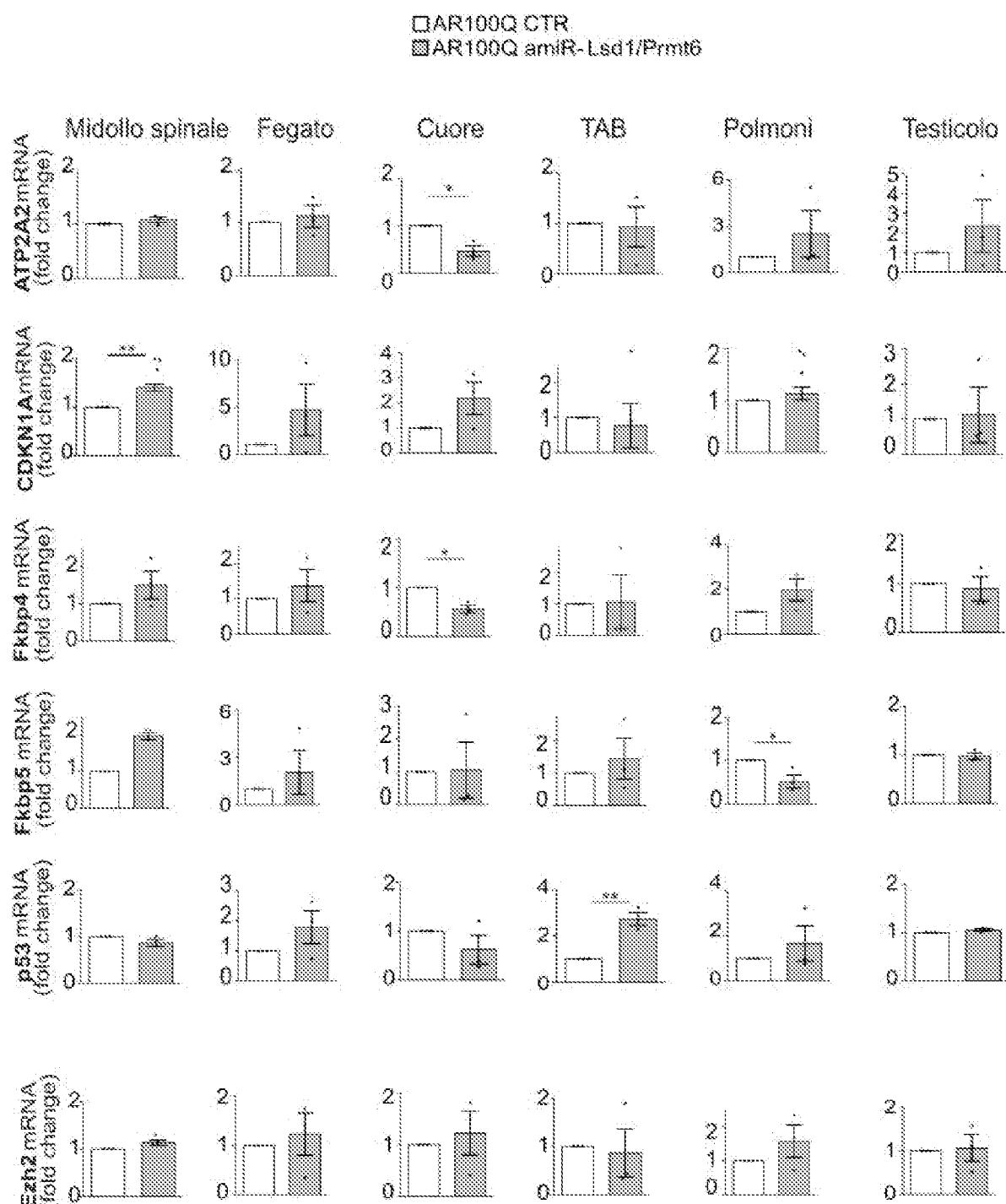


Fig. 15