



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102007901574095
Data Deposito	15/11/2007
Data Pubblicazione	15/05/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

MIRNA E SIRNA E LORO USO IN TERAPIA.

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione dal titolo:

"miRNA e siRNA e loro uso in terapia"

a nome: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"

inventori: Bozzoni Irene, Fatica Alessandro, Rosa Alessandro

La presente invenzione concerne l'uso combinato di microRNA (miRNA) e di RNA interferenti (siRNA) per l'induzione del differenziamento mieloide e per la terapia della leucemia.

STATO DELLA TECNICA

La Leucemia Mieloide Acuta (AML) è un tumore delle cellule del sangue della linea mieloide (eritrociti, granulociti, monociti, macrofagi, megacariociti e loro precursori) caratterizzato da una rapida proliferazione di cellule neoplastiche (leucemiche) che si accumulano nel midollo osseo, inibendo il differenziamento e la moltiplicazione delle cellule del sangue normali (Tenen, 2003).

La AML è la forma di leucemia più comune negli adulti. La cellula neoplastica in questa leucemia è detta mieloblasto. Nella ematopoiesi normale, il mieloblasto è un precursore che matura gradualmente in una cellula della linea mieloide. Nella AML, il mieloblasto subisce dei cambiamenti genetici che "congelano" la cellula in uno stato immaturo prevenendone il differenziamento. Esistono diverse sottoclassi di AML che possono differire enormemente tra loro. La diversità ed eterogeneità della AML deriva dal fatto che la trasformazione leucemica può avvenire durante una delle numerose fasi del differenziamento della cellula

mieloide. In molti pazienti con AML, possono essere identificate specifiche alterazioni citogenetiche, quali traslocazioni cromosomiche, che caratterizzano il determinato tipo di AML. La traslocazione cromosomica produce proteine di fusione aberranti, di solito fattori di trascrizione, le cui alterate proprietà causano o contribuiscono al blocco differenziativo. Ad esempio, nella leucemia promielocitica acuta (APL), la traslocazione t(15;17) produce una proteina di fusione tra PML (fattore di trascrizione) ed il recettore dell'acido retinoico ($RAR\alpha$), in grado di legare specifiche sequenze sui promotori di geni mieloidi-specifici riconosciuti da $RAR\alpha$ con conseguente inibizione del differenziamento mieloide. Le AML sono classificate secondo il sistema Francese-Americano-Britannico (FAB) attraverso la caratterizzazione morfologica delle cellule neoplastiche al microscopio e/o specifiche analisi citogenetiche per evidenziare le anomalie cromosomali. Il sistema FAB classifica le AML in otto sottotipi, da M0 a M7, a seconda della cellula da cui deriva il blasto leucemico ed il suo grado di maturità (M0, Indifferenziata; M1, Mieloblastica indifferenziata; M2, Mieloblastica differenziata; M3, Promielocitica; M4, Mielo-monocitica; M5, Monocitica; M6, Eritroblastica; M7, Megacariocitica).

Alcuni sottotipi di leucemie sono resistenti ad ogni tipo di trattamento farmacologico.

La "RNA interference" (RNAi) è un meccanismo di regolazione dell'espressione genica mediante il quale piccole molecole di RNA interferenti (siRNA), tipicamente lunghe 21-23 nt, sono in grado di inibire l'espressione di specifici RNA messaggeri (mRNA) contenenti sequenze nucleotidiche perfettamente complementari all'siRNA (Scherr and Eder,

2007). Anche i microRNA (miRNA) appartengono alla classe dei piccoli RNA non codificanti. Essi sono prodotti da geni cellulari e regolano negativamente l'espressione genica attraverso l'inibizione traduzionale dell'mRNA bersaglio (Bartel, 2004). Essi svolgono funzioni cruciali nello sviluppo, differenziamento, proliferazione, apoptosi ed altri importanti processi cellulari. A differenza degli siRNA, che riconoscono sequenze perfettamente complementari su mRNA bersaglio e ne dirigono la degradazione, i miRNA riconoscono le sequenze target, che sono localizzate nella regione non tradotta al 3' (3'-UTR) degli mRNA, mediante appaiamenti imperfetti. A parte queste differenze, gli siRNA ed i miRNA sono simili in termini di caratteristiche molecolari, biogenesi e funzioni effettrici (Scherr and Eder, 2007). Similmente agli siRNA, anche i miRNA possono essere somministrati alla cellula mediante molecole sintetiche di RNA a doppio filamento (dsRNA), o prodotti dalla cellula con cassette di espressione a DNA.

La specificità e l'efficacia del meccanismo della RNAi ne fanno un valido strumento per l'inibizione dell'espressione genica, sia in colture cellulari che in organismi viventi. Diversi studi hanno dimostrato che gli siRNA sono ben tollerati ed hanno proprietà farmacocinetiche adatte all'utilizzo *in vivo* (Kim and Rossi, 2007). Per questo motivo è sentita l'esigenza di individuare siRNA che possano essere molecole farmacologiche.

Per quanto riguarda i miRNA, la loro utilità nel trattamento di specifiche malattie non è ancora dimostrata e, per ora, il loro utilizzo è confinato alla diagnosi di specifiche classi di tumore. Le terapie per il cancro basate su RNA presentano, inoltre, notevoli vantaggi rispetto alle classiche terapie farmacologiche: sono versatili, grazie alla buona predizione

dell'interazione tra RNA e substrato da inibire; sono efficaci, in quanto agiscono a stadi precoci dell'espressione genica (mRNA); assicurano alta specificità con bassa complessità, in considerazione che molecole di circa 20 nucleotidi sono sufficienti a conferire una specificità di interazione; ed infine, presentano minore tossicità rispetto alle terapie convenzionali contro i tumori.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione concerne piccoli RNA, siRNA e miRNA per l'induzione del differenziamento mieloide e per il trattamento delle AML. In particolare, gli siRNA agiscono contro specifici prodotti di fusione da traslocazione cromosomica, o contro proteine note per contrastare specifici pathway di differenziamento mieloide. I miRNA sono specificamente coinvolti nel differenziamento dei mielociti e/o in grado di contrastare la proliferazione neoplastica. L'invenzione concerne l'uso combinato di miRNA e siRNA e rappresenta una strategia terapeutica alternativa a quella odierna che fa uso di farmaci a largo spettro di azione. Questa strategia è particolarmente efficace per alcuni sottotipi di leucemie, resistenti ad ogni tipo di trattamento farmacologico.

I vari siRNA sono combinati tra loro e/o con miRNA con ruoli specifici nell'ematopoesi (es. miR-223 e miR-424), o nella proliferazione neoplastica (es. miR-34; He et al., 2007). In molti tipi di cancro si osserva una riduzione di miRNA che possono avere una funzione intrinseca di soppressori tumorali. Uno dei miRNA recentemente caratterizzato come potente soppressore tumorale in molti tipi di tumore è miR-34 (He et al., 2007). Numerosi studi hanno dimostrato l'attivazione di miR-34 da parte della proteina p53 e, soprattutto, il fatto che l'attivazione di miR-34 può

restaurare in parte l'azione di p53 stessa, nell'indurre l'arresto del ciclo cellulare e nel promuovere l'apoptosi.

Pertanto sono incluse tutte le possibili combinazioni tra i seguenti miRNA e siRNA:

miR-223, miR-424 e miR34;

siNFIA , siSUZ12, siPML/RAR α e siAML1/ETO

La presente invenzione concerne anche la sovra-espressione di NFIA per modulare il differenziamento mieloide. NFIA, essendo un modulatore della mielopoiesi, può essere sovra-espresso o inibito per ottenere un effetto differenziativo specifico verso le diverse linee mieloidi.

Per facilitare la co-espressione di miRNA ed siRNA, gli autori hanno sviluppato cassette di espressione dicistroniche sotto il controllo del promotore di U1 che consentono l'espressione di coppie di miRNA/siRNA simultaneamente. In questi vettori, le coppie di siRNA/miRNA sono clonate all'interno geni dicistronici di miRNA umani, in cui la sequenza dei miRNA è sostituita con quella di interesse. Tali cassette potranno essere anche utilizzate in vettori lentivirali per esperimenti di trasduzione.

L'espressione dei miRNA/siRNA è stata esaminata con analisi Northern, lo spegnimento dei geni bersaglio per analisi Western, mentre il livello di differenziamento in assenza di agenti inducenti è stato analizzato attraverso analisi morfologiche ed immunochimiche (Fazi et al., 2005). Il gene GFP presente nel vettore lentivirale ha consentito, inoltre, l'isolamento delle cellule infettate.

Oltre all'utilizzo di vettori lentivirali, il cui genoma si va ad integrare nel DNA della cellula ospite, si possono anche utilizzare altri tipi di vettori virali episomali (es. AAV) e RNA sintetici.

Per ottenere una somministrazione cellula-specifica, è possibile utilizzare anticorpi contro antigeni specifici (ad esempio CD33 per i blasti mieloidi) coniugati agli RNA sintetici.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione l'uso di almeno un miRNA e di almeno un siRNA, o di almeno due miRNA, o di almeno due siRNA per la preparazione di un medicamento per l'induzione del differenziamento mieloide o per il trattamento della leucemia mieloide acuta in cui il miRNA è in grado di modulare il differenziamento mieloide e/o di agire come oncosoppressore, e lo siRNA è in grado di modulare il differenziamento mieloide o di inibire l'espressione di un prodotto di fusione derivante da una traslocazione cromosomica associata alla leucemia.

In una forma di attuazione, il miRNA è in grado di modulare il differenziamento granulocitario, preferibilmente è il miR-223.

In una forma di attuazione, il miRNA è in grado di modulare il differenziamento monocitario e/o macrofagico, preferibilmente è il miR-424.

In una forma di attuazione il miRNA oncosoppressore è miR-34.

In una forma di attuazione lo siRNA inibisce l'espressione di NFIA o di SUZ12.

In una forma di attuazione il siRNA in grado di inibire l'espressione di un prodotto di fusione derivante da una traslocazione cromosomica associata alla leucemia è un siRNA contro PML/RARa o contro AML1/ETO.

In una forma di attuazione il medicamento comprende un primo miRNA in grado di modulare il differenziamento mieloide, un secondo miRNA oncosoppressore e un siRNA come sopra definiti.

In una forma di attuazione il medicamento è in forma di nanocapsule.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un vettore d'espressione in grado di esprimere in una cellula ospite simultaneamente gli miRNA e siRNA come sopra descritti. Preferibilmente le sequenze codificanti per i miRNA e per gli siRNA sono sotto il controllo del promotore di U1 RNA.

In una forma di attuazione il vettore è utilizzato per indurre il differenziamento mieloide o per terapia genica.

L'invenzione verrà descritta in esempi esplicativi con riferimento alle seguenti figure:

Figura 1. Cellule NB4 sono state infettate con vettori lentivirali esprimenti: 1, nessun piccolo RNA (Vettore); 2, miR-223 (Lenti-223); 4, siRNA contro il "nuclear factor I-A", NFI-A (Lenti-siNFIA), 3, la combinazione dei due precedenti. I marcatori CD14 (A) e CD11b (B) sulle cellule positive alla GFP sono stati analizzati a vari giorni dall'infezione ed analizzati con FACS; i valori riportati indicano l'induzione nelle cellule infettate rispetto a quelle non trattate con il lentivirus.

Figura 2. Analisi dei livelli di miRNA mediante TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystem) su: (A) RNA totale da cellule CD34+ indotte a differenziare verso la linea monocitaria (campioni prelevati ai giorni 6 (d6) e 12 (d12) come indicati nell'istogramma), e (B) cellule primarie da pazienti APL prima (-TPA) e dopo 48 ore di trattamento con 12-O-Tetradecanoilphorbol 13-acetato (TPA), (+TPA). Le sonde utilizzate sono indicate. miR-25 è utilizzato come controllo. L'istogramma rappresenta la

media $\pm$ s.e.m da triplicati. (C) 10 μ g di RNA, da cellule NB4 non trattate (corsia 0) o trattate con TPA per i tempi indicati, sono state analizzate con Northern blot utilizzando le sonde indicate. Gli snRNA U2 e miR-25 sono stati utilizzati come controllo.

Figura 3. (A1) Cellule NB4 sono state infettate con il vettore lentivirale vuoto (Vettore) o con il lentivirus esprimente miR-424 (Lenti-424) ed incubati per 48 ore. La percentuale di cellule positive a CD11b o CD14 è indicata. L'istogramma rappresenta la media $\pm$ s.e.m da 3 replicati per ogni costrutto. (A2) L'analisi morfologica evidenzia il differenziamento delle cellule NB4 dopo 7 giorni dall'infezione con il Lenti-424. (B1) Cellule CD34⁺, indotte a differenziare verso la linea monocitaria, sono state infettate con Lenti-424 e purificate tramite GFP espressa dal lentivirus. L'espressione di CD14 come media $\pm$ s.e.m da 3 esperimenti indipendenti è rappresentata ai giorni indicati. (B2) L'analisi morfologica mostra un aumento del differenziamento in cellule trattate con Lenti-424.

Figura 4. Cellule NB4 sono state infettate con il vettore lentivirale vuoto (Vettore) o con un vettore lentivirale esprimente siRNA contro NFIA (Lenti-siNFIA). Le proteine sono state estratte 48 ore dopo l'infezione e 50 μ g analizzate mediante Western blot con anticorpi contro NFI-A e GAPDH come controllo (A). I segnali sono stati normalizzati per GAPDH ed i valori, espressi come frazioni rispetto alle cellule infettate con il vettore vuoto, sono indicati sotto le corsie. Le cellule positive a CD11b o CD14 sono state analizzate con FACS (B). L'espressione dell'mRNA di M-CSFr è stata misurata mediante qRT-PCR (C). I valori indicano l'induzione dei marcatori di cellule trattate con TPA per 48 ore rispetto a cellule non trattate.

Figura 5. Overespressione di NFI-A. (A) Rappresentazione schematica di Lenti-HA-NFIA e analisi della sua espressione ectopica in cellule NB4 mediante Western con anticorpo anti-HA. Cellule NB4 sono state infettate con il vettore vuoto (Vector) o con Lenti-HA-NFIA. Dopo l'infezione, metà della coltura è stata trattata con TPA (+TPA) e metà senza (-TPA). Le cellule sono state analizzate attraverso colorazione Wright-Giemsa per la morfologia (B), mediante FACS per l'espressione di CD14 (C) e qRT-PCR per l'espressione di M-CSFr expression (D). Gli istogrammi rappresentano la media $\pm$ s.e.m. di triplicati.

MATERIALI E METODI

Vettori per l'espressione di microRNA ed siRNA:

Il promotore ed il terminatore dell'snRNA U1 sono stati clonati all'interno del vettore pSP65 (Stratagene), i siti di restrizione KpnI e XhoI sono stati inseriti tra il promotore ed il terminatore. Le sequenze genomiche umane contenenti microRNA sono state clonate all'interno degli elementi regolativi di U1 nei siti KpnI e XhoI. Le cassette di espressione U1-microRNA sono state poi amplificate per PCR e clonate nel sito EcoRV del vettore lentivirale pRRLcPPT.hPGK.EGFP.WPRE.

Lenti-HA-NFIA

NFI-A è stata taggata all'N terminale con HA e clonata nei siti EcoRV e Sall del vettore lentivirale pCCL.sin.cPPT.PGK.mCMV.GFP.WPRE (Amendola et al., 2004) sotto il controllo del promotore PGK e del sito di poliadenilazione WPRE.

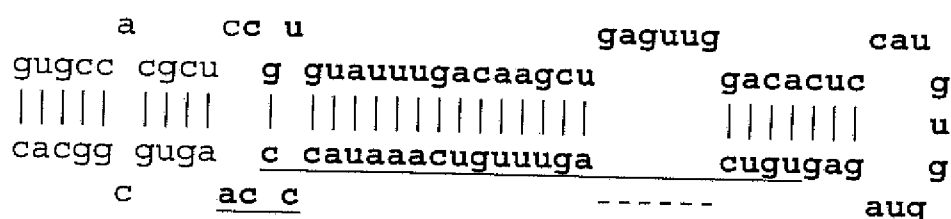
U1-miR-223

Un frammento di 260 bp di sequenza genomica umana (si veda di seguito), contenente miR-223 (nt. 143-164, sottolineato) è stato clonato tra il promotore e terminatore dell'snRNA U1. Il pre-miR-223 è indicato in grassetto (nt. 101-164) con le sequenze genomiche fiancheggianti al 5' ed al 3'.

```

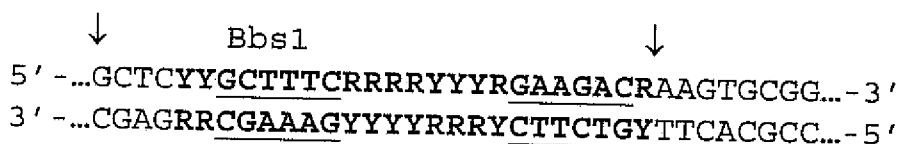
ATCATTCTTTCTCTCTCTTTCCCTCTAGGGTCACATCTCCCAGGAAGAT 50
CTCACTTCCCCACAGAAGCTCTTGGCCTGGCCTCCTGCAGTGCCACGCTC 100
CGTGTATTTGACAAGCTGAGTTGGACACTCCATGTGGTAGAGTGTCAAGTT 150
TGTCAAATACCCCAAGTGCGGCACATGCTTACCAGCTCTAGGCCAGGGCA 200
GATGGGATATGACGAATGGACTGCCAGCTGGATACAAGGATGCTCACCAA 250
GCACCAAGTT 260
  
```

La struttura del pre-miR-223 è illustrata di seguito (sottolineato il miR-223 maturo):



pMC2

Per la produzione di siRNA a partire dal pre-miRNA di miR-223, gli autori hanno costruito un vettore (pMC2) in cui il pre-miR-223 è stato sostituito con una cassetta (in grassetto) contenente i siti di restrizione per l'enzima Bbs1 (sottolineato), lasciando inalterate le sequenze genomiche fiancheggianti. I tagli dell'enzima sono evidenziati nello schema seguente da frecce.



$\uparrow$
Bbs1
 $\uparrow$

$N=A+C+G+T$; $R=A+G$; $Y=C+T$

La cassetta digerita con BbsI consente l'inserimento di pre-miRNA artificiali ottenuti mediante appaiamento di oligonucleotidi sintetici, disegnati partendo dalla struttura secondaria del pre-miR-223.

La struttura del pre-miRNA (in grassetto) per la produzione di siRNA/miRNA (sottolineato) è illustrata nello schema seguente.

a	NN N		gaguug	cau
gugcc	cgcu	N NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNcuc	g
				u
cacgg	guga	N NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNgag	g
c	<u>NN N</u>		-----	aug

$$N=A+C+G+T$$

Schema degli oligonucleotidi per il clonaggio degli siRNA/miRNA

Oligo senso:

GCTCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGAGTTGNNNNCTCCATGTGGTAGAGNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNA

Oligo antisenso:

CACTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTCTACCACATGGAGNNNNCAACTC
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

U1-miR-424:

Un frammento di 260 bp di sequenza genomica umana (si veda di seguito), contenente miR-424 (nt. 92-113, sottolineato) è stato clonato tra il promotore e terminatore dell'snRNA U1.

GGGGTGGGGCGGGGCTTCCTTCAGTCATCCAGTCTTTATTACCCGCAGG 50
TACCCCCAGATCGATCCCCCTTCATTGACTCCGAGGGGATACAGCAGCAA 100
TTCATGTTTTGAAGTGTTCTAAATGGTTCAAAACGTGAGGCGCTGCTATA 150

CCCCCTCGTGGGGAAGGTAGAAGGTGGGGTCTGCCGGACGCGTGTTCTTG 200
CCACCAGGTGCCCCGCTCCCCGCGAGGCCGGCTCAGGAGCAGGTAGGTGGG 250
CGGGGGCTCG 260

U1-miR-34a:

Un frammento di 260 bp di sequenza genomica umana (si veda di seguito), contenente miR-34a (sottolineato) è stato clonato tra il promotore e terminatore dell'snRNA U1.

CATTTCTTCTTATCAACAGGTGCTGGGGAGAGGCAGGACAGGCCTGTCC 50
CCCGAGTCCCCTCCGGATGCCGTGGACCGGCCAGCTGTGAGTGTTCTTT 100
GGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTTGTGAGCAATAGTAAGGAAGCAATCAGCA 150
AGTATACTGCCCTAGAAGTGCTGCACGTTGTGGGGCCCAAGAGGGAAGAT 200
GAAGCGAGAGATGCCCAGACCAGTGGGAGACGCCAGGACTTCGGAAGCTC 250
TTCTGCGCCA 260

Sequenze di oligo utilizzati per la produzione di siRNA specifici:

siRNA contro NFIA: 5' -TGTTTTGACAGAACTGACAG-3'

siRNA contro PML/RARa: 5' -TCTCAATGGCTGCCTCCCCGGG-3'

siRNA contro SUZ12: 5' -AGCTGTTACCAAGCTCCGTGA-3'

siRNA contro AML1/ETO: 5' -CCUCGAAAUCGUACUGAGAAG-3'

Sequenza Tandem miR-34/miR-223

Le sequenze genomiche di miR-34a (in corsivo) e miR-223 sono state fuse e clonate tra il promotore e terminatore di U1.

CATTTCTTCTTATCAACAGGTGCTGGGGAGAGGCAGGACAGGCCTGTCC 50
CCCGAGTCCCCTCCGGATGCCGTGGACCGGCCAGCTGTGAGTGTTCTTT 100
GGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTTGTGAGCAATAGTAAGGAAGCAATCAGCA 150
AGTATACTGCCCTAGAAGTGCTGCACGTTGTGGGGCCCAAGAGGGAAGAT 200
GAAGCGAGAGATGCCCAGACCAGTGGGAGACGCCAGGACTTCGGAAGCTC 250
TTCTGCGCCAATCATTCTTTCTCTCTTTCCCTCTAGGGTCACATCTC 300
CCAGGAAGATCTCACTTCCCCACAGAAGCTCTTGCCCTGGCCTCCTGCAG 350

TGCCACGCTCCGTGTATTTGACAAGCTGAGTTGGACACTCCATGTGGTAG 400
AGTGTCAAGTTTGTCAAATACCCCAAGTGCGGCACATGCTTACCAGCTCTA 450
GGCCAGGGCAGATGGGATATGACGAATGGACTGCCAGCTGGATAACAAGGA 500
TGCTCACCAAGCACCAAGTT 520

Sequenza tandem per espressione di ncRNA (microRNA e siRNA)
generici

CATTTCTTCTTATCAACAGGTGCTGGGGAGAGGCAGGACAGGCCTGTCC 50
CCCGAGTCCCCTCCGGATGCCGTGGACCGGCCAGCTGTGAGTGTTTCTTT 100
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGTGAGCAATAGTAAGGAAGNNNNNNNNNN 150
NNNNNNNNNNNNNNNAGAAGTGCTGCACGTTGTGGGGCCCAAGAGGGAAGAT 200
GAAGCGAGAGATGCCCAGACCAGTGGGAGACGCCAGGACTTCGGAAGCTC 250
TTCTGCGCCAATCATTCCTTTCTCTCTCTTTCCCTCTAGGGTCACATCTC 300
CCAGGAAGATCTCACTTCCCCACAGAAGCTCTTGGCCTGGCCTCCTGCAG 350
TGCCACGCTCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAGAGTTGGNNNNNTCCATGTGGTAG 400
AGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAGTGCGGCACATGCTTACCAGCTCTA 450
GGCCAGGGCAGATGGGATATGACGAATGGACTGCCAGCTGGATAACAAGGA 500
TGCTCACCAAGCACCAAGTT 520

Questo vettore bicistronico consente l'espressione di qualsivoglia
combinazione di miRNA e siRNA.

Le sequenze di controllo miR-25 e snRNA U2 utilizzate sono descritte in
Fazi et al., 2005.

Colture cellulari, infezione ed analisi immunofenotipiche

La linea cellulare NB4 e le cellule CD34+ sono state mantenute in coltura
secondo protocolli standard precedentemente descritti (vedi Fazi et al.,
2005). La preparazione e l'infezione di lentivirus sono state eseguite come
descritto (Fazi et al., 2005). Il differenziamento cellulare è stato analizzato
mediante colorazione diretta immunofluorescente con specifici anticorpi e
citometria a flusso secondo procedure standard (Fazi et al., 2005).

RISULTATI

Induzione del differenziamento granulocitario mediante l'uso combinato di miR-223 e siRNA contro NFIA

L'espressione differenziale dei miRNA nei diversi stadi dell'ematopoiesi suggerisce un loro ruolo nel differenziamento delle cellule del sangue (Geogantas et al., 2007). Per miR-223, l'induzione di questo miRNA durante la granulopoiesi è stata evidenziata in cellule di Leucemia Promielocitica Acuta (APL, Fazi et al., 2005). Le APL risultano dall'espansione clonale di progenitori ematopoietici bloccati nel differenziamento allo stadio promielocitico (sottotipo M3).

Le NB4 sono una linea cellulare derivante da un paziente APL che, se messe in coltura con gli appropriati agenti differenziativi, possono differenziare in cellule che morfologicamente e funzionalmente ricordano una cellula mieloide matura. E' stato anche dimostrato dagli stessi autori dell'invenzione che l'espressione stabile di miR-223 in cellule NB4 è in grado di aumentare il differenziamento di queste cellule verso la linea granulocitaria, mentre l'inibizione funzionale del miRNA inibisce la risposta delle cellule NB4 al differenziamento granulocitario indotto dall'acido retinoico (Fazi et al., 2005). Questi risultati suggeriscono una correlazione diretta tra i livelli di miR-223 ed il livello maturativo di un precursore mieloide.

Studiando il circuito regolativo nel quale miR-223 è coinvolto, gli autori hanno identificato che l'mRNA per il fattore trascrizionale NFIA è regolato da miR-223 (Fazi et al., 2005). I livelli della proteina NFIA diminuiscono durante il differenziamento granulocitario e seguono l'andamento opposto

dei livelli di miR-223, che invece aumentano. Inoltre, siRNA contro NFIA aumentano la maturazione verso la linea granulocitaria. Pertanto, la repressione di NFIA da parte di miR-223 è un evento importante nel programma genetico che porta alla maturazione di un precursore mieloide verso la linea granulocitaria.

Gli autori dimostrano un sinergismo tra l'overespressione di miR-223 e la repressione di NFIA nel differenziamento granulocitario di cellule APL. Gli autori hanno utilizzato costrutti lentivirali per l'espressione ectopica di miR-223 (Lenti-223) e siRNA contro NFIA (lenti-siNFIA) in cellule NB4. In particolare, un frammento di 260 paia di basi della sequenza genomica umana contenente miR-223 è stato clonato tra il promotore dell'snRNA U1 umano, dipendente da RNA Pol II, ed il suo specifico terminatore. La sequenza per la produzione di siRNA contro NFIA è stata inserita all'interno del precursore di miR-223, sostituendo la sequenze del miRNA maturo con quella dell' siRNA. Le cassette di espressione U1-ncRNA sono state quindi clonate separatamente nel vettore lentivirale pRRLcPPT.hPGK.EGFP.WPRE (Fazi et al., 2005). Il gene GFP presente all'interno del vettore ha consentito di valutare l'efficienza dell'infezione durante tutte le fasi sperimentali e di misurare i marcatori del differenziamento solo nelle cellule trasdotte. Per prima cosa, gli autori hanno comparato l'espressione di marcatori specifici granulocitari, quali CD11b e CD14, mediante citometria a flusso. Come mostrato in Figura 1, le cellule infettate sia con Lenti-223 e Lenti-siNFIA mostrano una espressione superiore di entrambi i marcatori rispetto alle cellule infettate con i singoli costrutti lentivirali. L'aumento marginale che si osserva con il

vettore vuoto, specialmente quando si è misurato CD11b, è probabilmente dovuto ad un effetto non specifico dell'infezione.

Questi dati dimostrano che l'uso combinato di miRNA e siRNA stimola efficacemente la maturazione di mieloblasti.

Pertanto questa strategia sinergica è vantaggiosamente utilizzabile per una terapia delle Leucemia Mieloide Acuta basata sull'uso combinato di piccoli RNA non codificanti.

Un aumento dell'espressione di miR-223 e la repressione di NFIA è stata anche dimostrata nella linea cellulare leucemica HL-60 del sottotipo M2 (Fazi et al., 2005), suggerendo l'utilizzo combinato di miR-223 e siRNA contro NFIA anche per questa sottoclasse di AML.

Questi dati suggeriscono che l'uso di miR-223 e siNFIA può essere esteso anche ad altri tipi di AML, indipendentemente dalla alterazione genetica della leucemia, in particolare ai sottotipi M0, M1, M2 e M4 che mantengono la potenzialità di maturare in granulociti.

Induzione del differenziamento monocitario mediante l'uso combinato di miR-424 e siRNA contro NFIA

Oltre a poter maturare in granulociti, le AML del sottotipo M2 e M3 possono essere indotte a differenziare in monociti/macrofagi attraverso l'uso di Vitamina D3 o di 12-O-Tetradecanoilphorbol 13-acetato (TPA). Recentemente, gli autori hanno identificato un miRNA, miR-424, che è specificamente indotto durante il differenziamento monocitario (Figura 2). La sua espressione ectopica in linee cellulari NB4 e HL-60 ed in cellule staminali CD34+ attraverso trasduzione con lentivirus (vedi sopra) stimola fortemente la maturazione verso la linea monocitaria/macrofagica (Figura

3). Inoltre, attraverso l'uso di Lenti-siNFIA gli autori hanno dimostrato che, così come per la maturazione verso la linea granulocitaria, la repressione di NFIA stimola anche il differenziamento monocitario (Figura 4). L'uso combinato di costrutti lentivirali, per l'espressione ectopica di miR-424 e per produrre siRNA contro NFIA, rappresenta quindi una ulteriore strategia per indurre il differenziamento di blasti leucemici della AML. In particolare, il loro utilizzo può essere esteso al sottotipo M5, in cui i blasti sono bloccati ad uno stadio maturativo monoblastico e non più in grado di differenziare verso la linea granulocitaria.

Al contrario della repressione, la sovraespressione di NFIA contrasta il differenziamento monocitario in maniera rilevante (Figura 5) rafforzando l'evidenza che esso deve essere represso da miR-223 e miR424 per permettere il differenziamento verso questi due lineage. La overespressione di NFI-A può quindi essere utilizzata per sbilanciare il differenziamento mieloide verso le linee eritrocitaria e megacariocitaria, dove i livelli dei repressori traduzionali di NFIA, miR-223 e miR 424, sono bassi.

Induzione del differenziamento mieloide mediante l'uso combinato di miRNA e siRNA contro proteine di fusione e/o fattori che inibiscono il differenziamento

Le traslocazioni cromosomali che caratterizzano molte AML di solito producono l'espressione di prodotti oncogenici, derivanti da fusione di : fattori trascrizionali con ruoli ben definiti nell'ematopoiesi (Rosenbauer e Tenen, 2007), quali AML1-ETO (t/8;21), CBF-MYH11 ("core-binding factor-myosin heavy chain" 11; inv16); MLL ("mixed lineage leukemia";

t11q23), e PML-RAR α ("promyelocytic leukaemia-retinoic acid receptor α "; t/15;17). Come conseguenza, un'attività trascrizionale aberrante è presente nella cellula (Tenen, 2003; Rosenbauer e Tenen, 2007). Per questo motivo, lo spegnimento dell'attività del prodotto di fusione mediante RNAi produce un beneficio terapeutico. In particolare, gli autori hanno utilizzato siRNA contro:

- i) le fusioni AML1/ETO per la terapia della AML di sottotipo M2,
- ii) le fusioni PML-RAR α per la terapia della AML di sottotipo M3.

Inoltre, gli autori hanno combinato l'espressione ectopica di miRNA con siRNA contro fattori con un ruolo ben definito nell'inibizione della maturazione mieloide. Ad esempio siRNA contro NFIA (Fazi et al., 2005) o siRNA contro SUZ12 (Villa et al., 2007). SUZ 12 è un fattore coinvolto nelle modifiche chimiche degli istoni ed il cui spegnimento mediante RNAi è stato dimostrato stimolare il differenziamento di cellule APL del sottotipo M3 (Villa et al., 2007).

BIBLIOGRAFIA

- Amendola M, et al. 2005 Nat Biotechnol 23:108-116.
- Bartel, D. P. 2004, Cell, 23:281-297.
- Georgantas, R.W. et al., 2007, PNAS, 20: 2750-2755.
- Fazi, F., et al., 2005, Cell, 123: 819-831.
- He, L., et al., 2007, Nature, 447:1130-1134.
- Kim, D.H. et al., 2007, Nat. Rev. Genet. 8:173-184.
- Rosenbauer, F., et al., 2007, Nat. Rev. Immunol. 7:105-117.
- Scherr, M., Eder, M. 2007, Cell Cycle. 6: 444-449.
- Tenen, D. G. 2003, Nat. Rev. Cancer 3: 89-101.

Villa, R., et al., 2007, Cancer Cell. 11: 513-525.

RIVENDICAZIONI

1. Uso di almeno un miRNA e di almeno un siRNA, o di almeno due miRNA, o di almeno due siRNA per la preparazione di un medicamento per l'induzione del differenziamento mieloide o per il trattamento della leucemia mieloide acuta in cui il miRNA è in grado di modulare il differenziamento mieloide e/o di agire come oncosoppressore, e lo siRNA è in grado di modulare il differenziamento mieloide o di inibire l'espressione di un prodotto di fusione derivante da una traslocazione cromosomica associata alla leucemia.
2. Uso secondo la rivendicazione 1 in cui il miRNA è in grado di modulare il differenziamento granulocitario.
3. Uso secondo la rivendicazione 2 in cui il miRNA è il miR-223.
4. Uso secondo la rivendicazione 1 in cui il miRNA è in grado di modulare il differenziamento monocitario e/o macrofagico.
5. Uso secondo la rivendicazione 4 in cui il miRNA è miR-424.
6. Uso secondo una delle rivendicazioni precedenti in cui il miRNA oncosoppressore è miR-34.
7. Uso secondo una delle rivendicazioni precedenti in cui lo siRNA inibisce l'espressione di NFIA o di SUZ12.
8. Uso secondo una delle rivendicazioni precedenti in cui il siRNA in grado di inibire l'espressione di un prodotto di fusione derivante da una traslocazione cromosomica associata alla leucemia è un siRNA contro PML/RARα o contro AML1/ETO.
9. Uso secondo una delle rivendicazioni precedenti in cui il medicamento comprende un primo miRNA in grado di modulare il differenziamento

mieloide, un secondo miRNA oncosoppressore e un siRNA come definito nella rivendicazione 1.

10. Uso secondo una delle rivendicazioni precedenti in cui il medicamento è in forma di nanocapsule.

11. Vettore d'espressione in grado di esprimere in una cellula ospite simultaneamente gli miRNA e siRNA secondo una delle rivendicazioni precedenti.

12. Vettore secondo la rivendicazione 11 in cui le sequenze codificanti per i miRNA e per gli siRNA sono sotto il controllo del promotore di U1 RNA.

13. Vettore secondo la rivendicazione 11 o 12 per l'induzione del differenziamento mieloide o per terapia genica.

p.p. Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

de Simone & Partners SpA

OC

de Simone & Partners



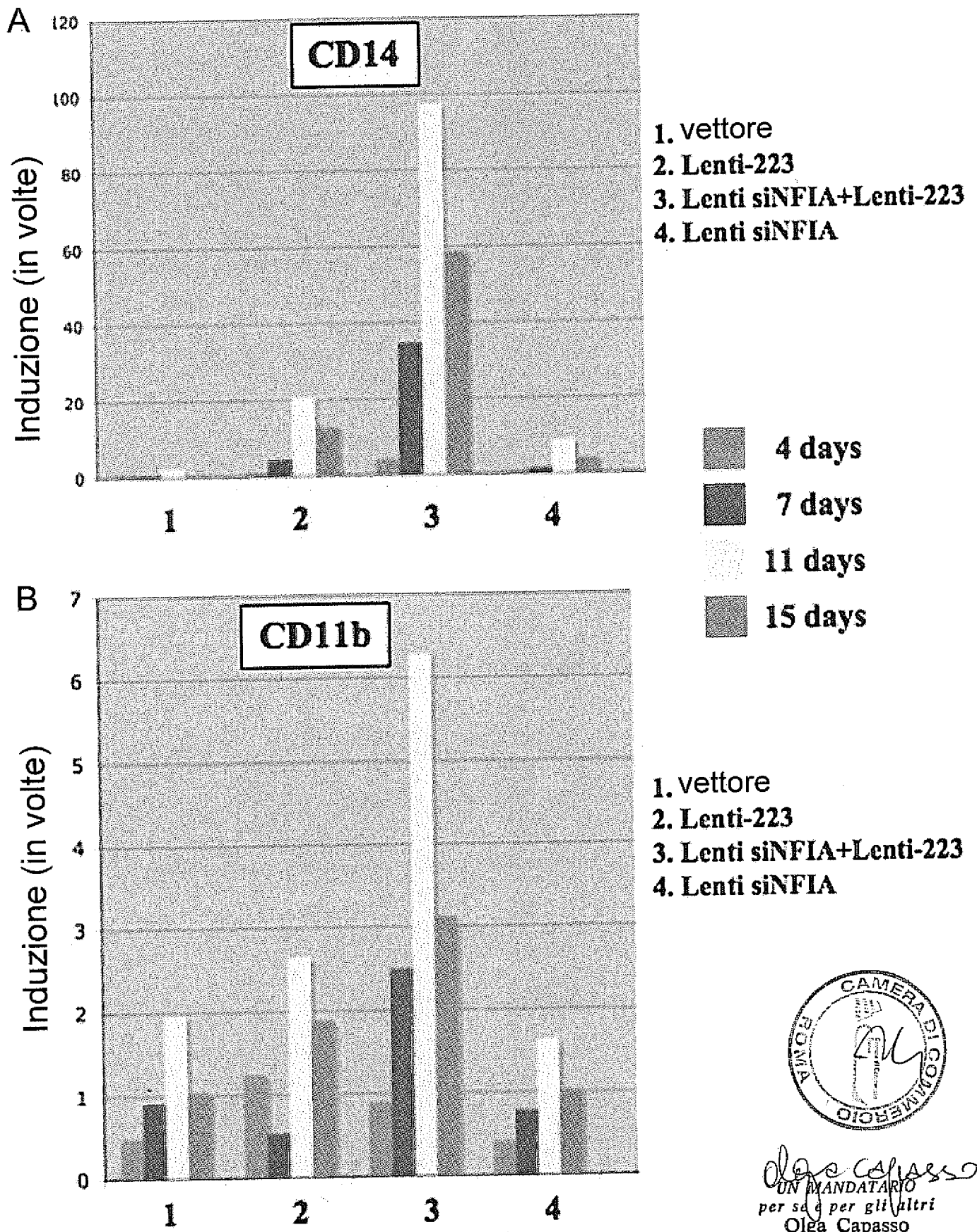


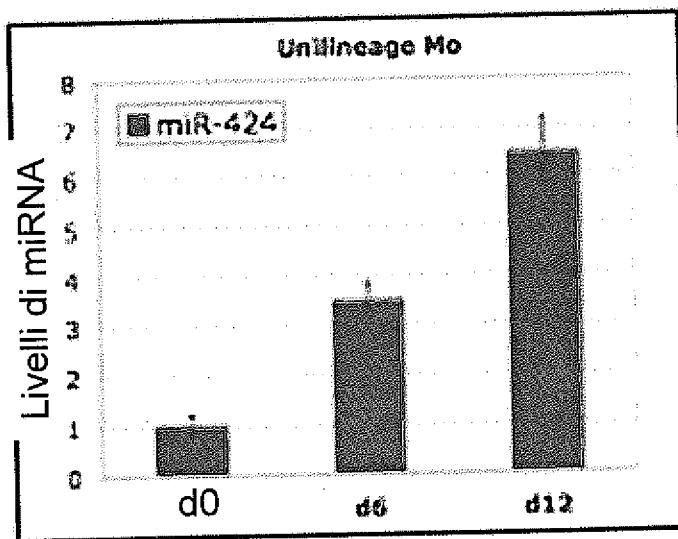
Fig. 1



Olga Capasso
UN MANDATARIO
per sé e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

A

Cellule CD34+

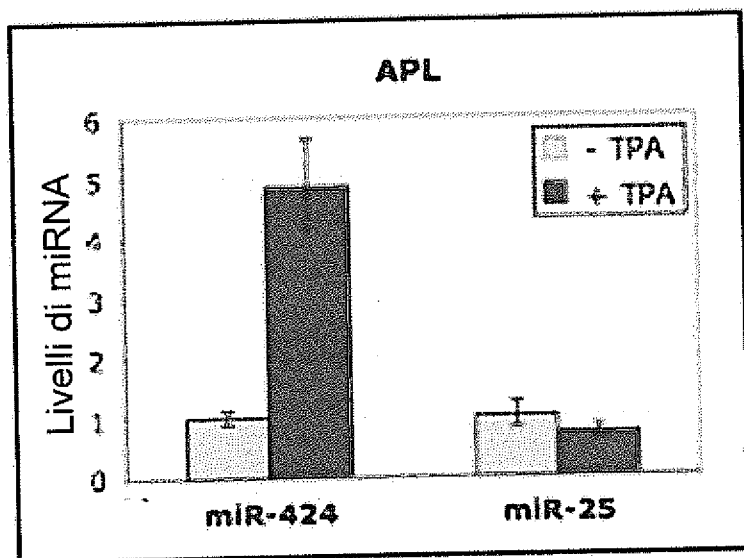


Saggio TaqMan miRNA

Cellule APL

B

Cellule primarie



Saggio TaqMan miRNA

C

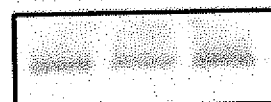
Linee cellulari

NB4+TPA

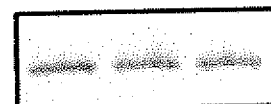
0 24 48 hrs



miR-424



miR-25

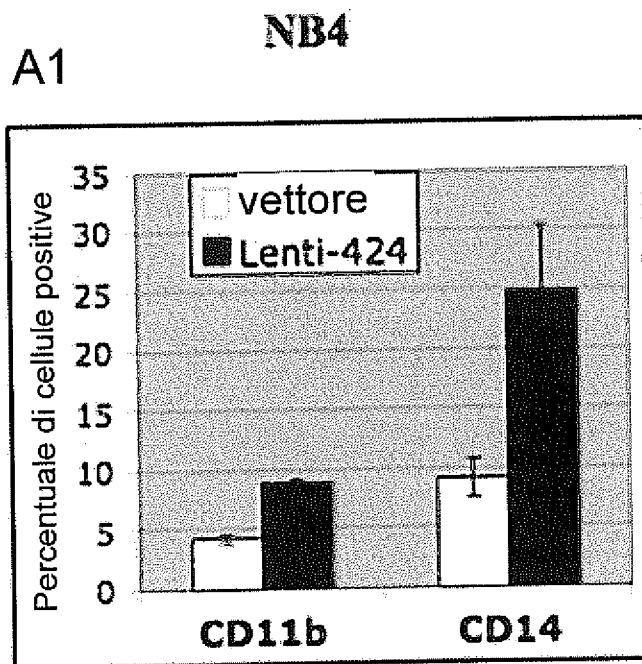


U2

Fig. 2



Olga Capasso
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'isr. 820 B)



B1 CD34+ Unimo lineage

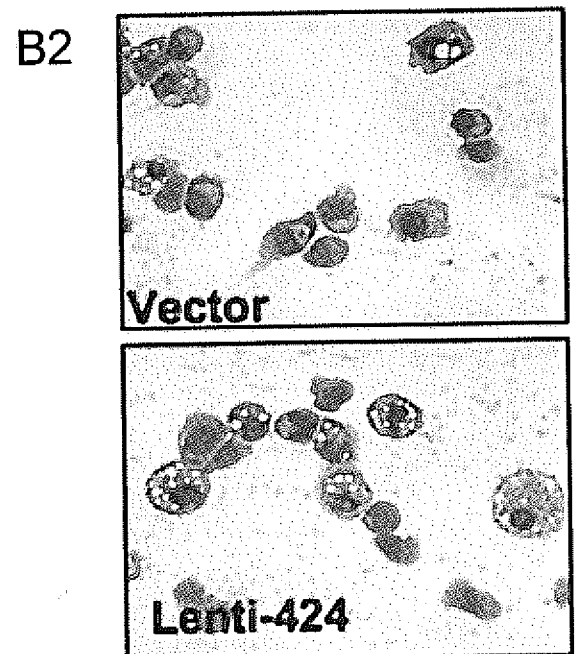
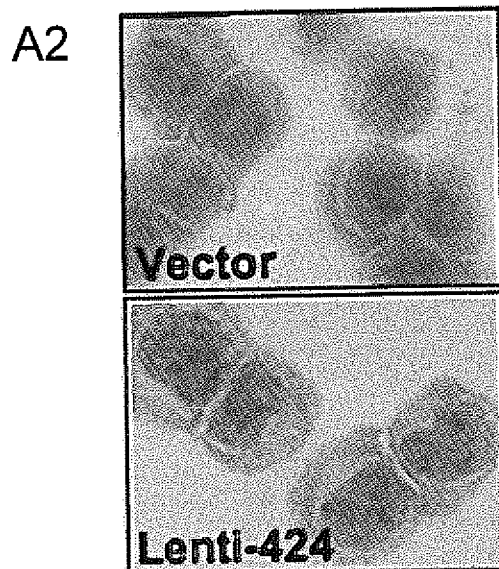
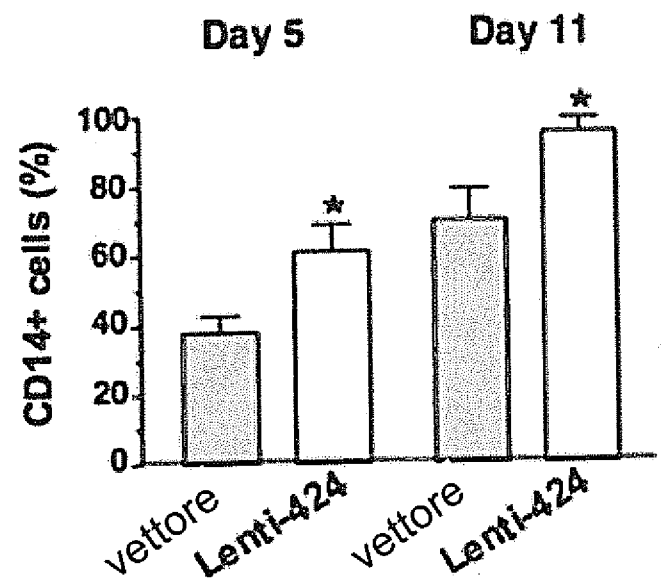
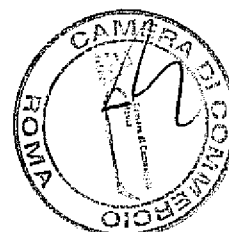


Fig. 3



Olga Capasso
 UN MANDATARIO
 per se e per gli altri
 Olga Capasso
 (N° d'iscl. 820 B)

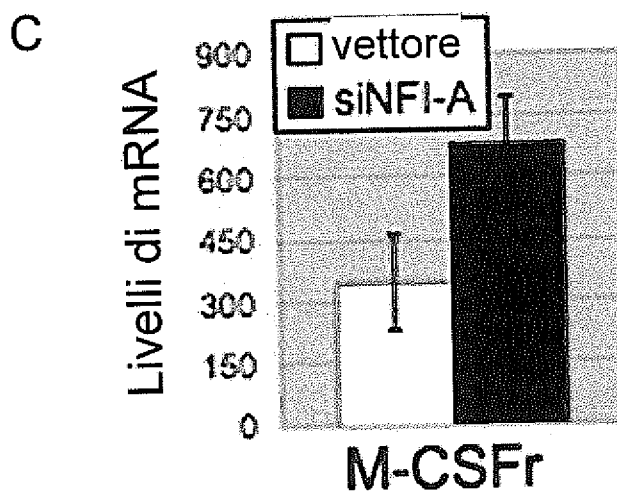
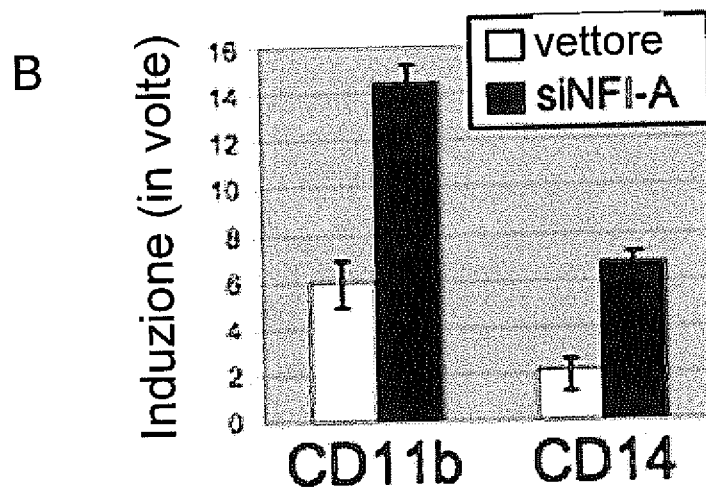
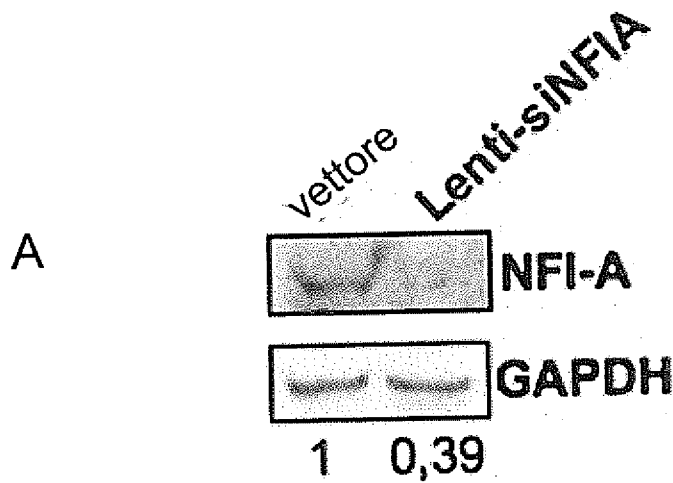
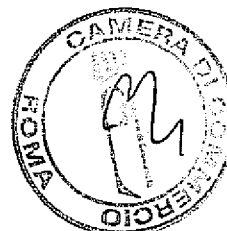


Fig. 4



Olga Capasso
 UN MANDATARIO
 per se e per gli altri
 Olga Capasso
 (N° d'isr. 820 B)

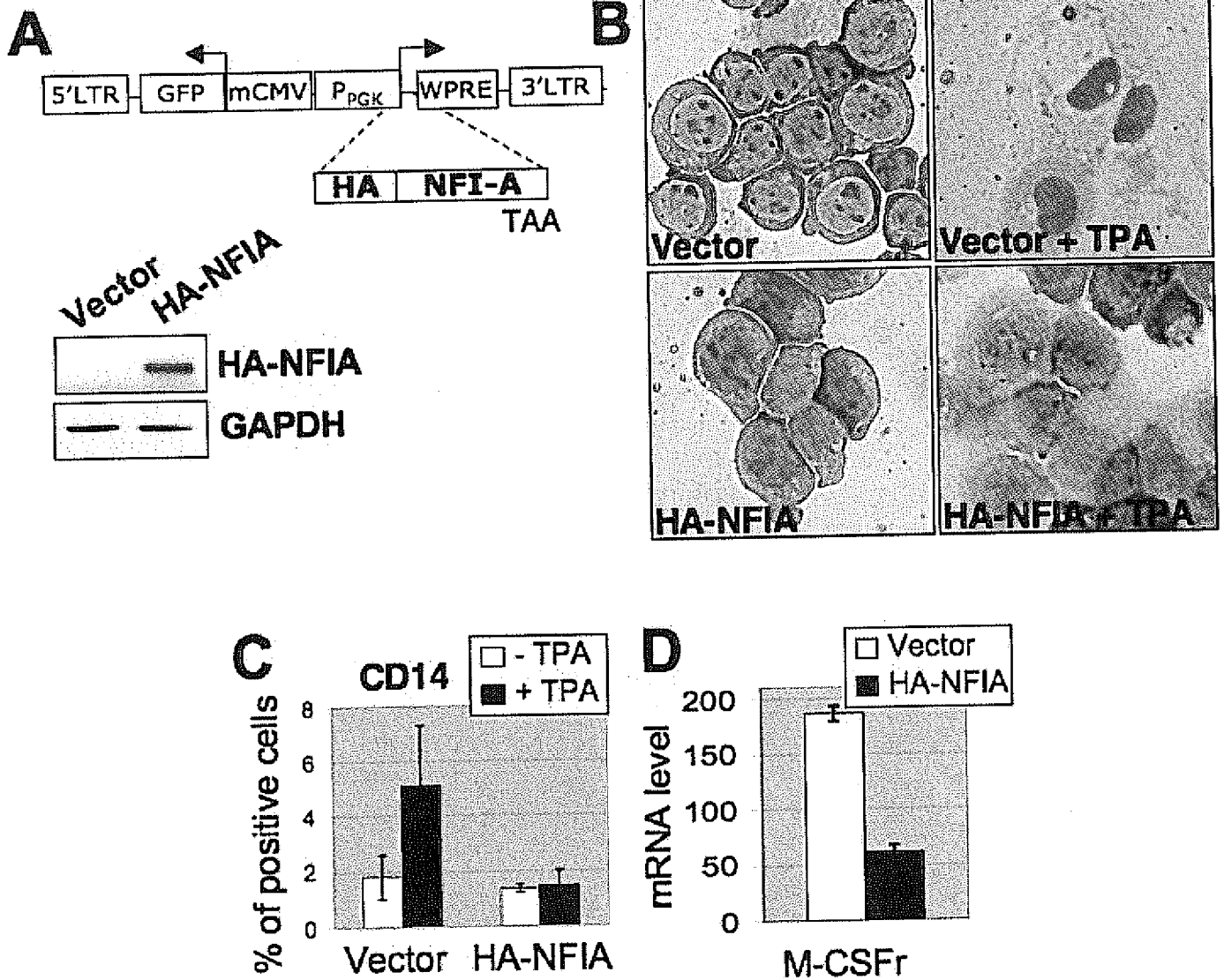


Fig. 5



Olga Capasso
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscri. 820 B)