



Use of blood platelets as siRNA vectors for silencing the BCR-ABL fusion gene in Chronic Myeloid Leukemia (CML)

Dott. Alessandro Marturano, PhD
Vincitore borsa di studio 2016 Associazione "Damiano per l'Ematologia"



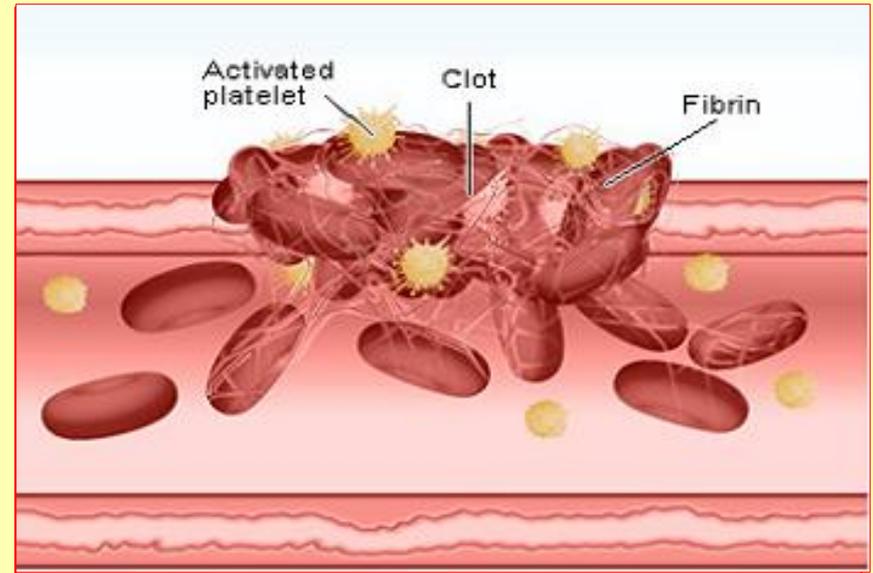
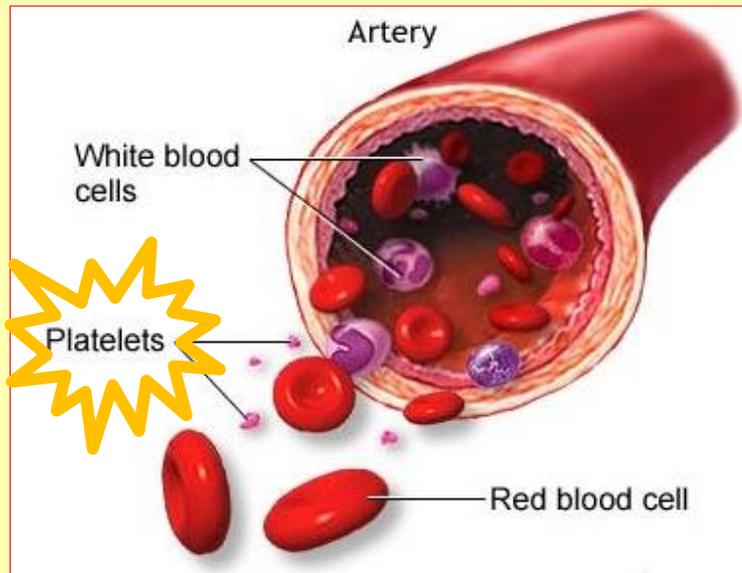
Università degli Studi di Perugia - Ospedale S. Maria della Misericordia

Centro Emostasi e Trombosi
Laboratorio di Studio Delle Piastrine

Direttore – Prof. Paolo Gresele



Piastrine: Emostasi e oltre...



Piastrine: Emostasi e oltre...

Le piastrine sono caratterizzate da una forte propensione all'interazione con altre tipologie cellulari sia in condizioni fisiologiche che patologiche, ricevendo o veicolando mediatori molecolari ed agendo da modulatori della risposta cellulare

Utilizzare le piastrine per la veicolazione di molecole ad azione farmacologica verso specifiche cellule target

Dogma

siRNA



Nobelprize.org
The Official Web Site of the Nobel Prize

Video Podcast

Laureates | Nomination | Ceremonies | Alfred Nobel

 The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006
Andrew Z. Fire, Craig C. Mello

Share this:     34 

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006



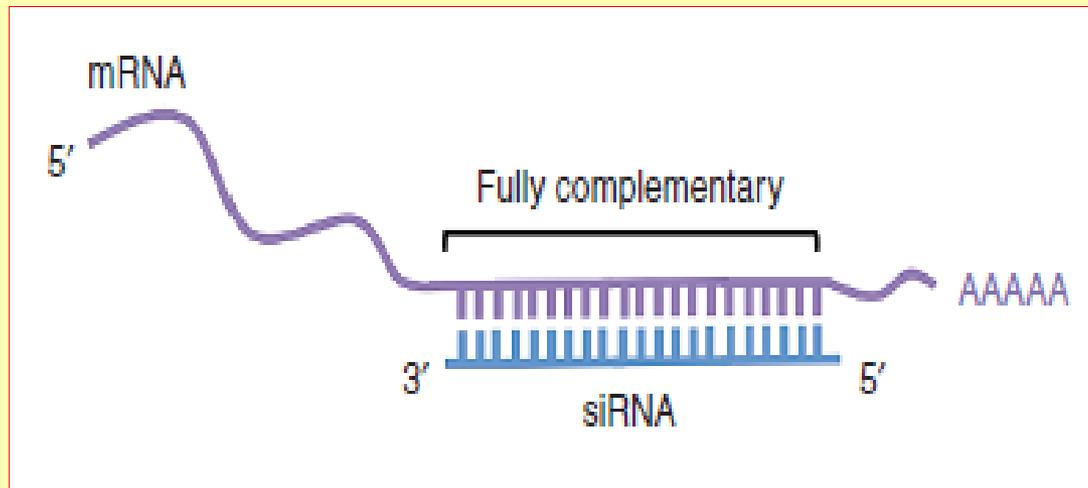
Photo: L. Cicero
Andrew Z. Fire
Prize share: 1/2



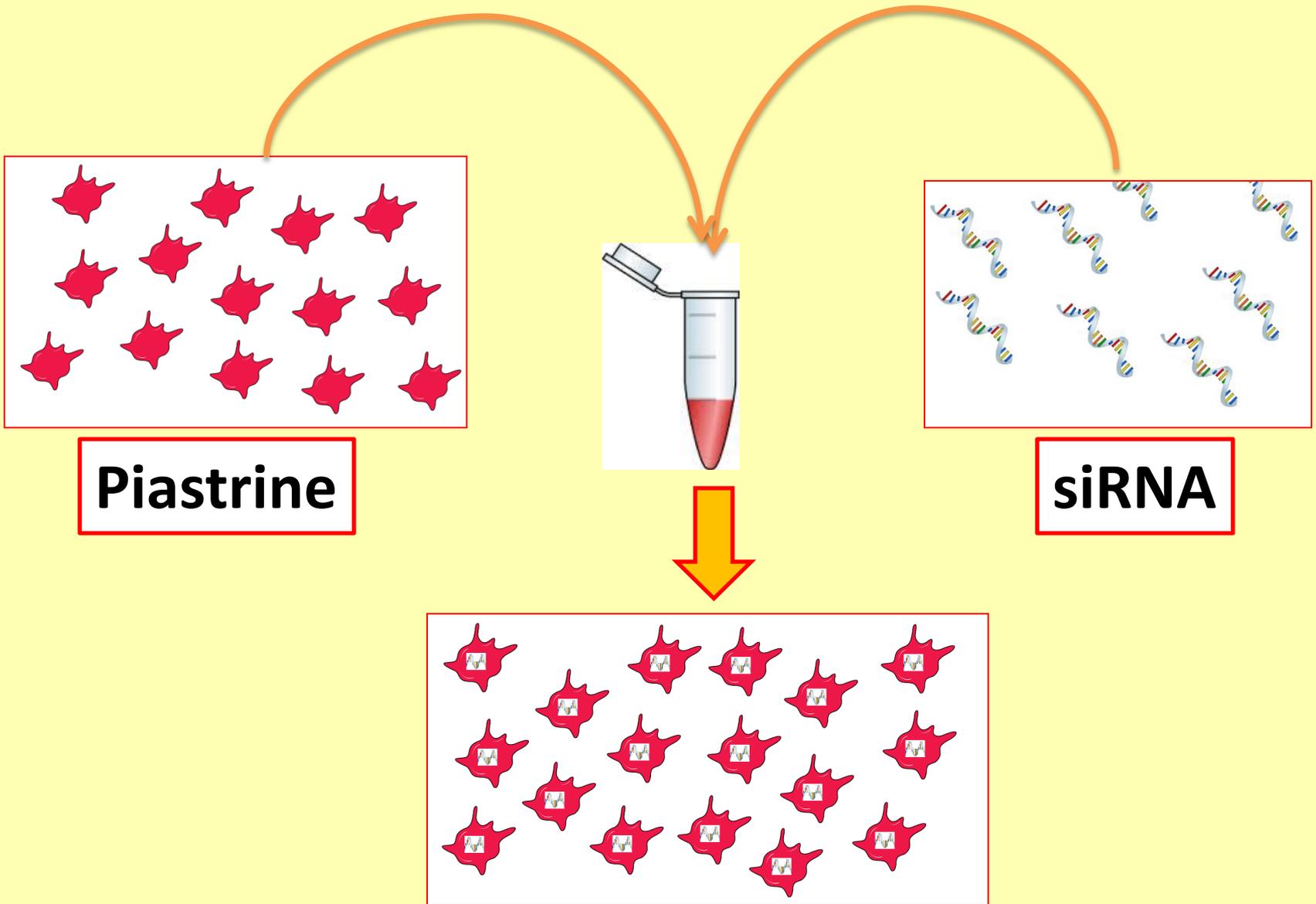
Photo: J. Mattern
Craig C. Mello
Prize share: 1/2

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006 was awarded jointly to **Andrew Z. Fire** and **Craig C. Mello** "for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"

siRNA

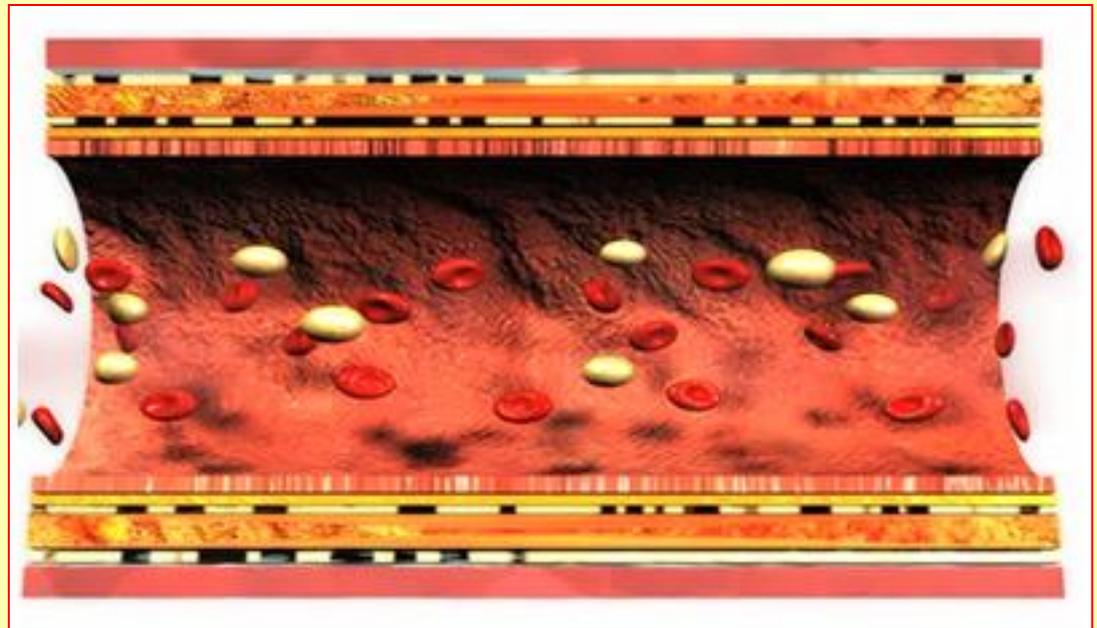
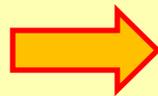
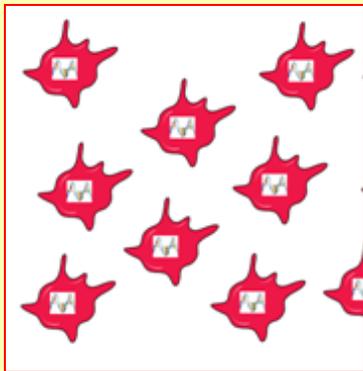


Metodo della Trasfezione Piastrinica



Piastrine per la Veicolazione di siRNA Farmaceutici

Piastrine trasfettate con un siRNA specifico per un particolare RNA, trasferiscono il farmaco alle altre cellule con cui entrano a contatto diretto, come globuli bianchi e cellule endoteliali, in modo da silenziare l'espressione genica di proteine che ricoprono un ruolo patogenico nelle cellule target



Piastrine per la Veicolazione di siRNA Farmaceutici

Terapia Genica siRNA mediata:

- Problema enorme relativo alla veicolazione dei siRNA come farmaci, a causa dell'impossibilità della somministrazione diretta.
- Possibilità di veicolazione efficiente e mirata a determinate cellule accettrici

Leucemia Mieloide Cronica

La Leucemia Mieloide Cronica (LMC) è una condizione clinica patologica determinata dalla proliferazione monoclonale incontrollata di una sola cellula progenitore mieloide colpita dall'evento leucemogeno; ha origine dalle cellule del midollo osseo che rappresentano i precursori delle cellule del sangue (piastrine, globuli rossi e globuli bianchi tranne i linfociti).

Nella leucemia, queste cellule immature non riescono a completare il processo di trasformazione che le porta a diventare "adulte" e si accumulano in forma immatura (blasti) nell'organismo.

Il termine "cronica" indica che la malattia ha una progressione lenta nel tempo e può rimanere asintomatica anche per anni nella sua fase iniziale.

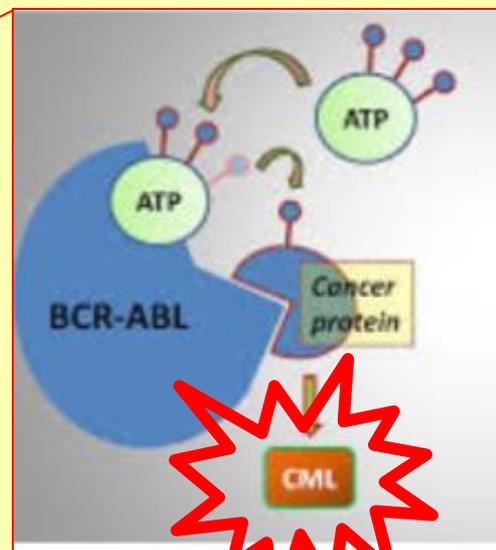
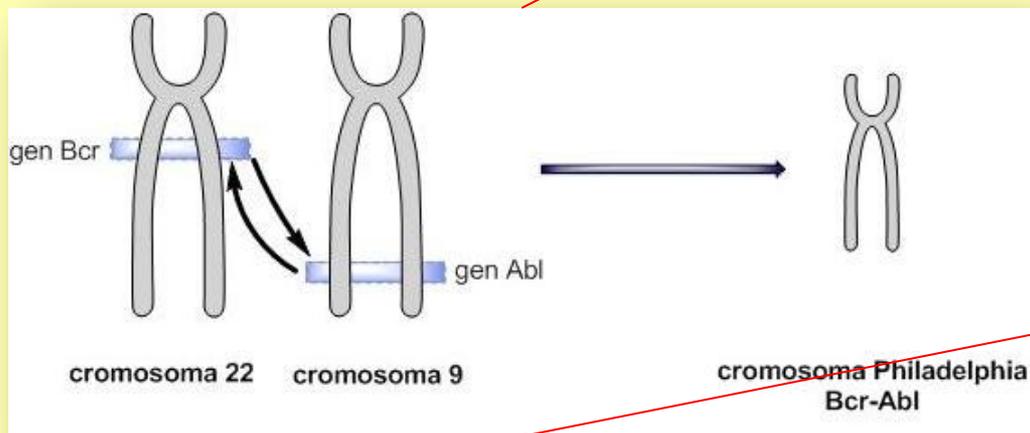
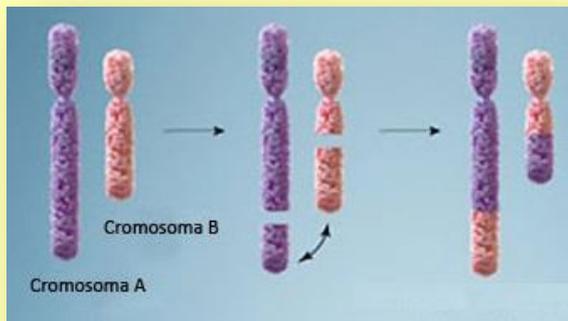
Leucemia Mieloide Cronica

- Relativamente rara e in Italia colpisce circa 2 persone (2,4 per gli uomini e 1,8 per le donne) ogni 100.000. Si stimano quindi ogni anno circa 650 nuovi casi tra gli uomini e 500 tra le donne
- È una malattia che colpisce soprattutto in età avanzata come dimostra il fatto che meno del 30% dei casi viene diagnosticato prima dei 60 anni
- I principali fattori di rischio non modificabili - sui quali cioè non si può intervenire per limitare il rischio - sono l'età avanzata e il sesso maschile
- I sintomi sono spesso poco specifici e comuni a molte altre malattie: debolezza, febbre, sudorazione notturna, perdita di peso, dolore alle ossa, dolore o senso di "pienezza" al ventre, dolore alle ossa o alle articolazioni e milza ingrossata, sanguinamenti (frequenti quelli di naso e gengive), infezioni e stanchezza legati alla riduzione delle normali cellule del sangue che sono sostituite da quelle tumorali

Leucemia Mieloide Cronica

- Non è possibile definire strategie di prevenzione efficaci per la LMC dal momento che non sono stati identificati fattori di rischio modificabili sui quali intervenire. L'unica raccomandazione utile è evitare se possibile di esporsi ad alte dosi di radiazioni
- L'evoluzione della LMC viene suddivisa in 3 fasi con una classificazione che si basa soprattutto sul numero di cellule immature (blasti) presenti nel sangue e nel midollo osseo:
 - Fase cronica
 - Fase accelerata
 - Fase blastica (o fase acuta o crisi blastica)

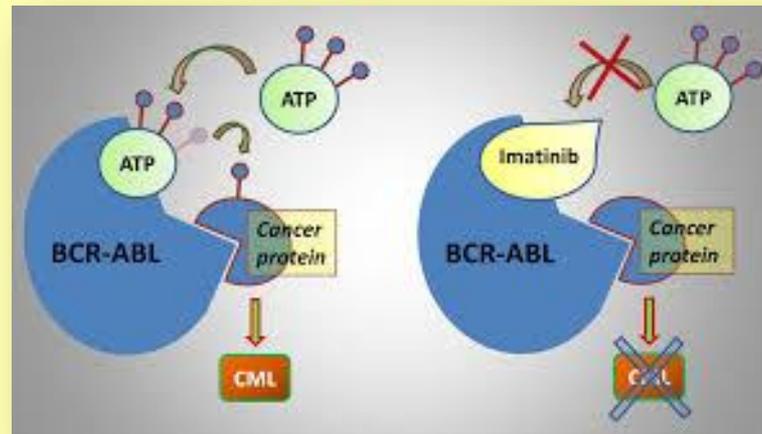
Cromosoma Philadelphia



il trattamento privilegiato era la chemioterapia tradizionale a basse dosi, ma il suo utilizzo si è progressivamente ridotto con l'introduzione dell'interferone, rimasto per anni il trattamento di prima scelta a partire dagli anni Ottanta

Da circa una decina d'anni il trattamento standard per la LMC è rappresentato dai cosiddetti farmaci intelligenti, molecole che colpiscono in modo mirato la proteina tradotta dal gene BCR-ABL presente nelle cellule malate e non in quelle sane. **Imatinib** è il capostipite di questi farmaci

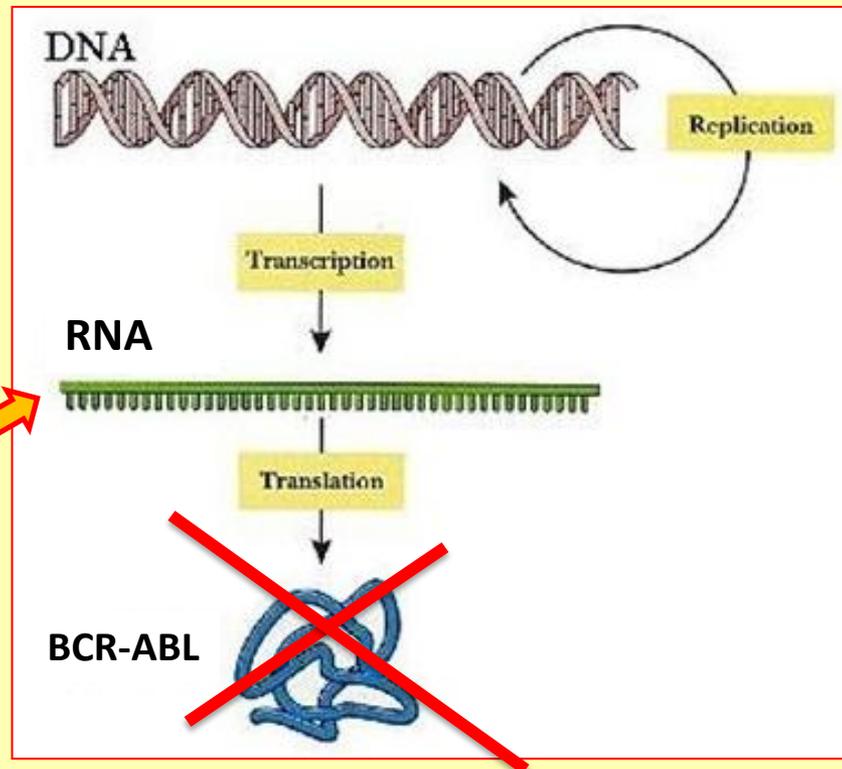
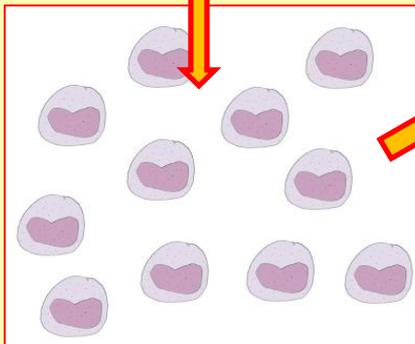
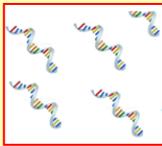
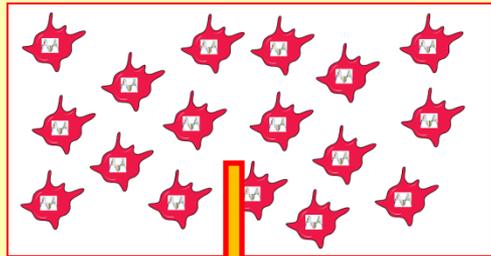
Purtroppo però talvolta l'efficacia dell'imatinib diminuisce con il tempo, un fenomeno cui si può rimediare in parte con farmaci "di seconda generazione" che agiscono contro lo stesso bersaglio (dasatinib e nilotinib)



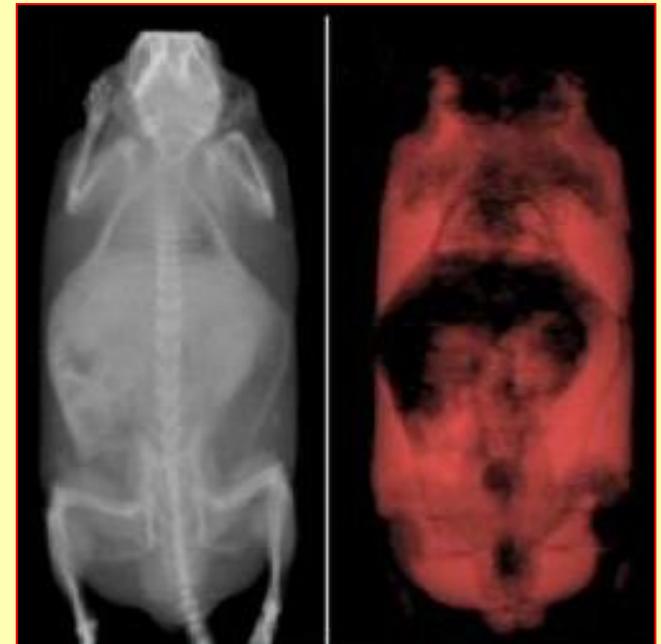
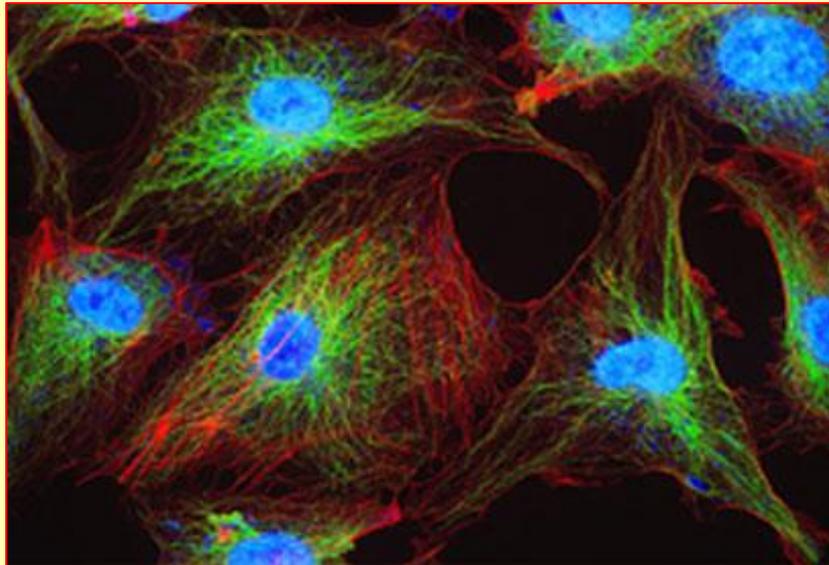
Circa il 20-30% dei pazienti sviluppa una resistenza all'Imatinib, che compromette la risposta al farmaco

Scopo del progetto

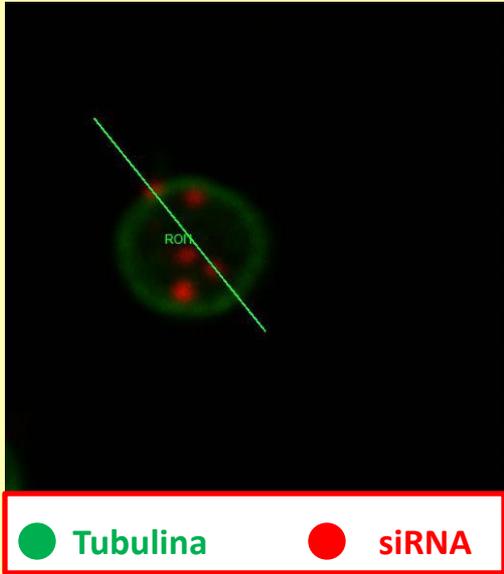
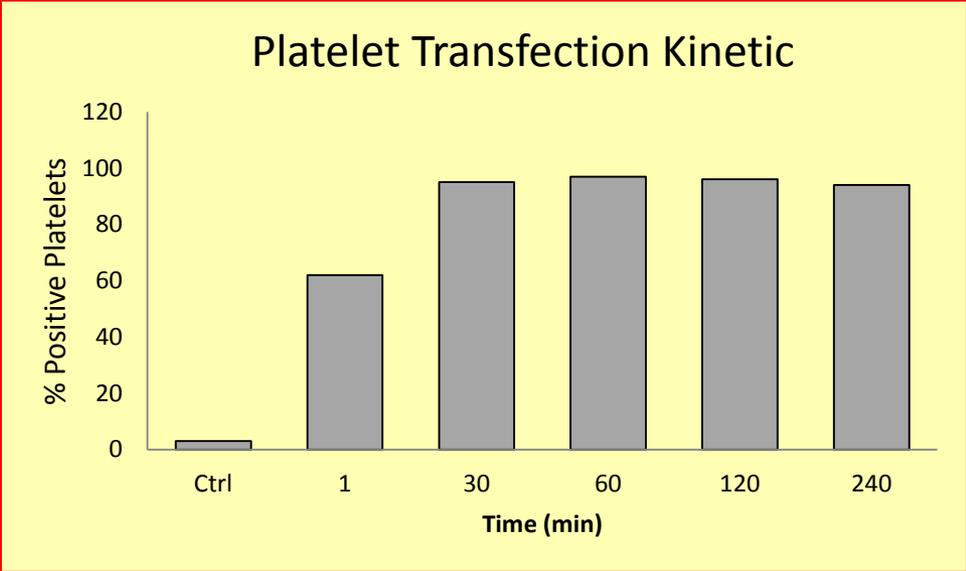
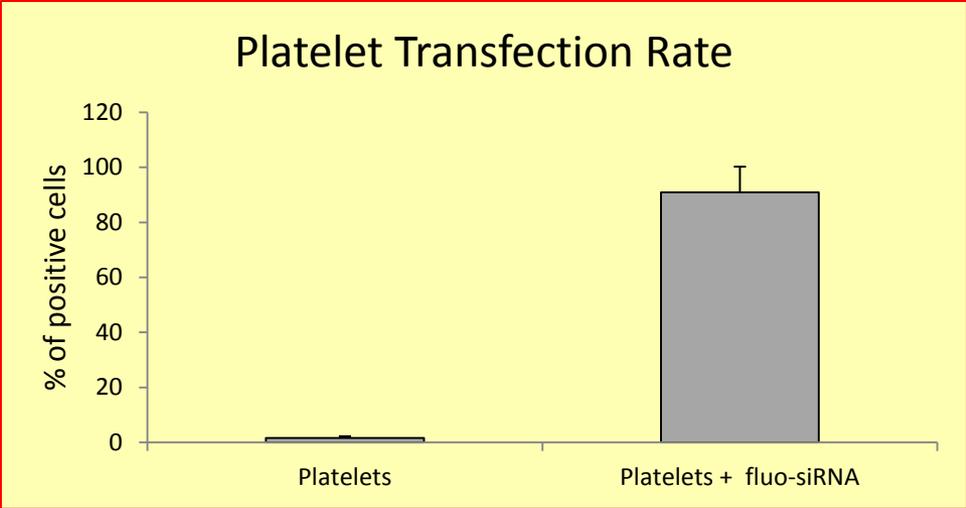
Utilizzare il nostro metodo originale di trasfezione per introdurre un siRNA BCR-ABL-specifico nelle piastrine del paziente per impiegarle come veicolo per il trasferimento del farmaco alle cellule leucemiche, in cui avverrà il silenziamento del trascritto (mRNA)



1. Valutare *in vitro* il rilascio di siRNA dalle piastrine umane verso altri tipi cellulari
2. Valutare la localizzazione cellulare del siRNA in modelli animali murini
3. Generare siRNA altamente specifici per il trascritto BCR-ABL
4. Valutare l'efficacia del silenziamento del trascritto BCR-ABL in linee cellulari di CML



Trasfezione Piastrinica con molecole siRNA

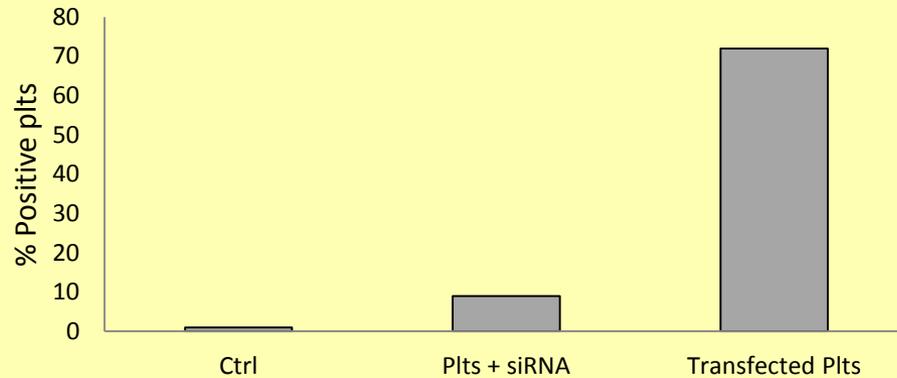


**Veicolazione Farmaceutica di
molecole siRNA**

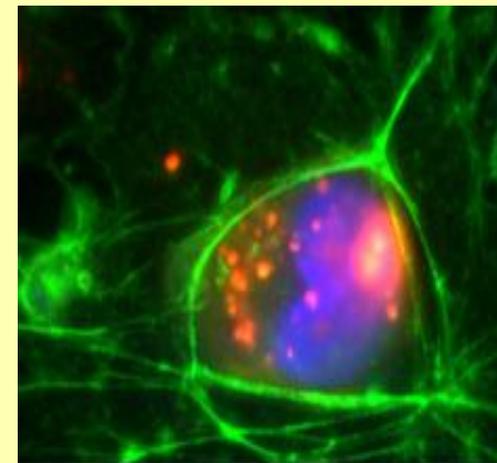
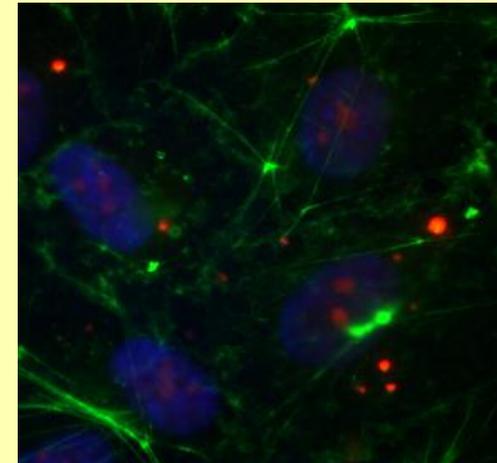
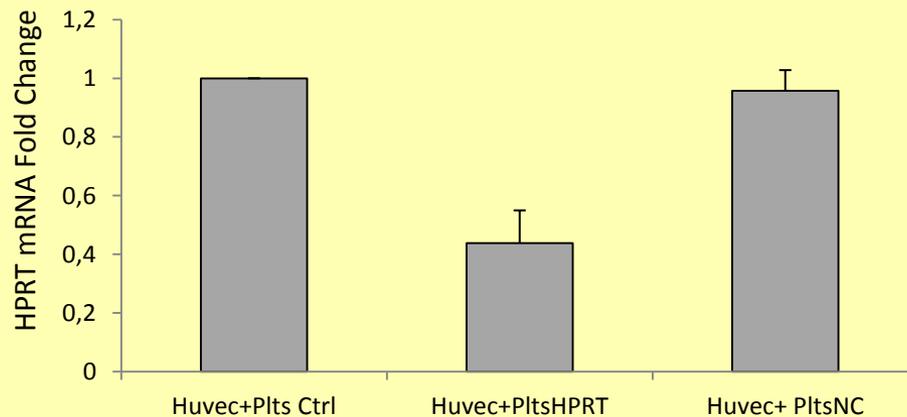
1. Cellule Endoteliali
2. Tumori "Solidi"
3. Tumori "Liquidi"

Trasmissione di siRNA verso Cellule Endoteliali

HUVEC Transmission rate

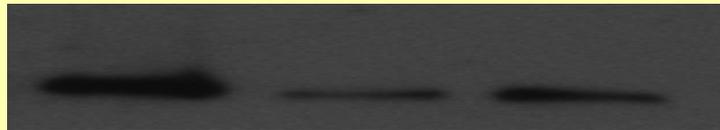
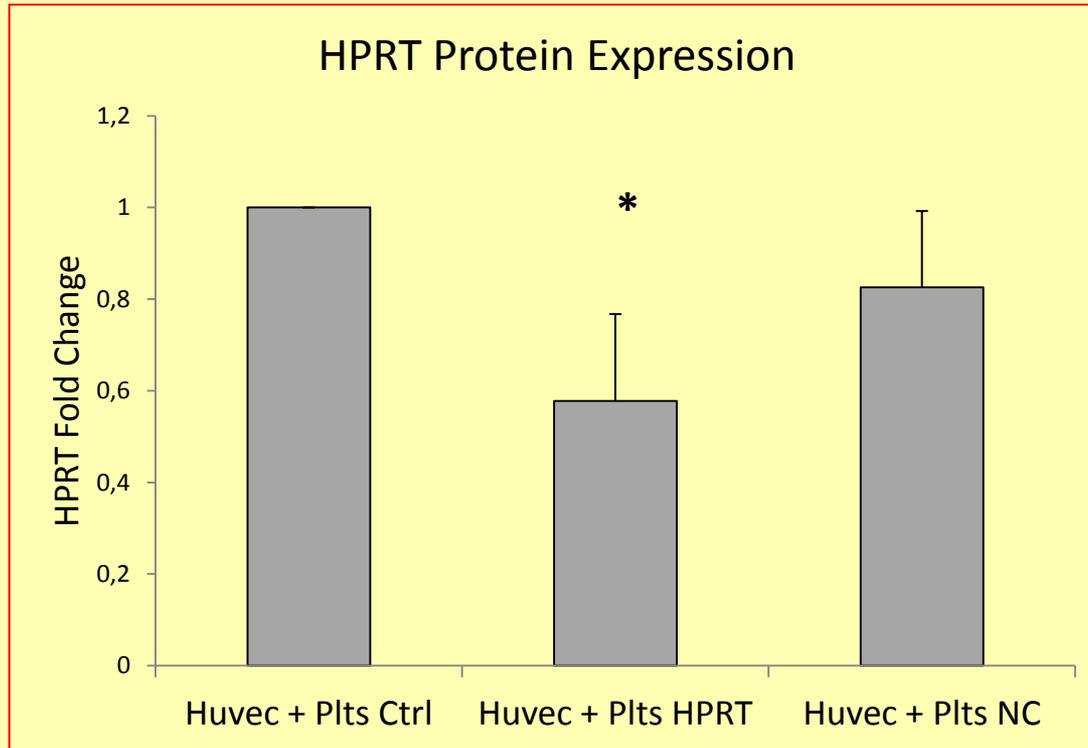


HPRT gene expression



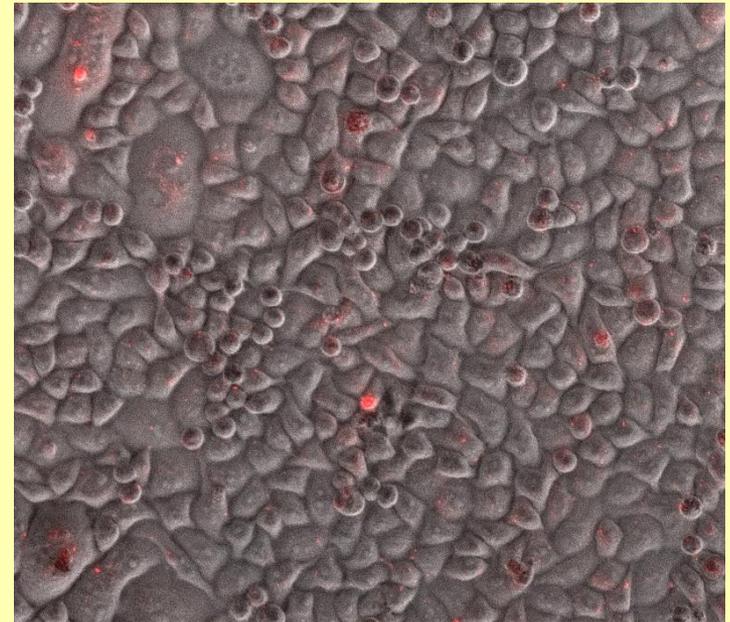
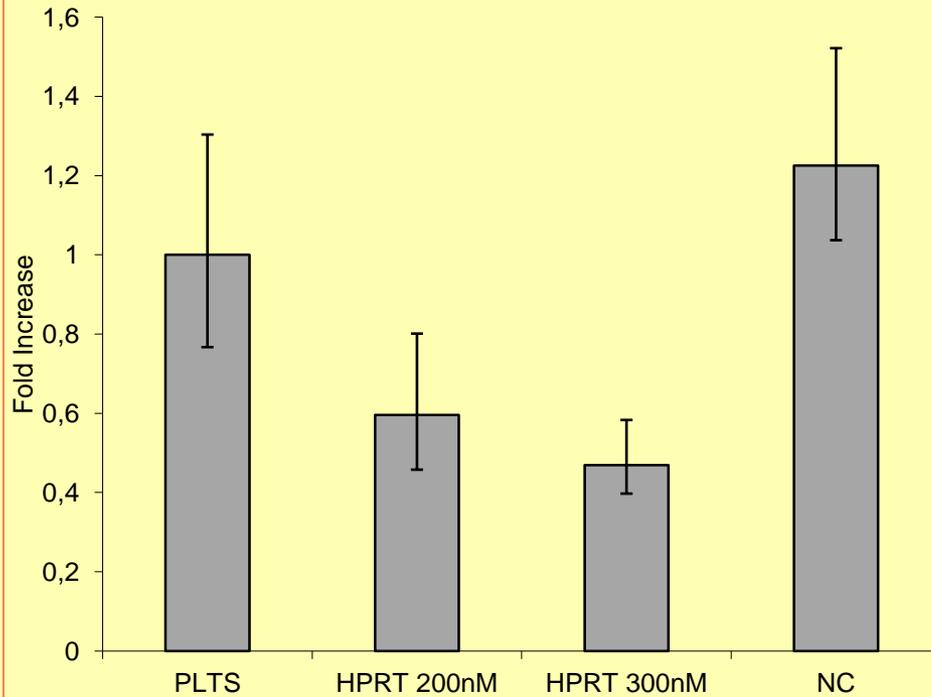
● Tubulina ● siRNA ● Nucleo

Trasmissione di siRNA verso Cellule Endoteliali



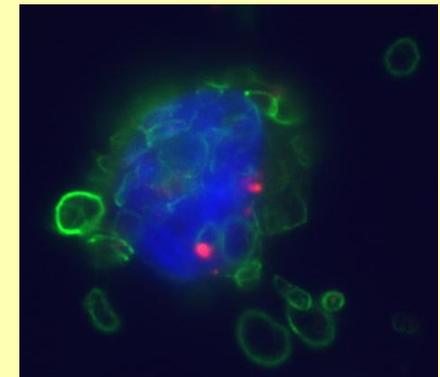
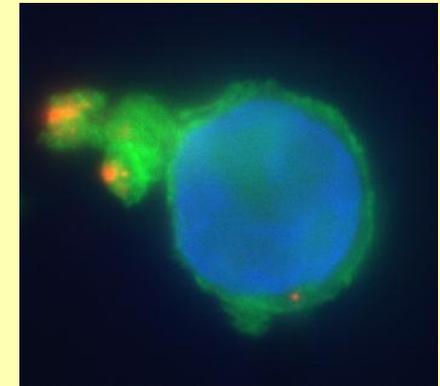
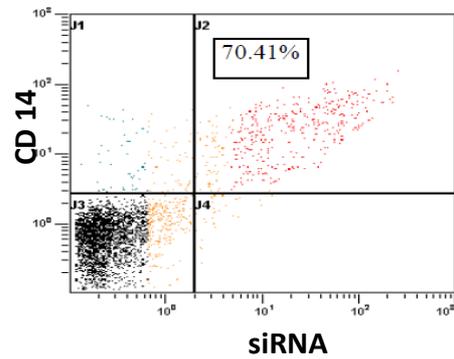
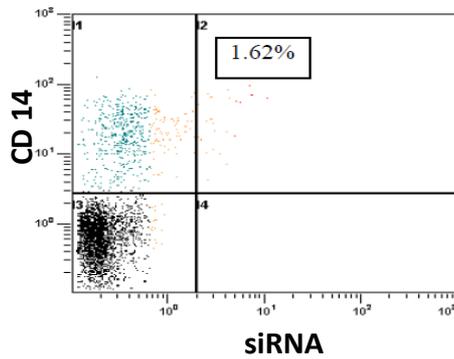
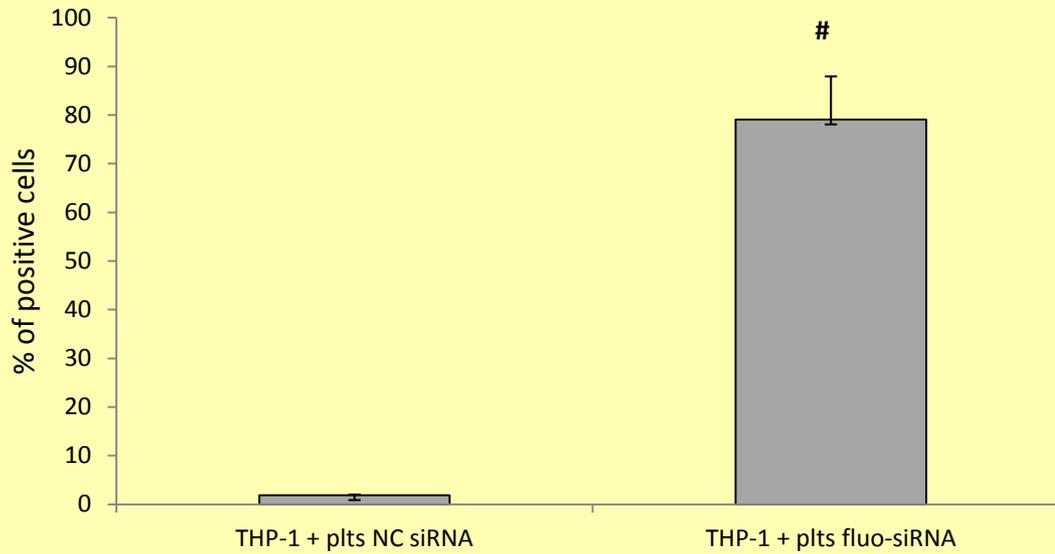
Trasmissione di siRNA verso Cellule di Tumore Solido

HeLa HPRT gene expression



Trasmissione di siRNA verso Cellule Leucemiche

Thp1Transmission rate



● Tubulina ● siRNA ● Nucleo

siRNA BCR-ABL

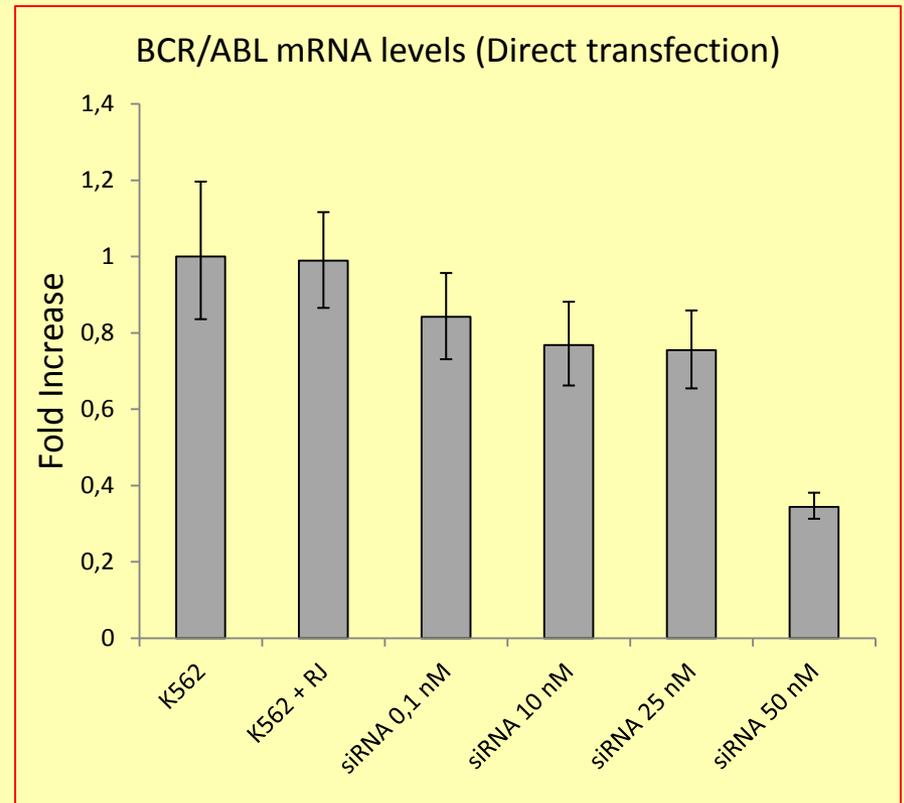
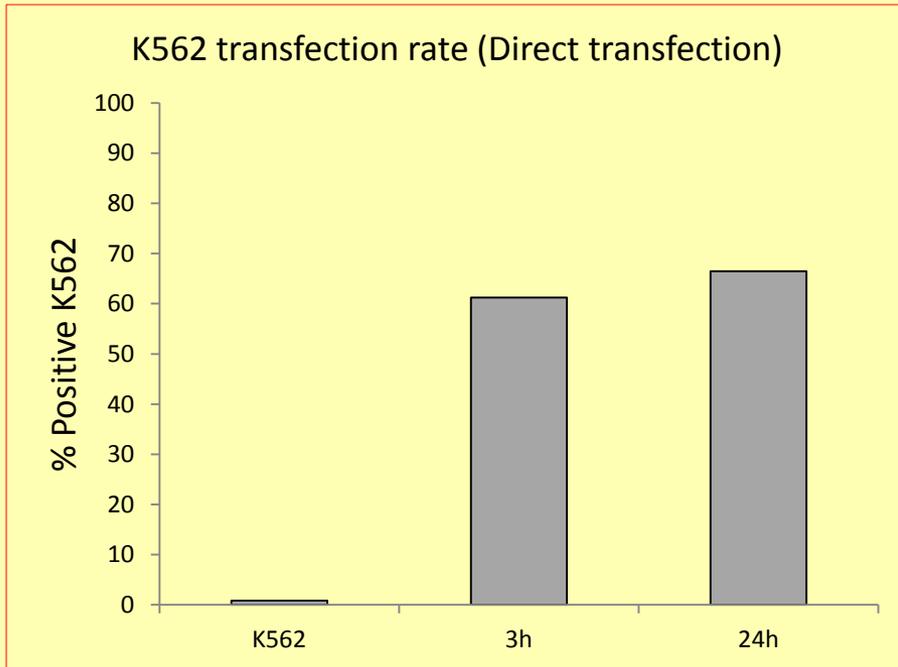
Creazione di una libreria di molecole di siRNA specifiche per la regione di fusione del gene BCR/ABL calcolati sulla regione consenso

SENSO	SEQUENZA CONSENSO BCR/ABL				N° NUCLEOTIDI	
5'--->3'	UGGAUUUAAGCAGAGUUCAAAAGCCCUUCAGCGGCCAGUA				40	

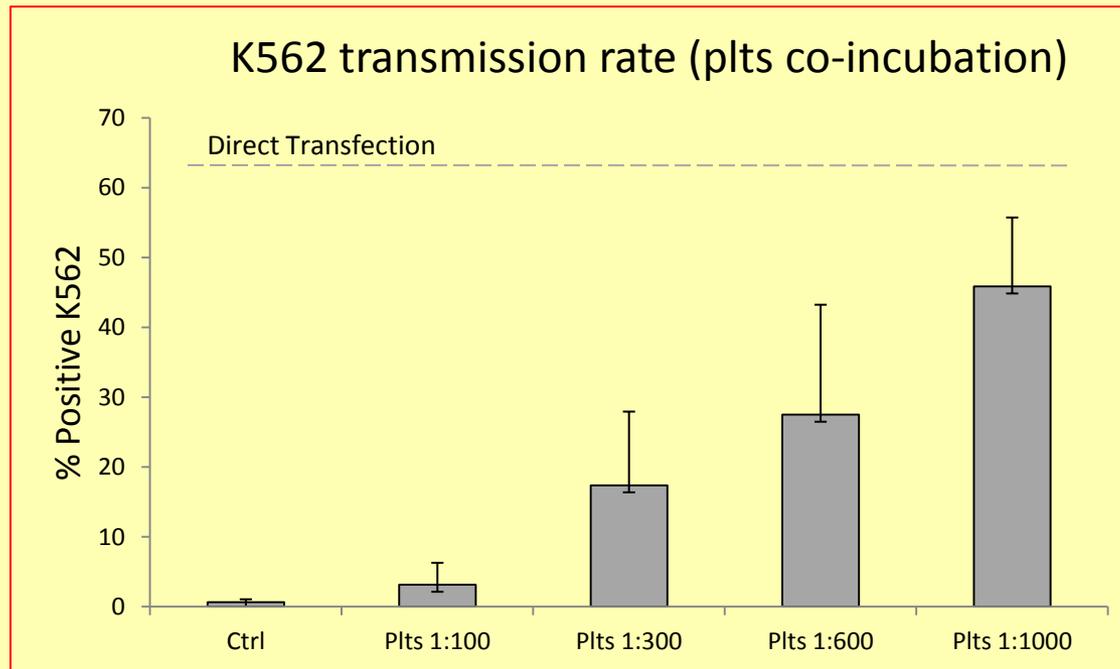
nome	senso	sequenza	modifiche	G/C content	Immune stimulation motif	strand selection
BCR/ABL b3a2_1	5'--->3'	GCAGAGUUCAAAAGCCCUUTT	Deossinucleotidi	42,80%	none	si
BCR/ABL b3a2_1	3'--->5'	TTGUCUCAAGUUUUCGGGAA	Deossinucleotidi			
BCR/ABL b3a2_2	5'--->3'	AAGCAGAGUUCAAAAGCCCTT	Deossinucleotidi	42,80%	none	no
BCR/ABL b3a2_2	3'--->5'	AAUUCGUCUCAAGUUUUCGGG	Deossinucleotidi			
BCR/ABL b3a2_3	5'--->3'	AUUUAAGCAGAGUUCAAAAGC	Deossinucleotidi	24%	none	si
BCR/ABL b3a2_3	3'--->5'	CCUAAAUUCGUCUCAAGUUUU	Deossinucleotidi			

nome	senso	sequenza	modifiche	G/C content	Immune stimulation motif	strand selection
BCR/ABL b3a2_dsi	5'--->3'	AUUUAAGCAGAGUUCAAAAGCCCTT	Deossinucleotidi	42,80%	none	si
BCR/ABL b3a2_dsi	3'--->5'	CCUAAAUUCGUCUCAAGUUUUCGGGAA	Deossinucleotidi			

Trasmissione di siRNA verso Cellule Leucemiche



Trasmissione di siRNA verso Cellule Leucemiche



Conclusioni

- La veicolazione di molecole di siRNA conseguente alla sperimentazione *in vitro* del nostro metodo ci ha permesso di ottenere risultati promettenti di silenziamento genico rilevati su differenti modelli cellulari:
 - Colture primarie endoteliali
 - Tumori ematologici
 - Tumori “solidi”
- Ottimizzazione del nostro metodo ai fini di ottenere un silenziamento genico efficace nei modelli cellulari *in vitro*
- Valutare la localizzazione cellulare del siRNA in modelli animali murini

Conclusioni

Una terapia farmacologica basata su siRNA veicolato da piastrine autologhe, rappresenta una nuova e ambiziosa strada, non solo per il trattamento della leucemia mieloide cronica, ma potenzialmente anche di altre forme di leucemie e tumori solidi, per i quali sorgono problemi di resistenza ai farmaci o manchi una terapia specifica

In futuro, la re-infusione endovenosa di piastrine autologhe trasfettate con siRNA potrebbe rappresentare una strategia terapeutica alternativa alla chemioterapia e priva di effetti collaterali



Grazie dell'attenzione

Centro Emostasi e Trombosi
Laboratorio di Studio Delle Piastrine

Prof. Paolo Gresele

Dr. Loredana Bury

Dr. Emanuela Falcinelli

Dr. Giulia Gubbiotti

Dr. Giuseppe Guglielmini

Dr. Marco Malvestiti

Dr. Giorgia Manni

Dr. Annamaria Mezzasoma

Dr. Stefania Momi

Dr. Eleonora Petito

Dr. Elisa Piselli

Dr. Manuela Sebastiano

