UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea

SCIENZE BIOLOGICHE

TITOLO ITALIANO

TERAPIA GENICA: IMPIEGO DI VIRUS PER LE TERAPIE A BASE DI RNA

TITOLO INGLESE

GENE THERAPY: USE OF VIRUSES FOR RNA-BASED THERAPIES

Tesi di Laurea di:

Giammarco Schippa

Docente Referente

Chiar.ma Prof.ssa

Maria Grazia ORTORE

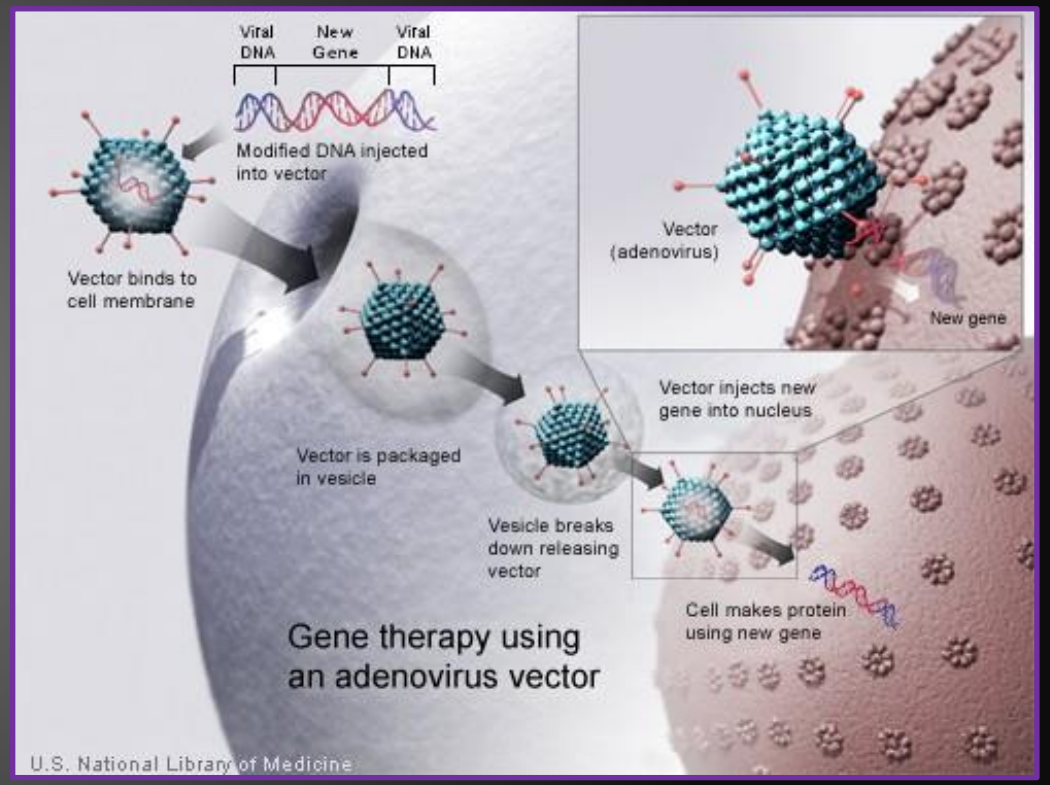
Sessione

Anno Accademico 2019/2020

<<Le terapie, mediche e chirurgiche erano state, finora, rivolte a colpire i nemici, esterni ed interni dell’uomo, come gli agenti infettivi ed i fattori fisici, ambientali ed ereditari. La terapia genica, diretta all’interno dell’organismo, sui bersagli genomici molecolari, tende invece a ottimizzare le nostre risposte nei confronti degli “avversari”.>> (*G. Visco, Atti della Accademia Lancisiana, 2019)*.

La terapia genica oggi:

- comprende i trattamenti che utilizzano l’inserzione di materiale genico nell’interno di cromosomi alterati. A questo scopo, spesso si utilizzano ceppi di virus non patogeni (o resi artificialmente tali).
- Il gene si replicherà in modo autonomo e sarà poi trasferito alle cellule figlie o progenie. La procedura è chiamata **trasfezione** o **trasformazione**.



Le terapie a base di RNA sono diventate un'alternativa valida ed interessante alle terapie basate sul DNA:

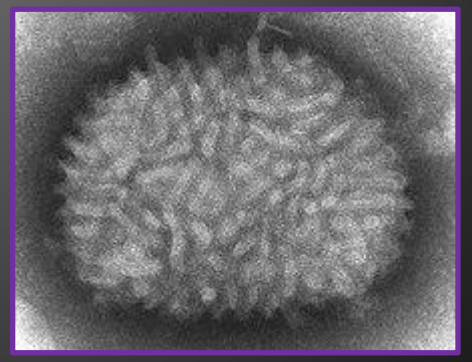
- facilità di trasfezione;
- possibilità di applicazione;
- spiccato profilo di sicurezza (il potenziale effetto collaterale sarebbe solo temporaneo).

L'efficiente diffusione in vivo di terapie a base di RNA rimane una sfida:

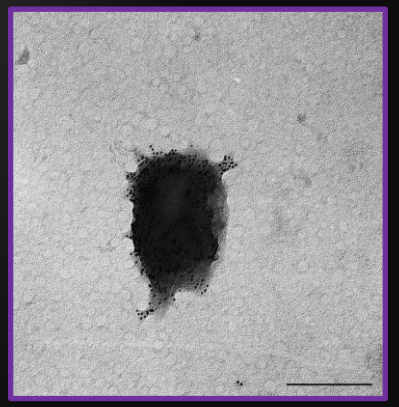
- rapida eliminazione dal sangue;
- degradazione enzimatica;
- intrappolamento intracellulare negli endosomi;
- incapacità di attraversare la membrana autonomamente.

Per migliorare la somministrazione di tali terapie è necessario un vettore di rilascio adatto:

- Il ceppo Western Reserve del Vaccinia Virus **(WR VACV)** (Fig.1A).
- Il virus Modified Vaccinia Ankara **(MVA)**, ceppo attenuato di Vaccinia Virus (Fig.1B).

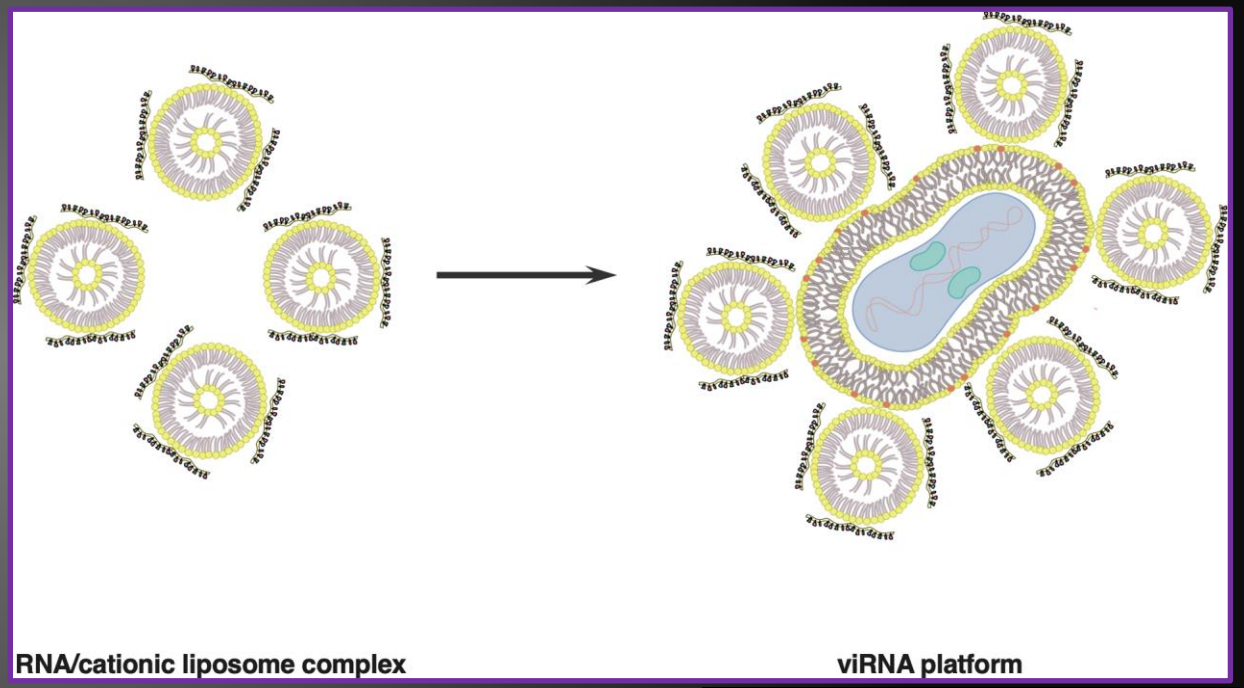


[Fig. 1A WR VACV]



[Fig.1B MVA]

Poiché il pericapside dei virus è costituito da un doppio strato lipidico derivato dalla cellula ospite, è stato ipotizzato che i **liposomi** cationici, i quali trasportano varie molecole di RNA differenti, potessero essere trasfettati attaccando quest'ultimi al peplos per formare la piattaforma **viRNA** (Fig.2).

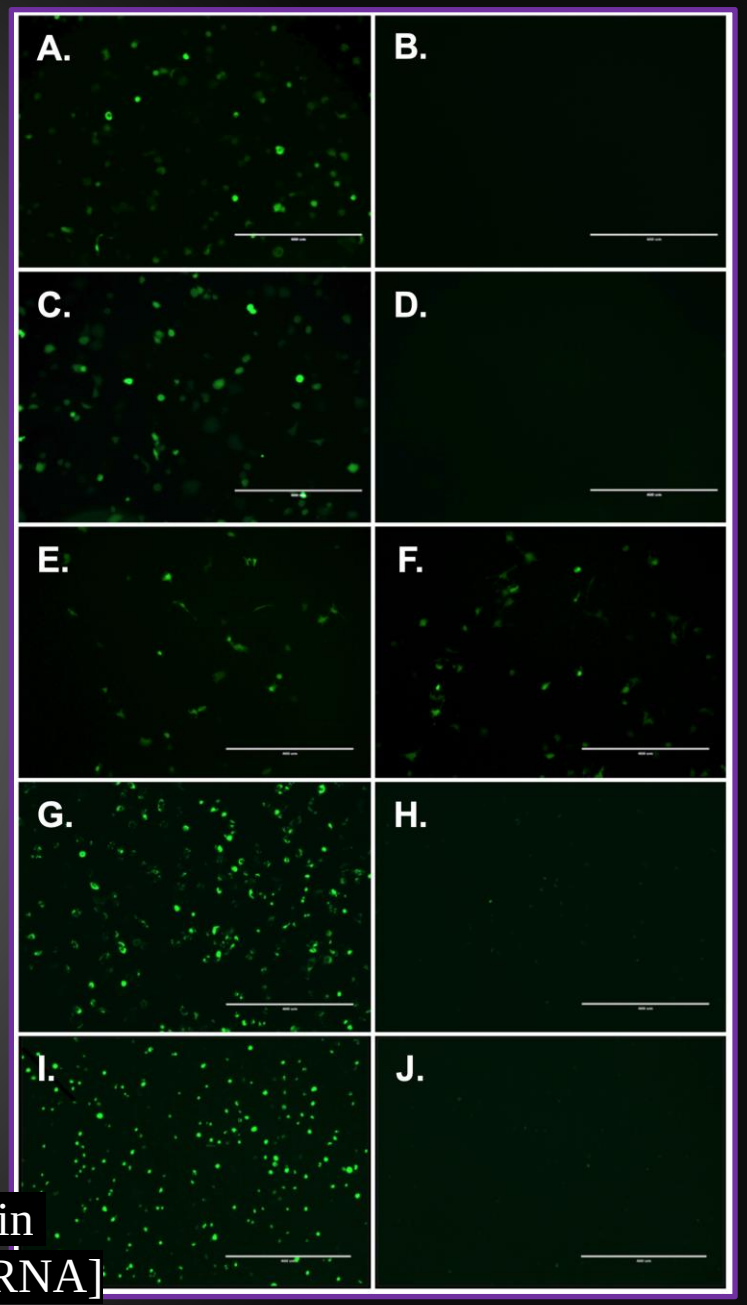


[Fig. 2, piattaforma viRNA]

In primis, è stato testato se ambedue i ceppi possono essere attaccati in modo efficiente da liposomi cationici caricati:

1. utilizzando l'RNA messaggero di EGFP, sia **viRNA-mEGFP WR** che **viRNA-mEGFP MVA** hanno dato risultati positivi (Fig. 3A e Fig. 3C);
2. utilizzando l'RNA autoamplificante del virus della foresta di Semliki (SFV), **viRNA-SA-ZsGreen WR** ha dato risultato positivo e costante dopo 24h (Fig. 3G) e dopo 4 giorni dall'infezione (Fig. 3I).

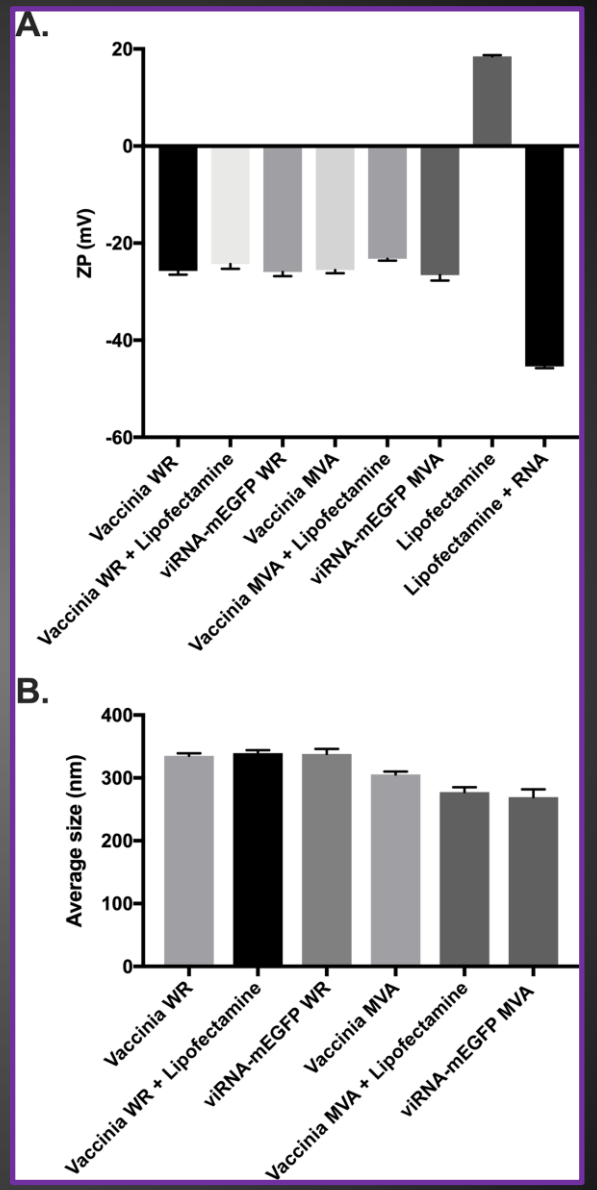
Secondariamente è stato valutato se le molecole di RNA del complesso fossero protette contro le ribonucleasi (**RNasi**) esterne (Fig. 3E e Fig.3F).



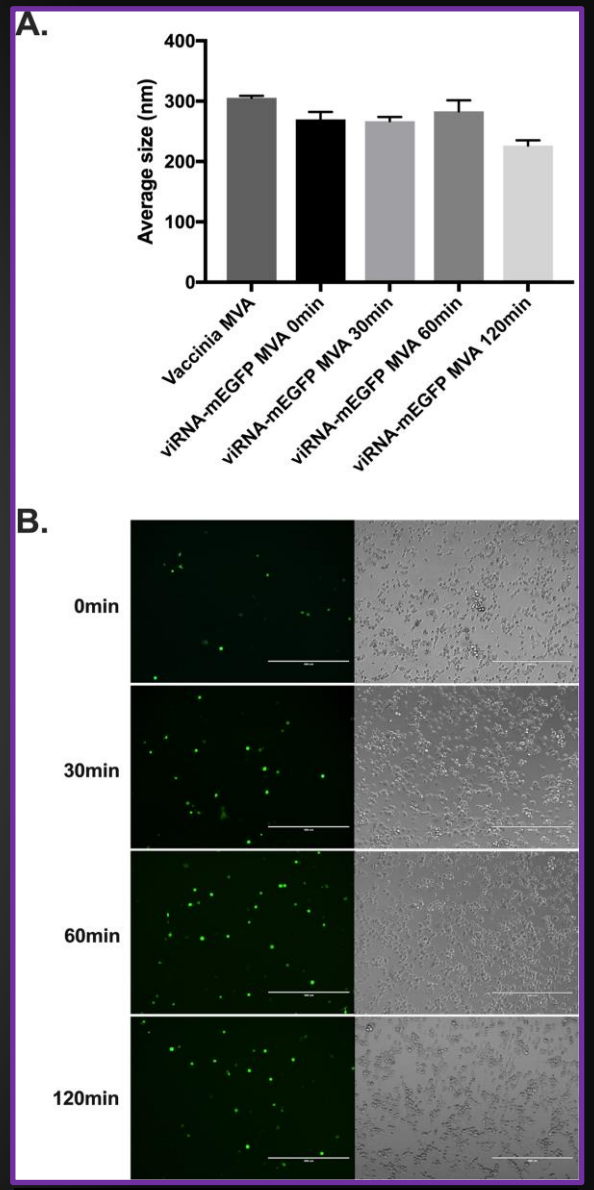
[Fig. 3, caratterizzazione in vitro della piattaforma viRNA]

Per comprendere poi le caratteristiche biofisiche della piattaforma viRNA sono stati determinati **potenziale Zeta** (ζ), **dimensioni** e **stabilità**:

- potenziale elettrocinetico e dimensioni medie dei complessi viRNA-mEGFP WR e viRNA-mEGFP MVA sono risultati simili rispettivamente a quelli di vaccinia WR e MVA (Fig. 4A e Fig. 4B);
- dopo essere stati incubati in ghiaccio, i complessi sono stati impiegati per infettare cellule A549 e non hanno mostrato né segni marcati di aggregazione né riduzione funzionale (Fig. 5A e Fig. 5B).



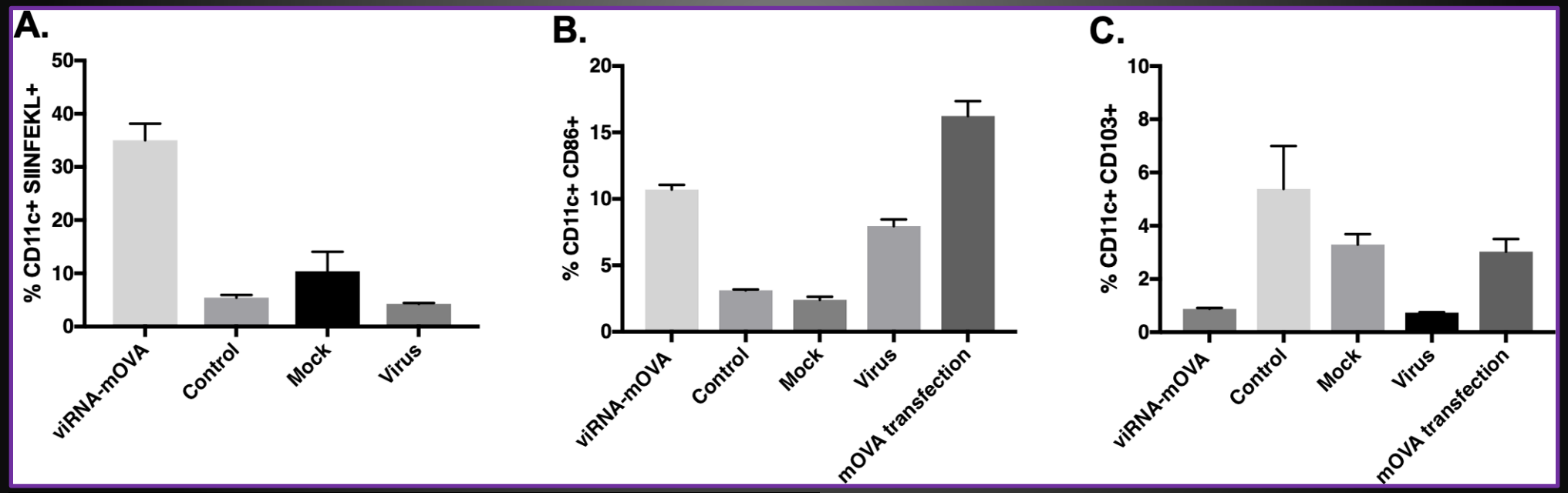
[Fig. 4, determinazione del potenziale Zeta e della taglia media]



[Fig. 5, determinazione della stabilità di viRNA]

Si è cercato di capire anche se la piattaforma di viRNA potesse essere utilizzata per lo sviluppo di vaccini: con viRNA-mOVA WR sono state infettate le BMDC e l'infezione ha portato ad un'efficiente elaborazione dell'mRNA ed alla presentazione sull'MHC-I di **SIINFEKL**, epitopo immunodominante dell'ovoalbumina (Fig. 6A).

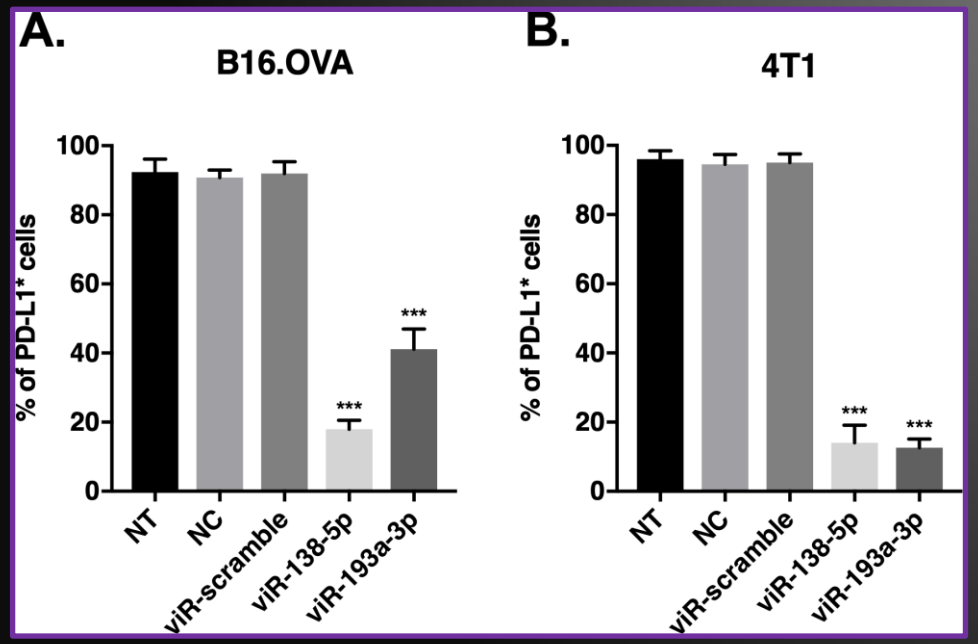
Inoltre, sono state valutate anche l'attivazione e la maturazione delle BMDC (controllando la sovra/sottoregolazione di **CD86** e **CD103**) ponendo a confronto la sola infezione da virus e l'infezione con la piattaforma, con la trasfezione del liposoma cationico contenente mRNA OVA (Fig. 6B e Fig. 6C).

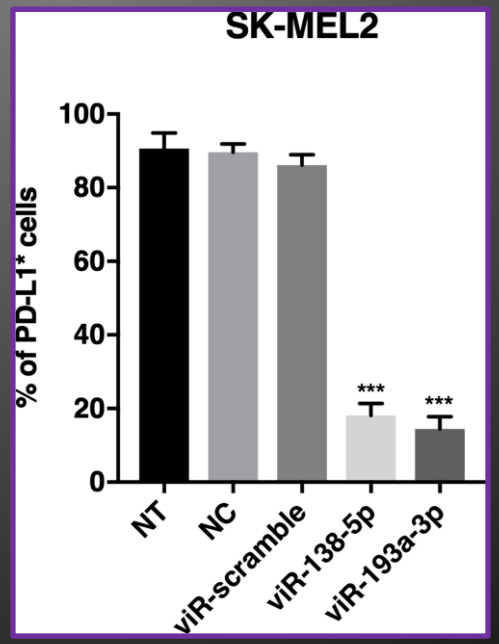


[Fig. 6, presentazione dell'antigene e attivazione delle BMDC dopo l'infezione con viRNA-mOVA]

Successivamente è stata testata l'efficienza della capacità di trasporto dei miRNA da parte del viRNA; miR-138-5p e miR-193a-3p sono stati complessati per ottenere **viR-138-5p MVA** e **viR-193a-3p MVA** il cui scopo è di sottoregolare l'espressione di PD-L1 in diverse linee cellulari:

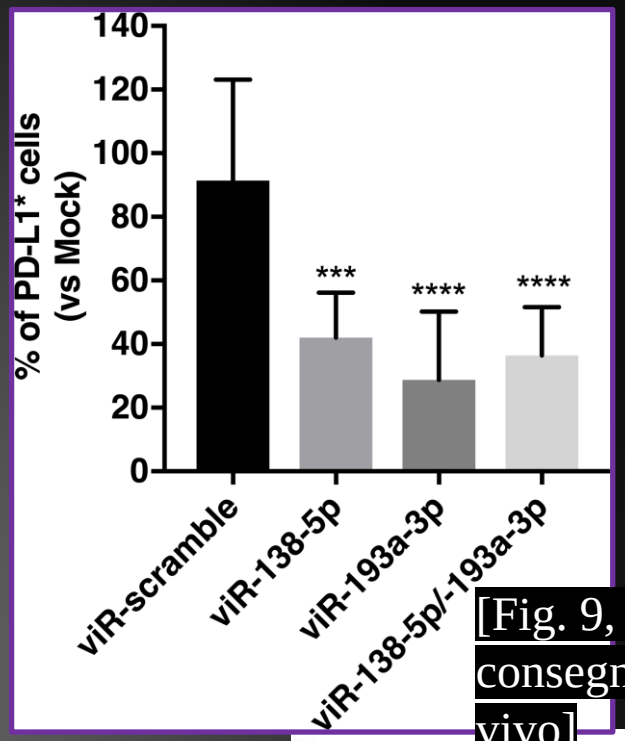
- nelle colture di **B16.OVA** il numero era diminuito rispettivamente al **21.7**% e al **44.7**% rispetto alle cellule di controllo (Fig. 7A);
- nelle colture di **4T1** il numero era diminuito rispettivamente al **14.8**% e **13.2**% rispetto alle cellule di controllo (Fig. 7B);
- nelle colture di **SK-MEL-2** il numero era diminuito rispettivamente al **21,1**% e al **16,8**% rispetto alle cellule di controllo (Fig. 8).





[Fig. 7 & Fig. 8, miRNA consegnati da viRNA inducono un'efficiente sottoregolazione dell'espressione di PD-L1]

Infine, è stata testata l'efficacia del complesso viRNA nel fornire miRNA in ambienti in vivo utilizzando topi portatori di tumori B16.OVA. Questi sono stati trattati per via intratumorale nei giorni 11 e 14 dopo l'impianto del tumore con **viR-138-5p MVA**, **viR-193a-3p MVA**, **MVA viR-138-5p/193a-3p** (viRNA con una combinazione dei due miRNA) (Fig. 9).



[Fig. 9, miRNA mimici consegnati con viRNA in vivo]

In tale ricerca è stata sviluppata una piattaforma per l'**immunovirioterapia del cancro** e la capacità di viRNA di fornire simultaneamente più miRNA differenti potrebbe consentire di ridurre contemporaneamente le diverse vie di segnalazione, così da ottenere l'effetto «anti-cancro» più evidente. Inoltre, il controllo di più percorsi è una strategia efficace per contrastare il verificarsi di resistenza. Se a tal possibilità uniamo l'ipotesi di utilizzare viRNA con virus competenti per la replicazione, ci si apre dinanzi un sipario in cui i protagonisti sono virus oncolitici accompagnati da mRNA specifici e personalizzati per il paziente.

Ylösmäki L., Polini B., Carpi S., Martins B., Smertina E., Feola S., Fusciello M., Peltonen K., Nieri P., Ylösmäki E., Cerullo V. (2019), *"Harnessing therapeutic viruses as a delivery vehicle for RNA-based therapy", in "PLoS ONE", 14(10): e0224072. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224072*