

# Nekódující RNA u solidních nádorů: od biomarkerů terapeutickým cílům

prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.

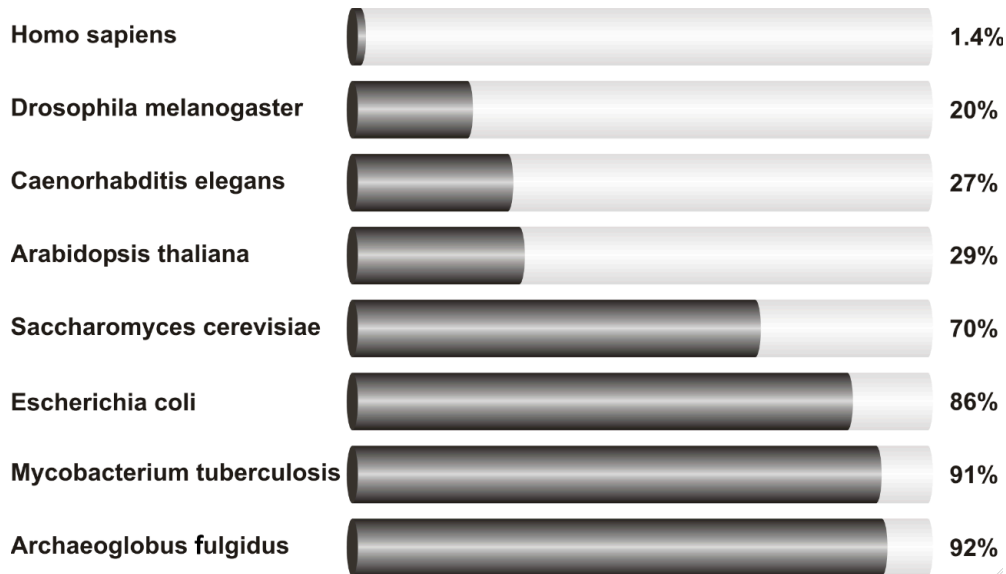
*Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita  
Masarykův onkologický ústav  
Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF Univerzity Karlovy*



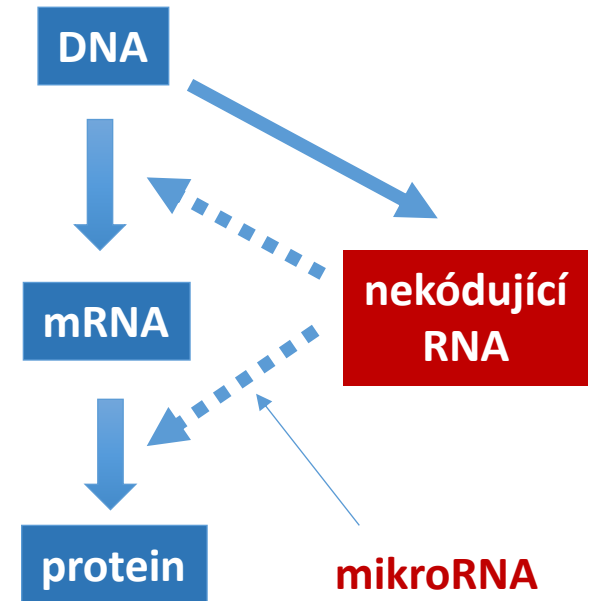
1. LÉKAŘSKÁ  
FAKULTA  
Univerzita Karlova

# Proč jsou nekódující RNA důležité?

kódující geny představují méně než 2% sekvence lidského genomu  
vs.  
téměř 80% lidského genomu je aktivně přepisováno do struktury RNA



Sana et al, J Transl Med, 2012



Komplexnost organismů narůstá s genomovým obsahem nekódujících RNA.

Nekódující RNA představují novou úroveň regulace genové exprese v biologických systémech.

# mikroRNAs



	Class	Symbol	Characteristic	Disease / biological function associations
Small non-coding RNAs	MicroRNAs	miRNAs	18–25 nt; account 1–2% of the human genome; control the 50% of protein-coding genes; guide suppression of translation; Drosha and Dicer dependent small ncRNAs	initiation of various disorders including many, if not all, cancers / regulation of proliferation, differentiation, and apoptosis involved in human development
	Small interfering RNAs	siRNAs	19–23 nt; made by Dicer processing; guide sequence specific degradation of target mRNA	great potential in diseases treatment / posttranscriptional gene silencing mainly through RISC degradation mechanism; defence against pathogenic nucleic acids
	Piwi-interacting RNAs	piRNAs	26–30 nt; bind Piwi proteins; Dicer independent; exist in genome clusters; principally restricted to the germline and somatic cells bordering the germline	relationship between piRNAs and diseases has not yet been discovered / involved in germ cell development, stem self-renewal, and retrotransposon silencing
	Small nucleolar RNAs	snoRNAs	60–300 nt; enriched in the nucleolus; in vertebrate are excised from pre-mRNA introns; bind snoRNP proteins	association with development of some cancers / important function in the maturation of other non-coding RNAs, above all, rRNAs and snRNAs; miRNA-like snoRNAs regulate mRNAs
	Promoter-associated small RNAs	PASRs	20–200 nt; modified 5' (capped) ends; coincide with the transcriptional start sites of protein- and non-coding genes; made from transcription of short capped transcripts	relationship with diseases has not yet been discovered / involved in the regulation of the transcription of protein-coding genes by targeting epigenetic silencing complexes
	Transcription initiation RNAs	tiRNAs	~ 18 nt ; have the highest density just downstream of transcriptional start sites; show patterns of positional conservation; preferentially located in GC-rich promoters	
	Centromere repeat associated small interacting RNAs	crasiRNAs	34–42 nt; processed from long dsRNAs	relationship between crasiRNAs and diseases has not yet been discovered / involved in the recruitment of heterochromatin and/or centromeric proteins
	Telomere-specific small RNAs	tel-sRNAs	~ 24 nt; Dicer independent; 2'-O-methylated at the 3' terminus; evolutionarily conserved from protozoa to mammals; have not been described in human up to now	relationship between tel-sRNAs and diseases has not yet been discovered / epigenetic regulation
		Pyknons	subset of patterns of variable length; form mosaics in untranslated and protein-coding regions; more frequently in 3' UTR	expected association with cancer biology / possible link with posttranscriptional silencing of genes, mainly involved in cell communication, regulation of transcription, signaling, transport, etc.
	Long non-coding RNAs	Long intergenic non-coding RNAs	lincRNAs	ranging from several hundreds to tens of thousands nts; lie within the genomic intervals between two genes; transcriptional cis-regulation of neighbouring genes
Long intronic non-coding RNAs			lie within the introns; evolutionary conserved; tissue and subcellular expression specified	aberrantly expressed in human cancers / possible link with posttranscriptional gene silencing
Telomere-associated ncRNAs		TERRAs	100 bp - >9 kb; conserved among eukaryotes; synthesized from C-rich strand; polyadenylated; form inter-molecular G-quadruplex structure with single-stranded telomeric DNA	possible impact on telomere-associated diseases including many cancers / negative regulation of telomere length and activity through inhibition of telomerase
Long non-coding RNAs with dual functions			both protein-coding and functionally regulatory RNA capacity	deregulation has been described in breast and ovarian tumors / modulate gene expression through diverse mechanisms
Pseudogene RNAs			gene copies that have lost the ability to code for a protein; potential to regulate their protein-coding cousin; made through retrotrans-position; tissue specific	often deregulated during tumorigenesis and cancer progression / regulation of tumor suppressors and oncogenes by acting as microRNA decoys
	Transcribed-ultraconserved regions	T-UCRs	longer than 200 bp; absolutely conserved between orthologous regions of human, rat, and mouse; located in both intra- and intergenic regions	expression is often altered in some cancers; possible involvement in tumorigenesis / antisense inhibitors for protein-coding genes or other ncRNAs

## Nové třídy nekódujících RNA

### Short Communication

Oncology 2012;82:114–118  
DOI: 10.1159/000336479

Received: November 16, 2011  
Accepted after revision: January 4, 2012  
Published online: February 11, 2012

Oncology

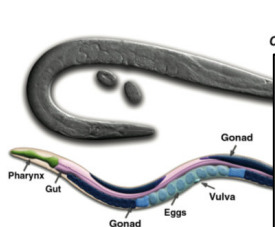
## Expression Levels of Transcribed Ultraconserved Regions *uc.73* and *uc.388* Are Altered in Colorectal Cancer

J. Sana<sup>a,b</sup> S. Hankeova<sup>a</sup> M. Svoboda<sup>a</sup> I. Kiss<sup>a</sup> R. Vyzula<sup>a</sup> O. Slaby<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Department of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, and <sup>b</sup>Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

# Historie

1993 Ambros, Ruvkun – objev miRNA -lin-4



Cell, 1993



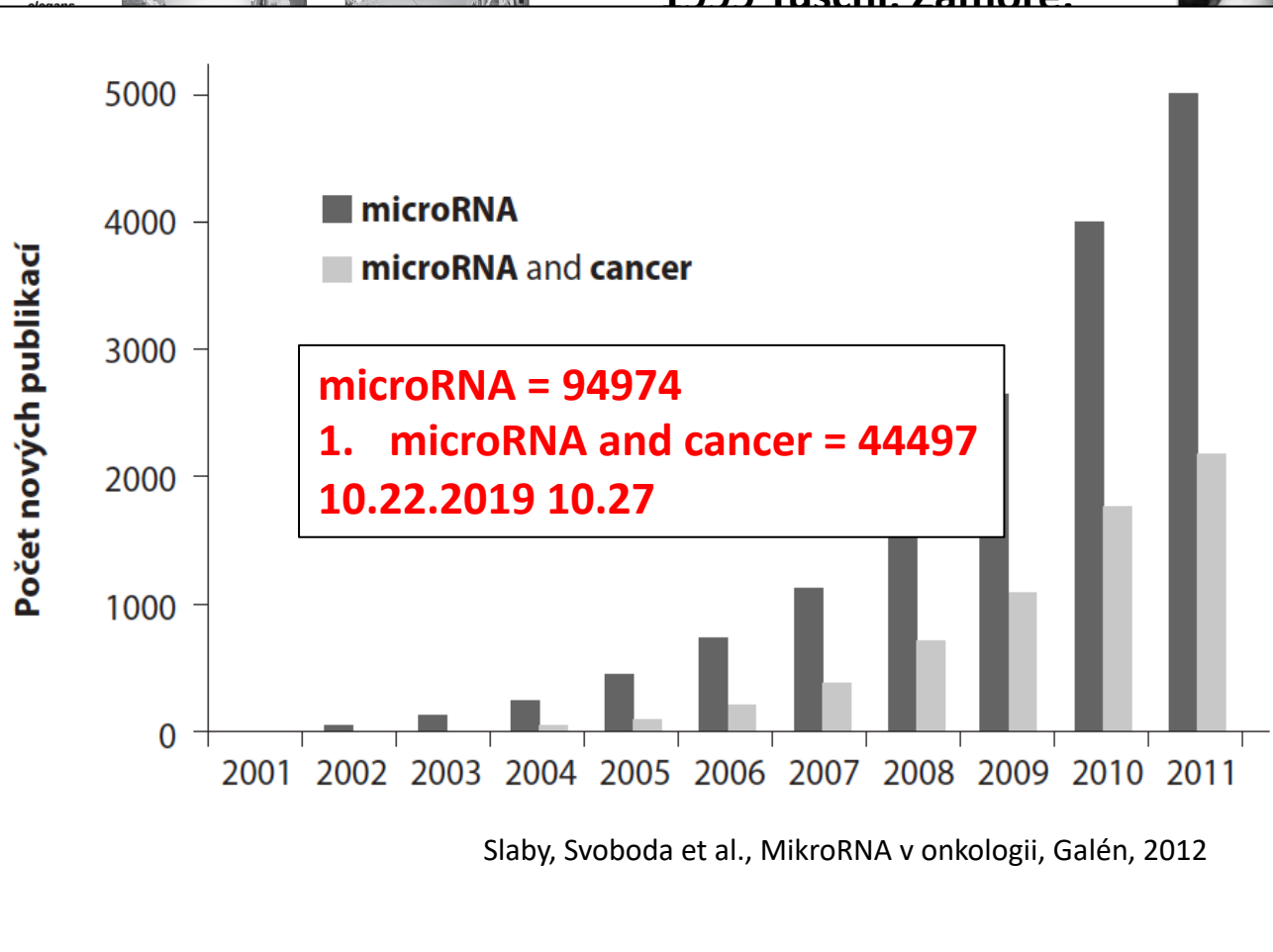
1998 Fire, Mello – RNA interference

1999 Tuschl, Zamore.

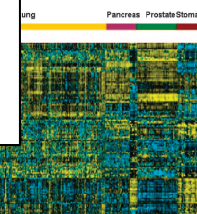


Prize winners  
and Craig Mello for  
of the RNAi

Nature, 1998



kání



PNAS, 2006

3

miRNA u nádorů od českých autorů  
Pátá v oblasti kolorektálního karcinomu (KRK)  
Dnes > 2000 publikací zaměřených na miRNA u KRK

MikroRNA představují extrémně rychle rostoucí oblast molekulární biologie a poznatky o nich se již staly jedním ze základních stavebních kamenů nádorové biologie. Z tohoto postavení vyplývá i potenciální využití mikroRNA v klinické praxi, a to jak v diagnostice, tak v terapii nádorových onemocnění. To, že se jedná o reálné předpoklady, dokazuje i vstup prvních léčiv na bázi mikroRNA do klinických hodnocení.

První monografie na toto téma v naší literatuře přináší informace o základních principech biologie mikroRNA a metodách jejich studia, ale především systematicky zpracovává zapojení mikroRNA do patogeneze hlavních skupin solidních a hematologických malignit, s užším zaměřením na využití mikroRNA jako biomarkerů v diagnostické a prediktivní onkologii a pro terapeutické účely. Monografii připravil autorský kolektiv odborníků, kteří mají praktické zkušenosti s výzkumem mikroRNA a své poznatky publikují v mezinárodních odborných časopisech.

[www.galen.cz](http://www.galen.cz)



**MIKRORNA V ONKOLOGII**

Ondřej Slabý, Marek Svoboda et al.



Ondřej Slabý  
Marek Svoboda et al.

# MIKRORNA V ONKOLOGII



GALÉN

# Úvod do biologie mikroRNA

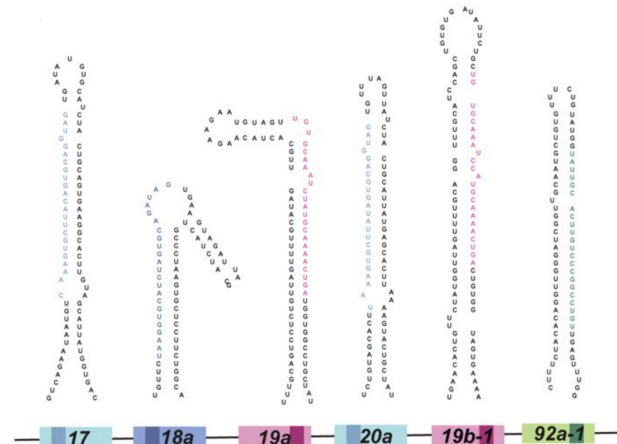
- miRNA jsou krátké nekódující RNA post-transkripčně regulující genovou expresi
- maturovaná miRNA je dlouhá 20-25 nukleotidů
- v databázi miRBase je anotováno 2549 lidských miRNA\*
- tyto miRNA mají potenciál regulovat více než polovinu lidského genomu
- jedna miRNA může regulovat desítky až stovky cílových mRNA
- miRNA často tvoří klastry nebo sekvenční rodiny (např. klastr miR-17, rodina let-7)

## Rodina mikroRNA let-7

let-7a-1	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
let-7a-2	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
let-7a-3	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU
let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGUU
let-7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU-
let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU-
let-7f-1	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
let-7f-2	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
let-7g	UGAGGUAGUAGUUUGUAACAGU-
let-7i	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGU-

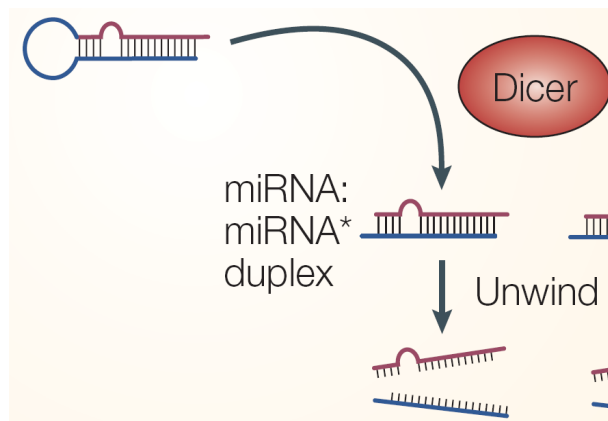
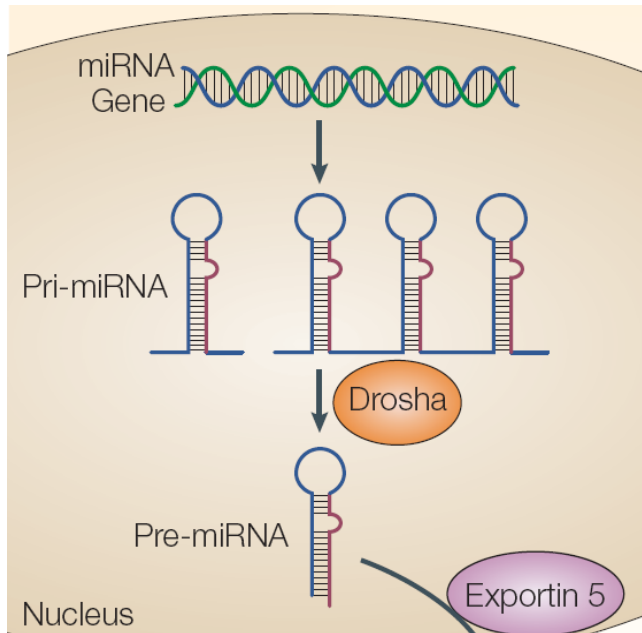
Lodish et al, Nature, 2008

## Klastr miR-17-92



Olive et al, Genes Development, 2009

# Kanonická dráha biogeneze a biologické funkce mikroRNA



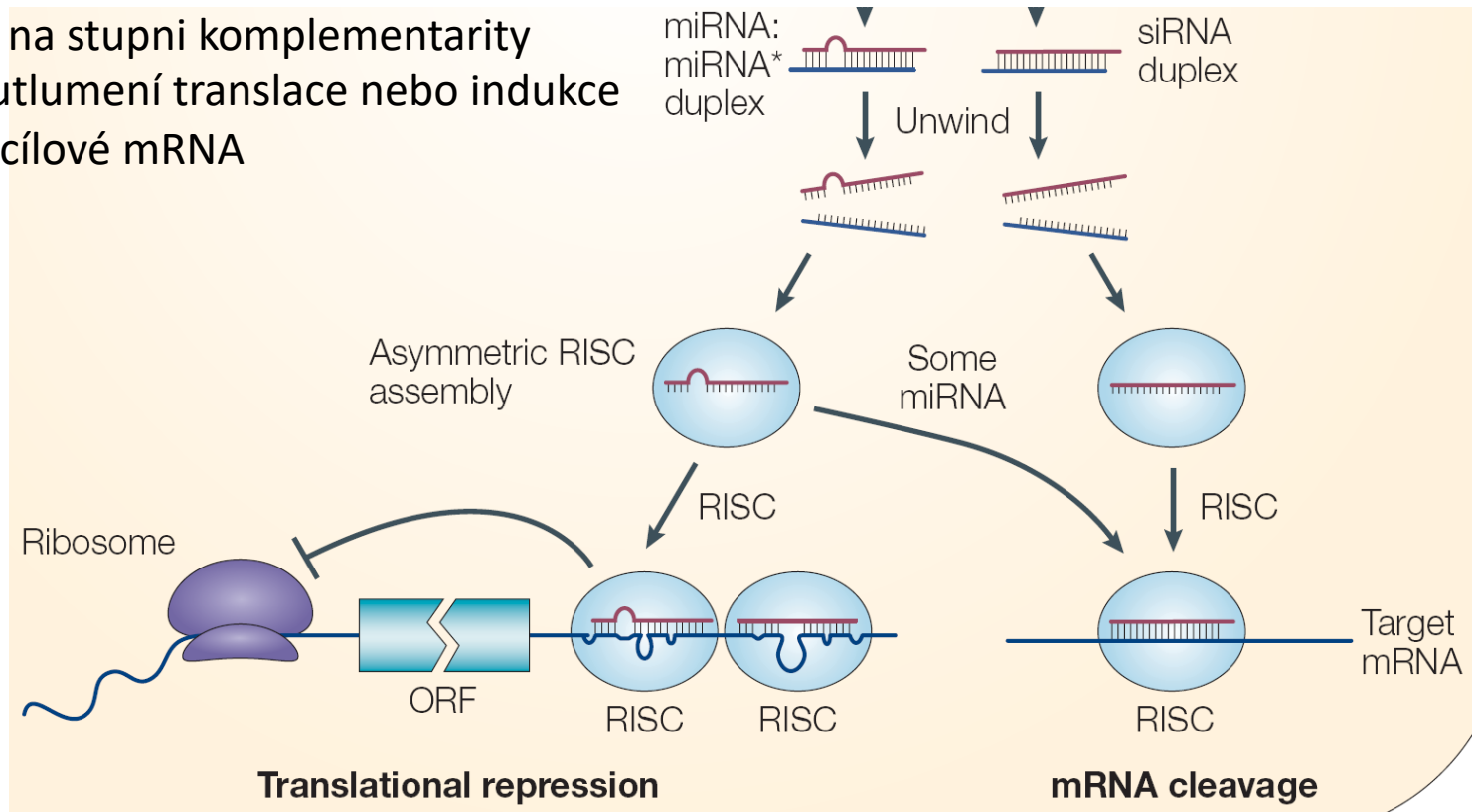
1. Transkripce genu pro miRNA pomocí RNA polymerázy II
2. pri-miRNA je zpracována ribonukleázami Drosha a Pasha
3. pre-miRNA je exportována z jádra do cytoplazmy pomocí proteinu Exportin 5
4. pre-miRNA je v cytoplazmě dále štěpena pomocí ribonukleázy Dicer

# Kanonická dráha biogeneze a biologické funkce mikroRNA

*microRNA: licensed to kill messenger*

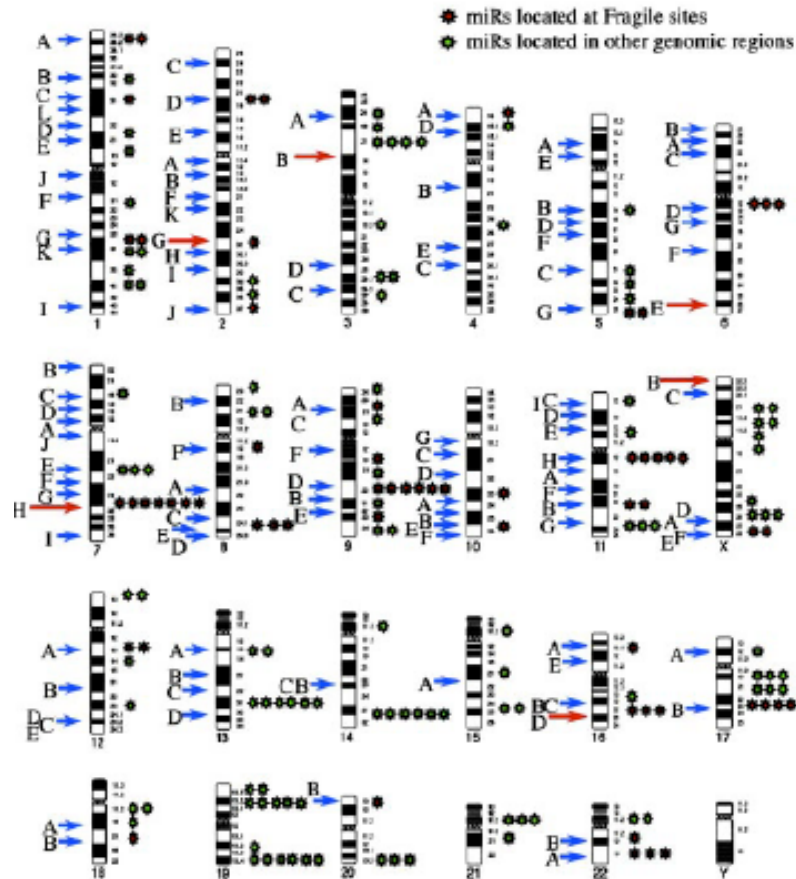
5. Vedoucí řetězec z maturovaného duplexu miRNA je začleněn do multiproteinového komplexu miRISC, který se váže na cílovou mRNA.

6. V závislosti na stupni komplementarity proběhne utlumení translace nebo indukce degradace cílové mRNA





# MikroRNA vstupují do nádorové biologie



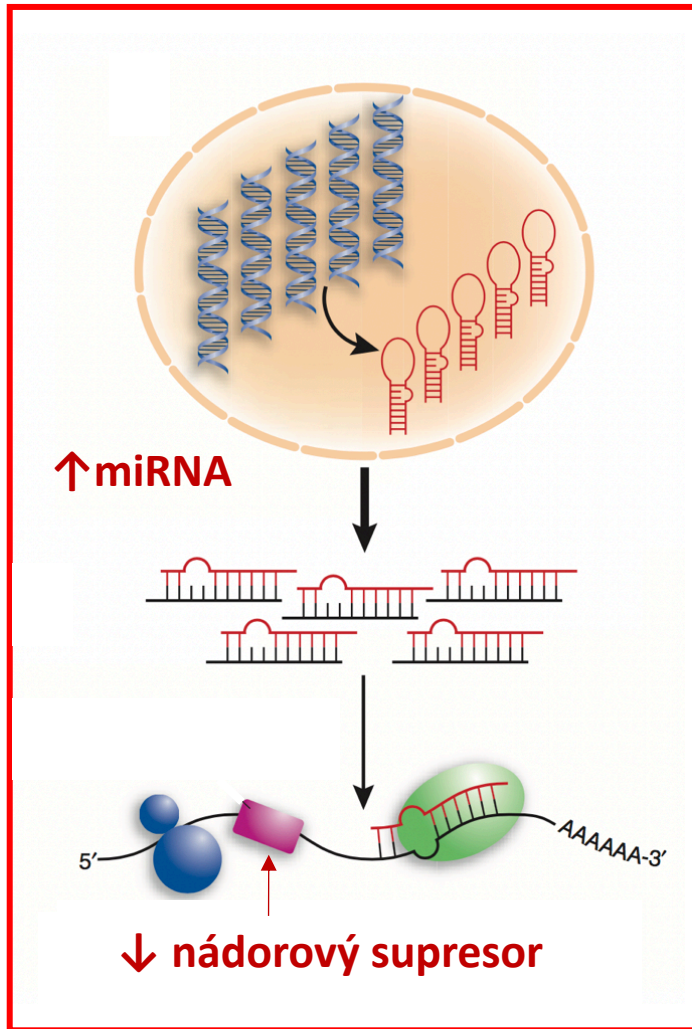
Calin et al., PNAS, 2004

Přibližně 50% známých genů pro miRNA leží ve fragilních částech oblastech chromozómů, které jsou často zmnoženy nebo ztraceny v nádorových buňkách

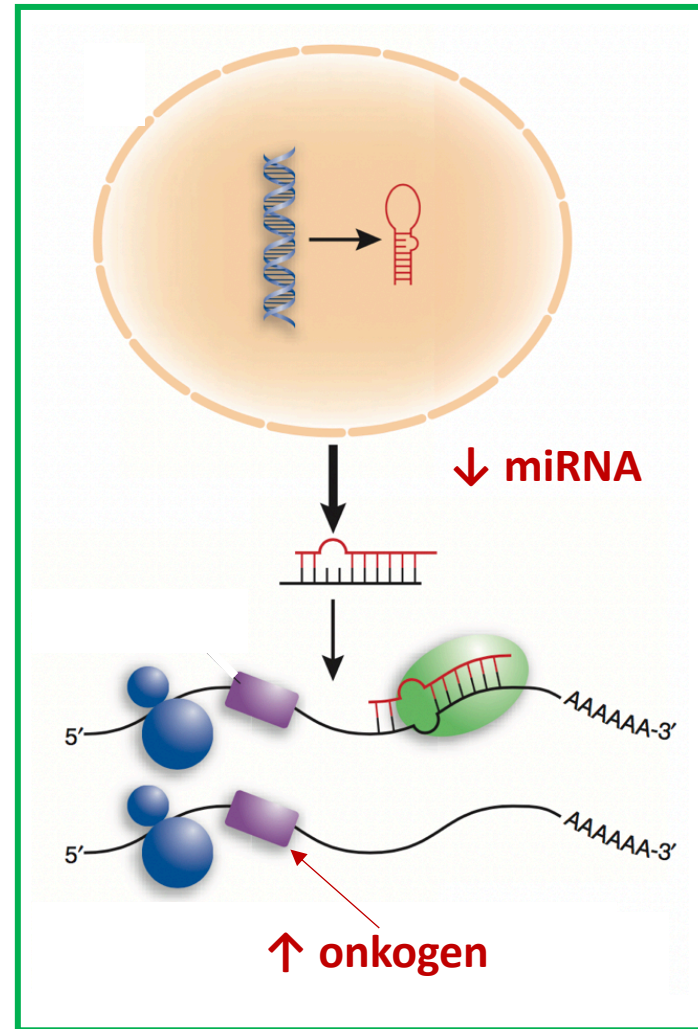
Geny pro miR-15a a miR-16a leží v regionu 13q14, který je často deletován u CLL

# Role mikroRNA v nádorové buňce

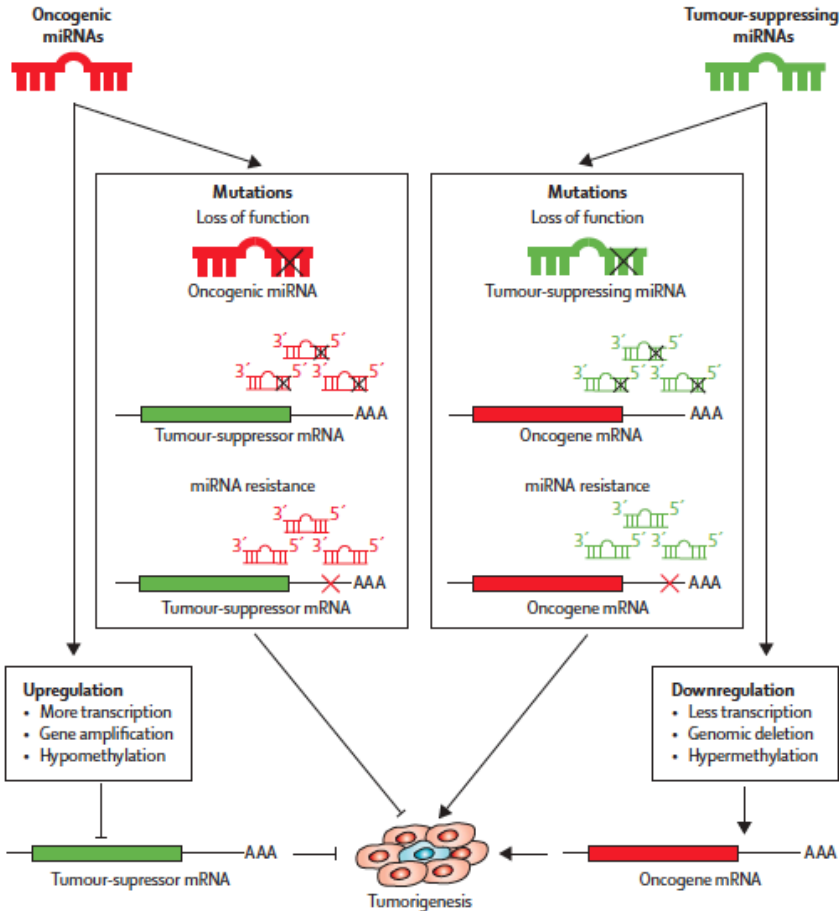
## ONKOGENNÍ MIKRORNA



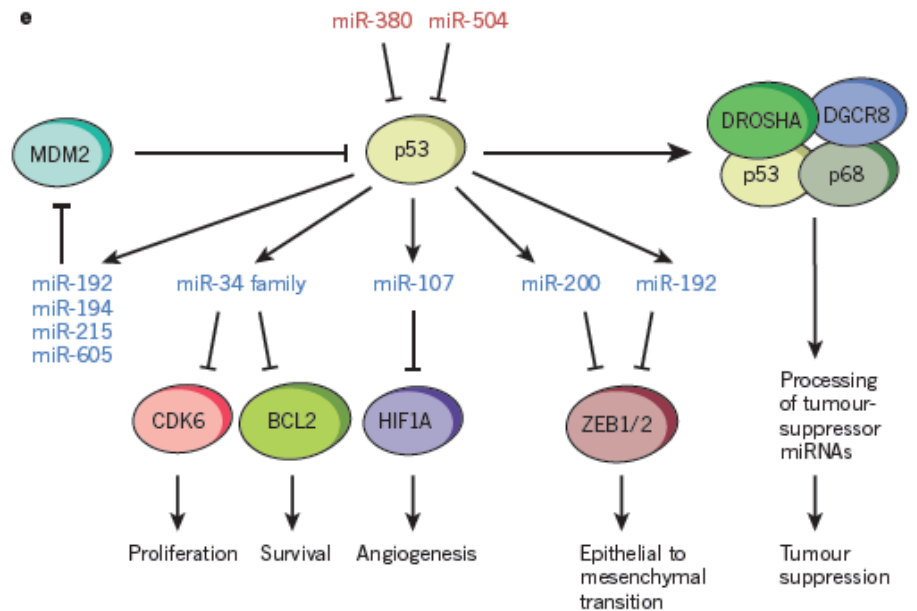
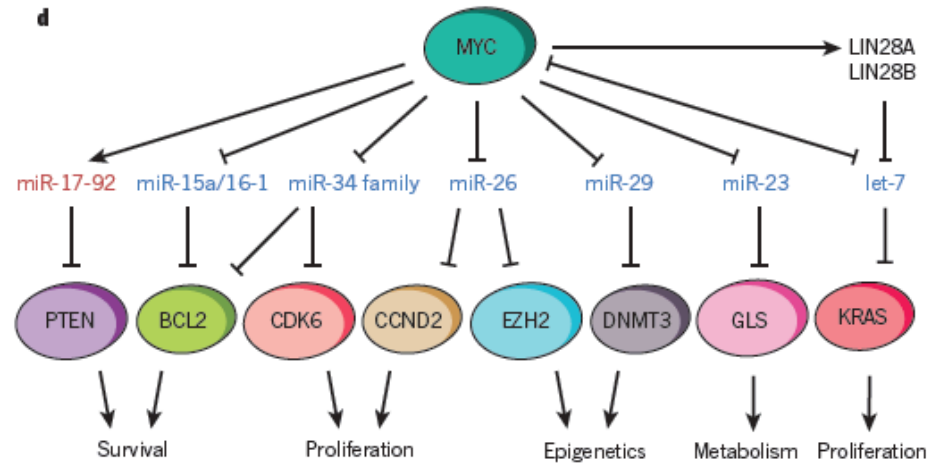
## SUPRESOROVÁ MIKRORNA



# MikroRNA fungující jako onkogeny a nádorové supresory

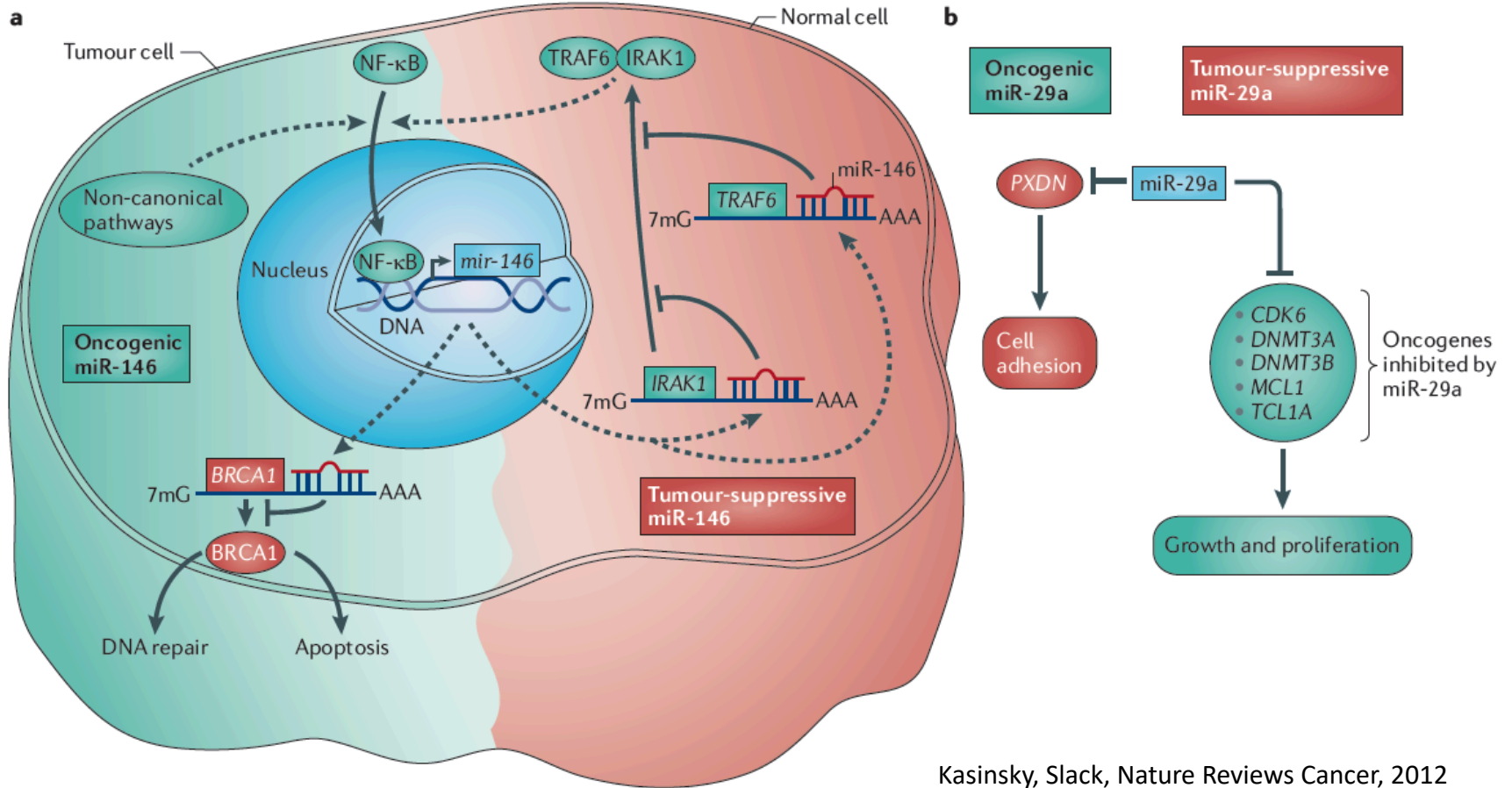


Kong et al, Lancet Oncology 2012



Lujambio, Nature 2012

# MikroRNA jako onkogeny nebo TS v závislosti na kontextu



Kasinsky, Slack, Nature Reviews Cancer, 2012

# Využití mikroRNA v diagnostice a léčbě kolorektálního karcinomu

## **CIKRULUJÍCÍ MIKRORNA JAKO DIAGNOSTICKÉ BIOMARKERY**

### **MODELOVÁ STUDIE 1**

Sérové mikroRNA v diagnostice kolorektálního karcinomu



## **MIKRORNA JAKO TKÁŇOVÉ BIOMARKERY**

### **MODELOVÁ STUDIE 2**

Tkáňové mikroRNA jako prediktivní biomarkery odpovědi na léčbu protilátkami proti EGFR u metastatického kolorektálního karcinomu



## **MIKRORNA JAKO TERAPEUTICKÉ CÍLE**

### **MODELOVÁ STUDIE 3**

Charakterizace miR-215 jako terapeutického cíle u kolorektálního karcinomu

# MikroRNA jsou přítomny v různých typech tělních tekutin

**bjh** short report

## Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma

Charles H. Lawrie,<sup>1</sup> Shira Gal,<sup>1</sup> Heather M. Dunlop,<sup>1</sup> Beena Pushkaran,<sup>1</sup> Amanda P. Liggins,<sup>1</sup> Karen Pulford,<sup>1</sup> Alison H. Banham,<sup>1</sup> Francesco Pezzella,<sup>1</sup> Jacqueline Boulton,<sup>1</sup> James S. Wainscoat,<sup>1</sup> Christian S. R. Hatton<sup>2</sup> and Adrian L. Harris<sup>3</sup>

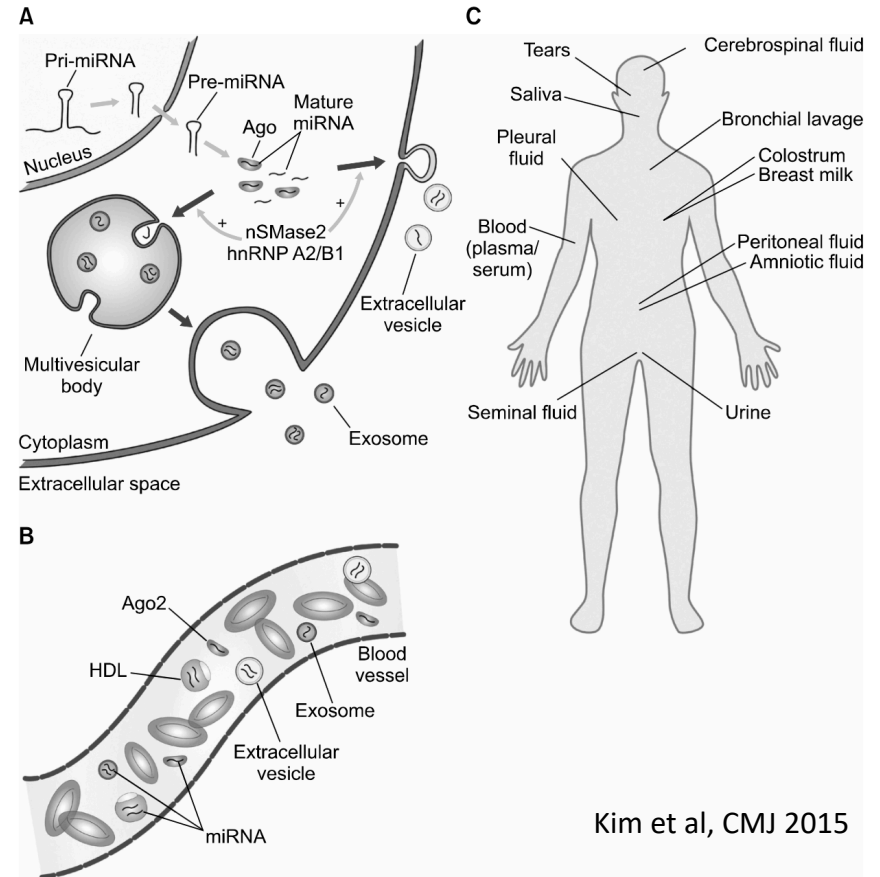
<sup>1</sup>Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, <sup>2</sup>Department of Haematology, John Radcliffe Hospital, and <sup>3</sup>Cancer Research UK, Molecular Oncology Laboratories, Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, Oxford, UK

### Summary

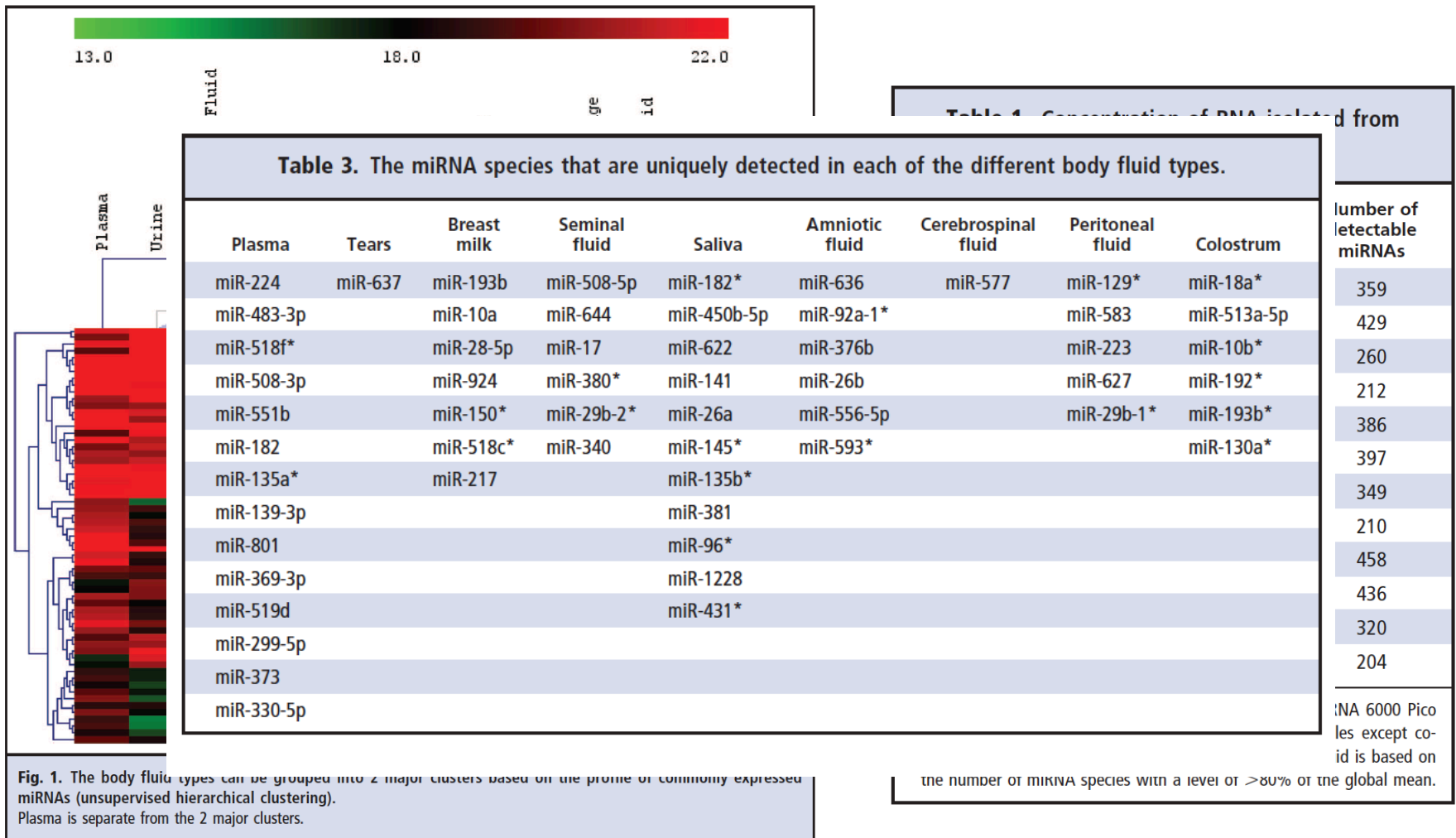
Circulating nucleic acids have been shown to have potential as non-invasive diagnostic markers in cancer. We therefore investigated whether microRNAs also have diagnostic utility by comparing levels of tumour-associated *MIRN155* (*miR-155*), *MIRN210* (*miR-210*) and *MIRN21* (*miR-21*) in serum from diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients ( $n = 60$ ) with healthy controls ( $n = 43$ ). Levels were higher in patient than control sera ( $P = 0.009, 0.02$  and  $0.04$  respectively). Moreover, high *MIRN21* expression was associated with relapse-free survival ( $P = 0.05$ ). This is the first description of circulating microRNAs and suggests that microRNAs have potential as non-invasive diagnostic markers for DLBCL and possibly other cancers.

**Keywords:** microRNA, diffuse large B-cell lymphoma, lymphoma, sera, plasma.

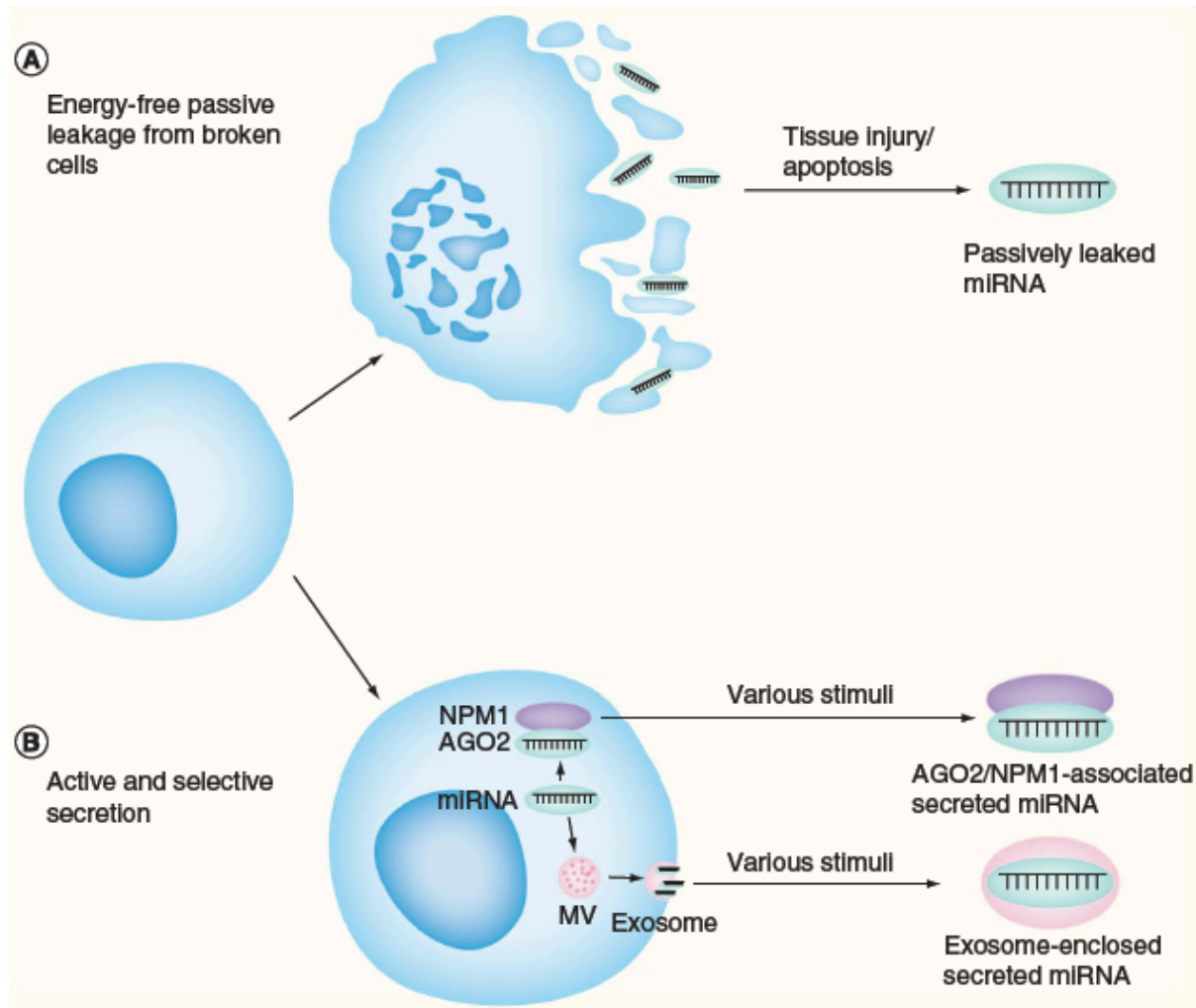
Or roku 2008 více než 800 citací



# MikroRNA jsou přítomny v různých typech tělních tekutin

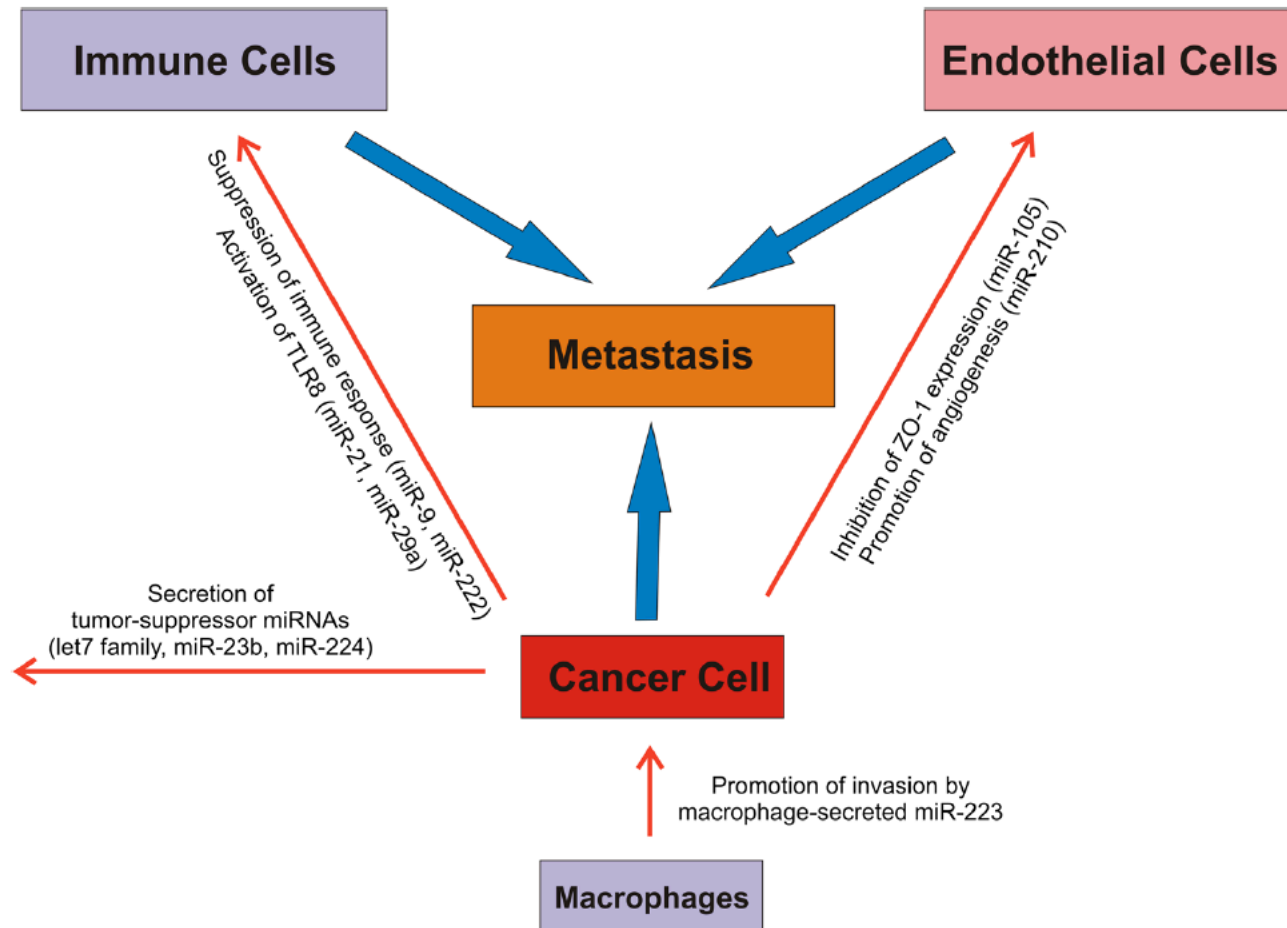


# Uvolňování mikroRNA do cirkulace a jejich formy



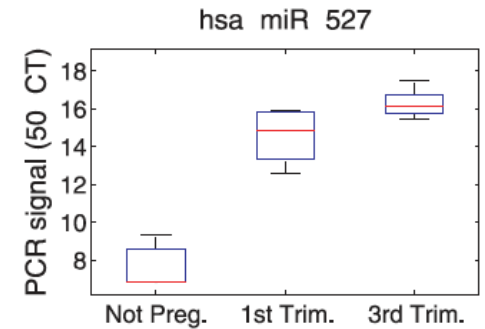
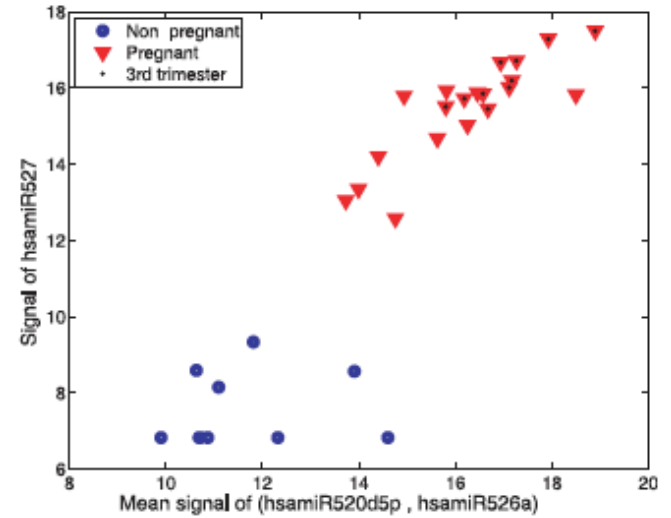
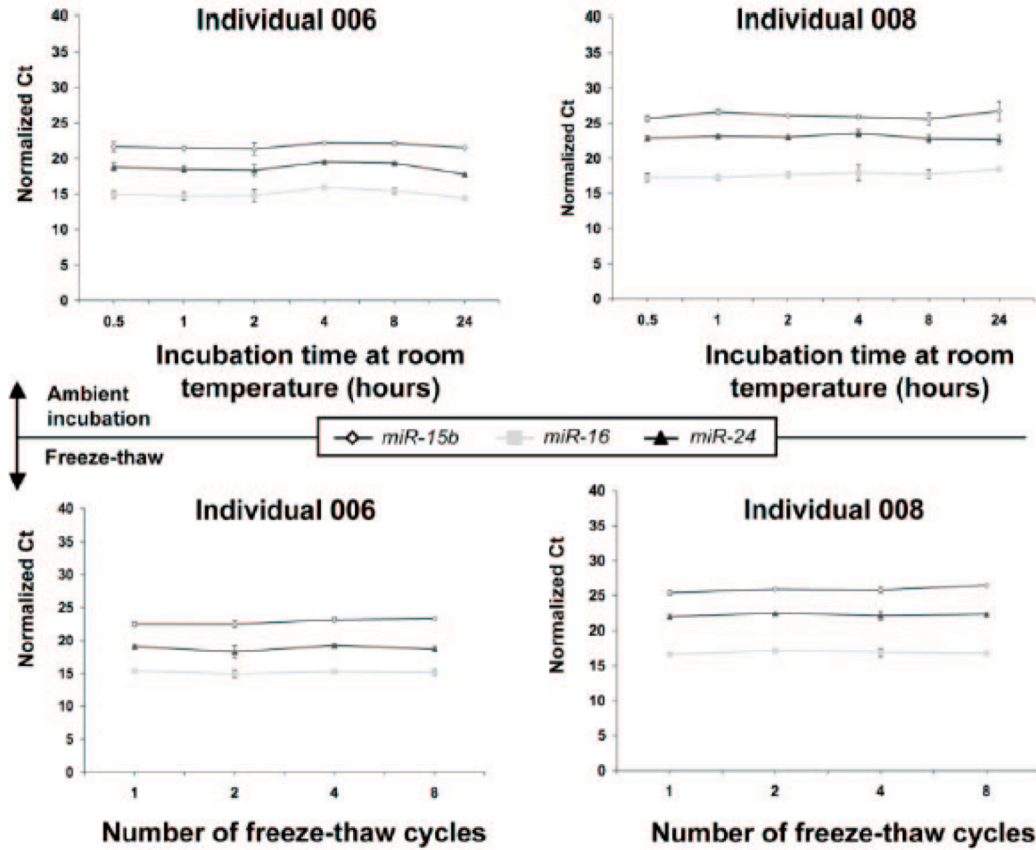


# MikroRNA v exosomech jako komunikační kanál v rámci nádorového mikroprostředí



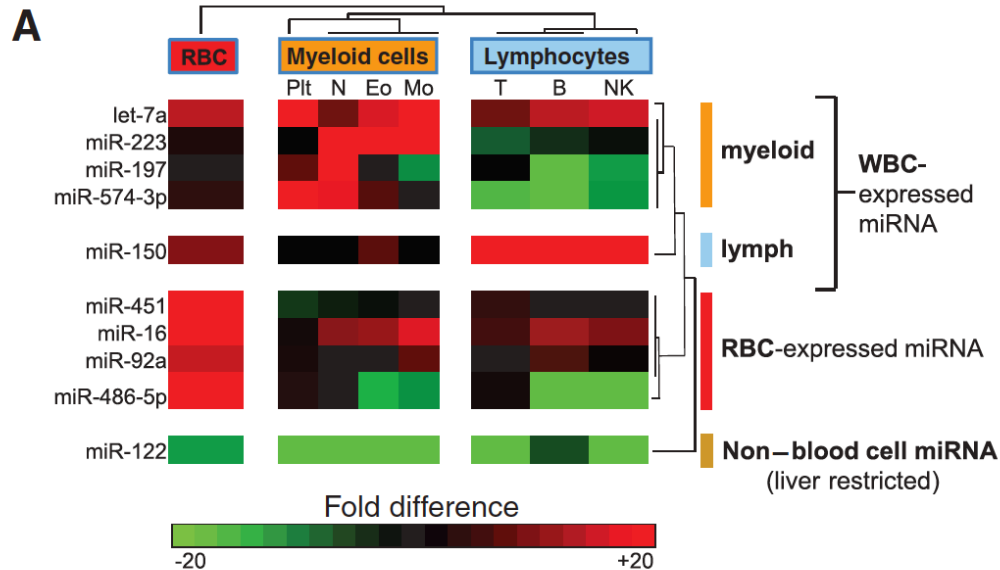
# Stabilita cirkulujících mikroRNA

A

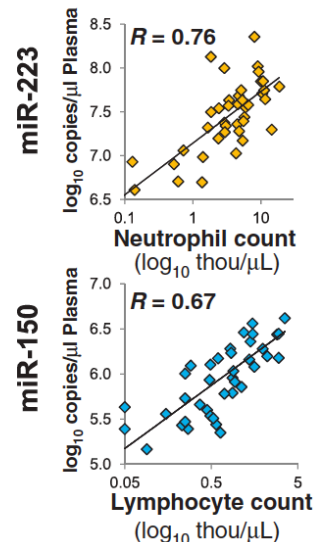
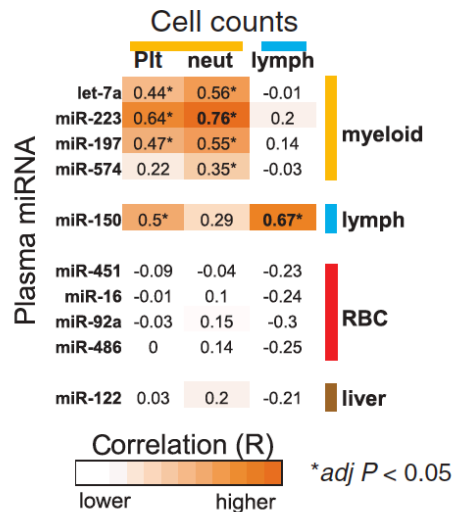


Gilad et al., 2008

# Plazmatické a sérové profily mikroRNA jsou kontaminovány mikroRNA pocházejícími z krevních buněk



**B** Plasma miRNA expressed by WBC correlate to blood counts

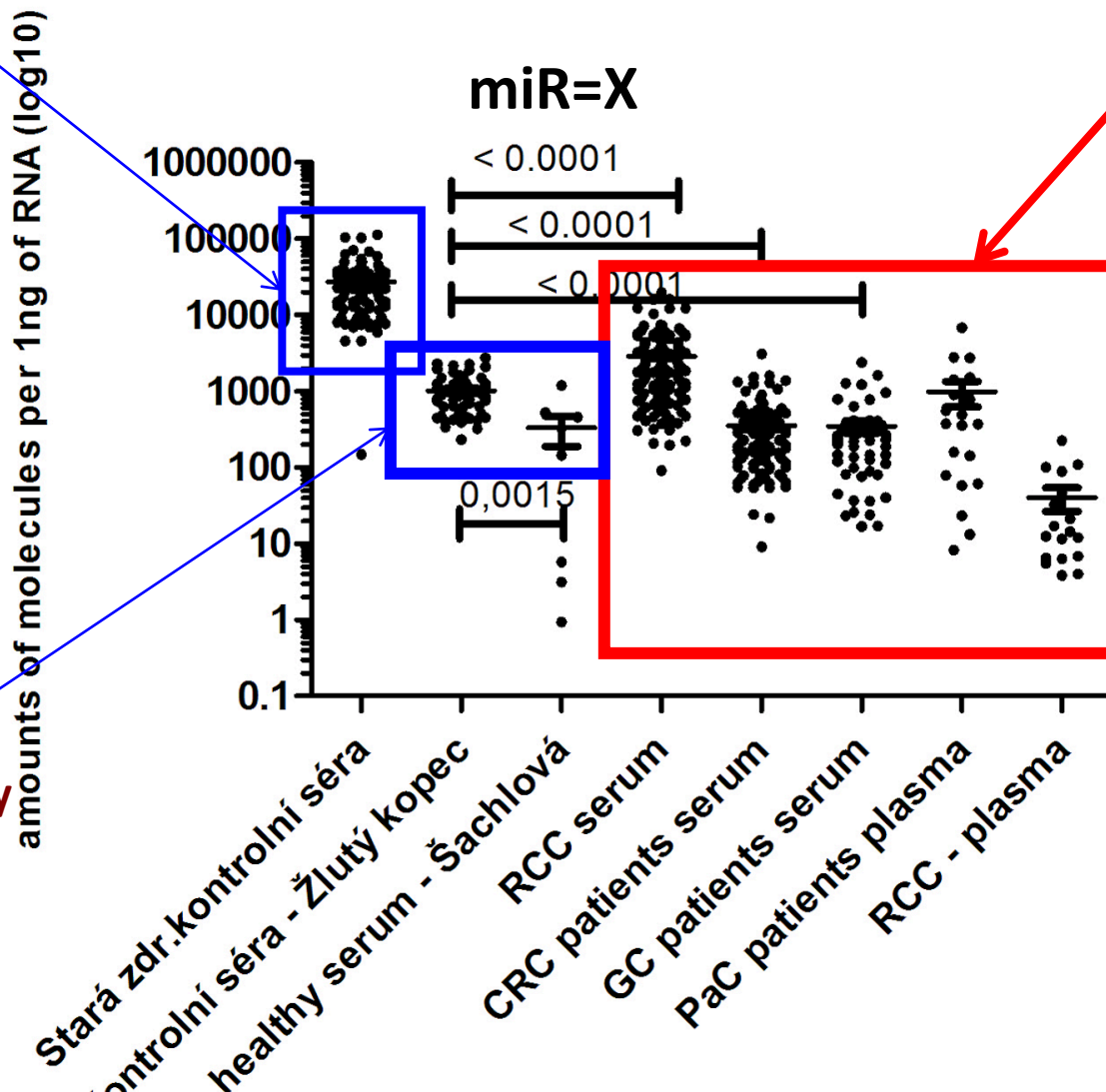


# Rozdílná logistika a zpracování vzorků ovlivňuje hladiny mikroRNA

Serum of healthy donors  
Hospital A

Serum/plasma  
samples of RCC, CRC, GC

DIFFERENCES  
IN SERUM  
PREPARATION  
!!!!



Serum of healthy  
donors  
Hospital B and C

# Sérové mikroRNA jako biomarkery pro časnou diagnostiku a stanovení prognózy pacientů s kolorektálním karcinomem

424 pacientů s kolorektálním karcinomem (KRK)  
276 kontrolních osob

## MODELOVÁ STUDIE 1

**54 miRNA s rozdílnými hladinami v krevním séru pacientů s KRK ( $P < 0.01$ )**

### EXPLORATIVNÍ FÁZE

Sekvenování nové generace (Illumina)  
144 pacientů s KRK, 96 kontrol



### TRÉNINKOVÁ FÁZE

RT-qPCR, vývoj DXscore  
80 pacientů s KRK, 80 kontrol

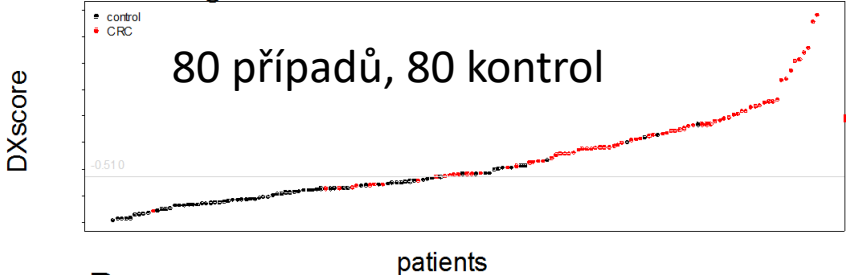


### VALIDAČNÍ FÁZE

RT-qPCR, validace DXscore  
200 pacientů s KRK, 100 kontrol

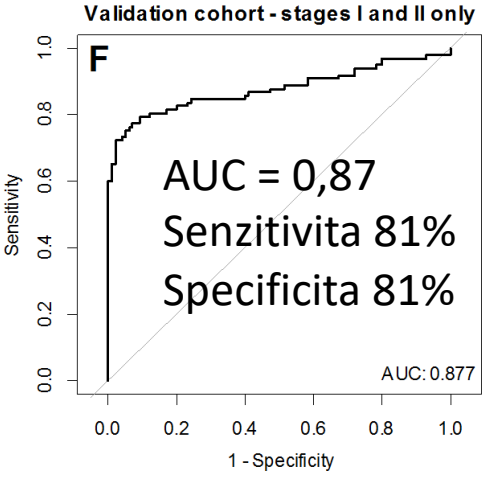
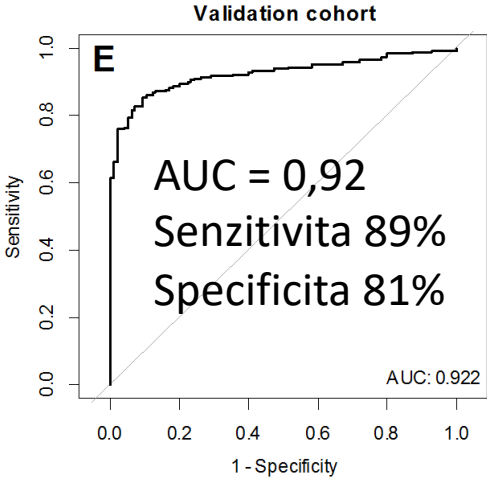
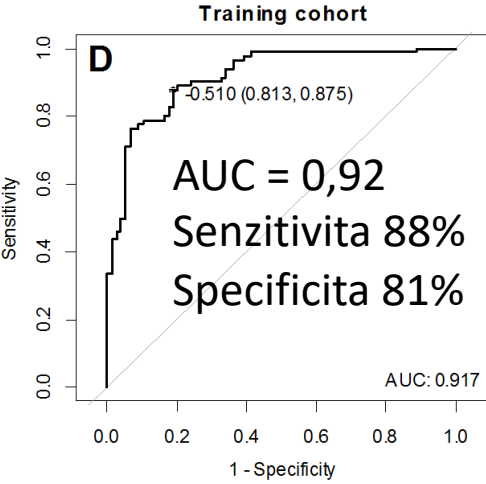
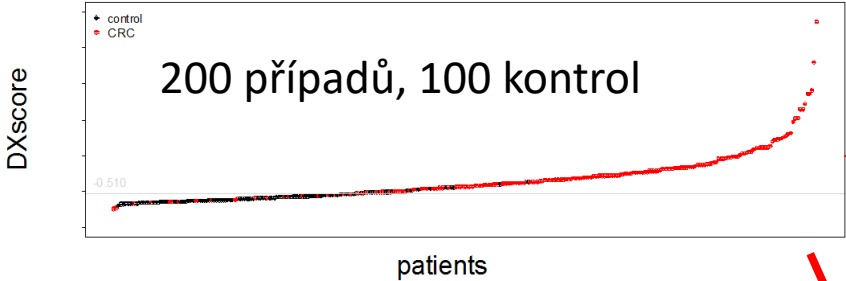
# Sérové mikroRNA jako biomarkery pro časnou diagnostiku a stanovení prognózy pacientů s kolorektálním karcinomem

**A training cohort**

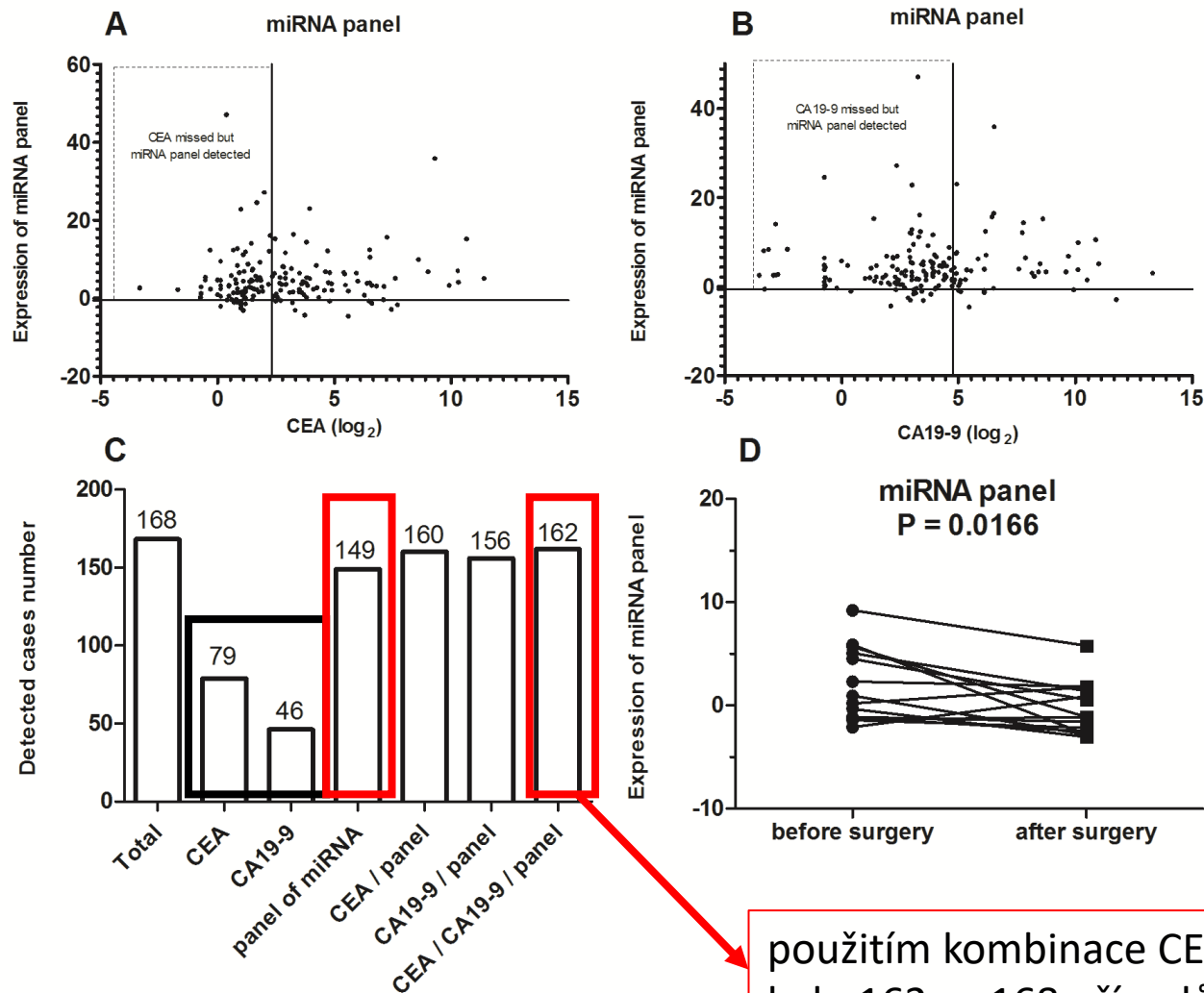


$$\text{DXscore} = -3.96 - 8.20 \cdot \text{miR-27a-3p} + 54.89 \cdot \text{miR-23a-3p} + 71.75 \cdot \text{miR-142-5p} + 78.13 \cdot \text{miR-376c-3p}$$

**B validation cohort**

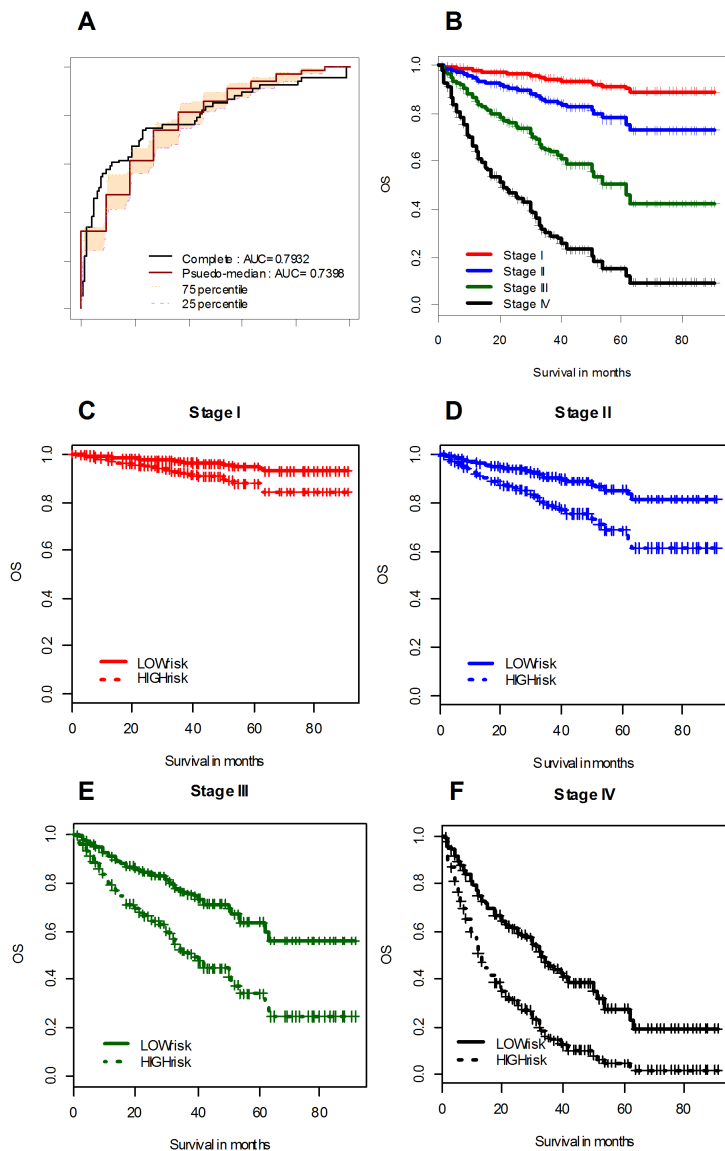


# Sérové mikroRNA jako biomarkery pro časnou diagnostiku a stanovení prognózy pacientů s kolorektálním karcinomem



použitím kombinace CEA/CA19-9/DXscore bylo 162 ze 168 případů správně identifikováno jako pacient s KRK

# Sérové mikroRNA jako biomarkery pro časnou diagnostiku a stanovení prognózy pacientů s kolorektálním karcinomem



DXscore vykazuje také prognostickou funkci nezávislou na klinickém stádiu!

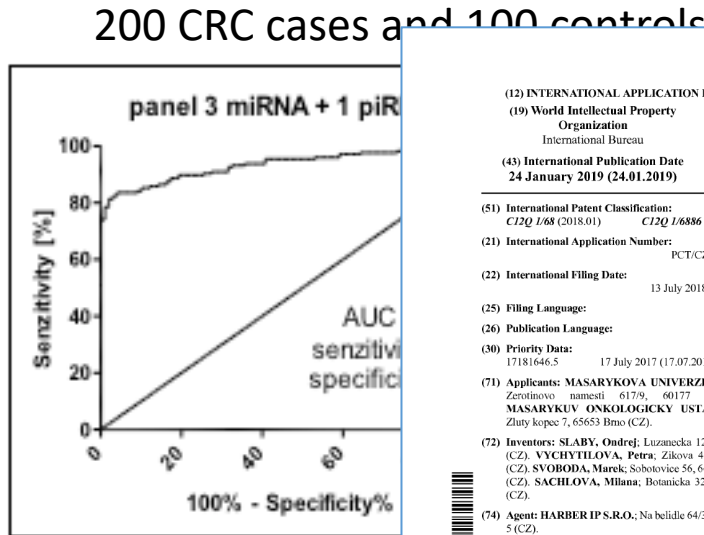
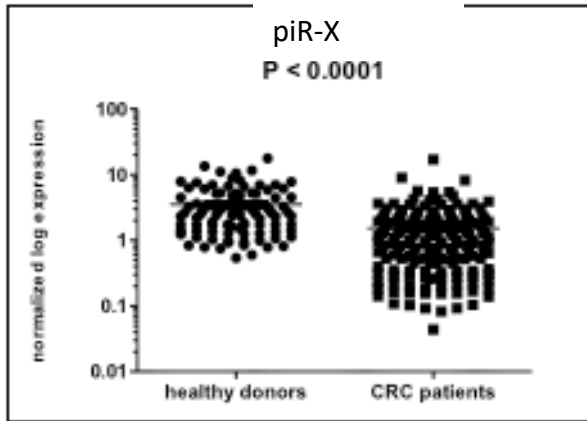
	HR	95%CI	<i>P</i>	<i>P</i> (log-rank test)
Klinické stádium	2,76	2,12 3,59	< 0.0001	
<b>DXscore:: HIGHrisk</b>	<b>2,30</b>	<b>1,44 3,66</b>	<b>&lt; 0,0004</b>	<b>&lt; 0.0001</b>



**patentová žádost, vývoj diagnostické soupravy  
ve spolupráci se společností Biovendor**



# Improvement of DxScore – 3 miRNAs + 1 PIWI-interacting RNAs (piRNA)



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau

(43) International Publication Date  
24 January 2019 (24.01.2019)

(10) International Publication Number  
**WO 2019/015702 A1**

WIPO | PCT

(51) International Patent Classification:  
C12Q 1/68 (2018.01) C12Q 1/6886 (2018.01)

(21) International Application Number:  
PCT/CZ2018/050037

(22) International Filing Date:  
13 July 2018 (13.07.2018)

(25) Filing Language: English  
(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
17181646.5 17 July 2017 (17.07.2017) EP

(71) Applicants: MASARYKOVA UNIVERZITA (CZ/CZ);  
Zerotinova namesiti 617/9, 60177 Brno (CZ);  
MASARYKUV ONKOLOGICKY USTAV [CZ/CZ];  
Zlutý kopec 7, 65653 Brno (CZ).

(72) Inventors: SLABY, Ondrej, Luzanecka 12, 60200 Brno (CZ);  
VYCHYTILOVA, Petra; Zikova 4, 62800 Brno (CZ);  
SVOBODA, Marek; Sobotovice 56, 66467 Syrovice (CZ);  
SACHLOVA, Milana; Botanicka 32, 60200 Brno (CZ).

(74) Agent: HARBER IP S.R.O.; Na belidle 64/3, 15000 Praha 5 (CZ).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HU, IL, IN, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LB, LC, LI, LU, LV, LY, MA, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PK, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SH, SI, SK, SM, SN, SR, ST, SV, SZ, TD, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VE, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Published:  
— with international search report (Art. 21(3))  
— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))  
— in black and white; the international application as filed contained color or greyscale and is available for download from PATENTSCOPE.

ts

Newly discovered piR-X enabled improvement of DxScore analytical performance for detection of early stages CRC ->

**AUC=0,87 to 0,92**  
**Sens. from 81 to 84%**  
**Spec. from 81 to 83%**



NCER

The present invention relates to a method of diagnosing and prognosticating cancer using piRNA-hsa-5937, having the sequence TCCTGTGTTGTTAAGGATTCGGCA (SEQ ID NO. 1), as a biomarker, in combination with at least one miRNA selected from: miR-23a-3p, having the sequence GCCAGGGAUUAUCC (SEQ ID NO. 3), miR-27a-3p, having the sequence CAGUGGCUAAGUUCGCG (SEQ ID NO. 4), miR-142-5p, having the sequence CAUAAAGUAGAAGACUACU (SEQ ID NO. 5). The resulting body fluid as the input, and therefore is non-invasive, has a high sensitivity even in very early stages of the disease, and is cost-effective.

xscore  
ents

European Patent application EP17181646



# VYUŽITÍ MIKRORNA V DIAGNOSTICE A LÉČBĚ KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

## CIKRULUJÍCÍ MIKRORNA JAKO DIAGNOSTICKÉ BIOMARKERY

### MODELOVÁ STUDIE 1

Sérové mikroRNA v diagnostice kolorektálního karcinomu



## MIKRORNA JAKO TKÁŇOVÉ BIOMARKERY

### MODELOVÁ STUDIE 2

Tkáňové mikroRNA jako prediktivní biomarkery odpovědi na léčbu protilátkami proti EGFR u metastatického kolorektálního karcinomu

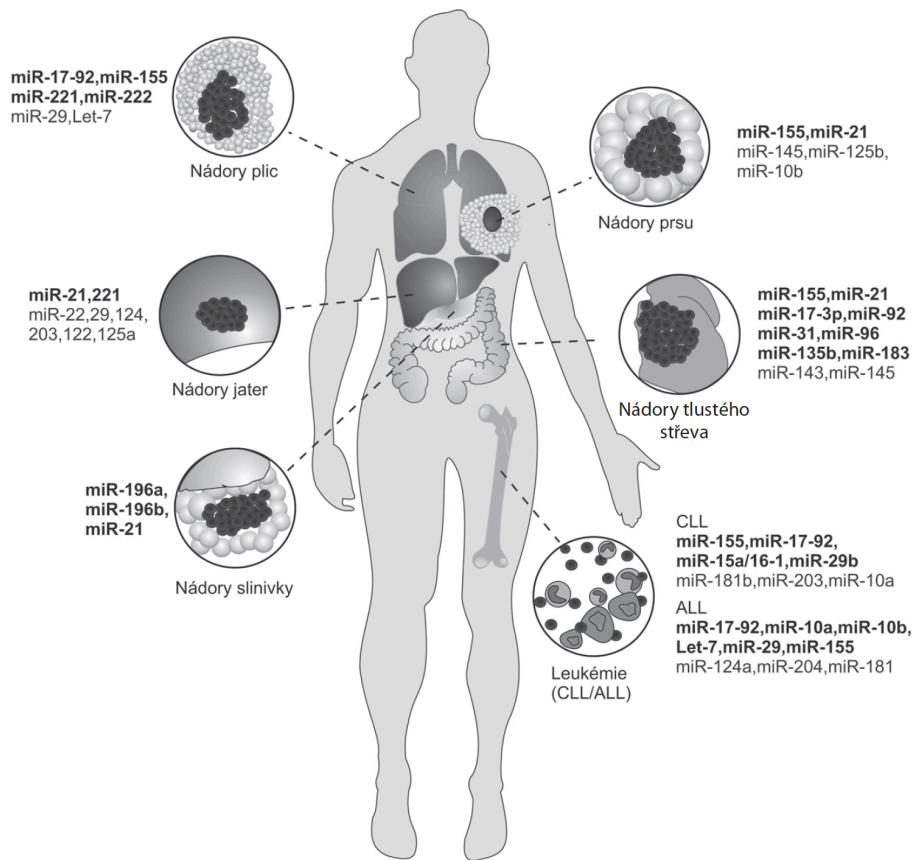


## MIKRORNA JAKO TERAPEUTICKÉ CÍLE

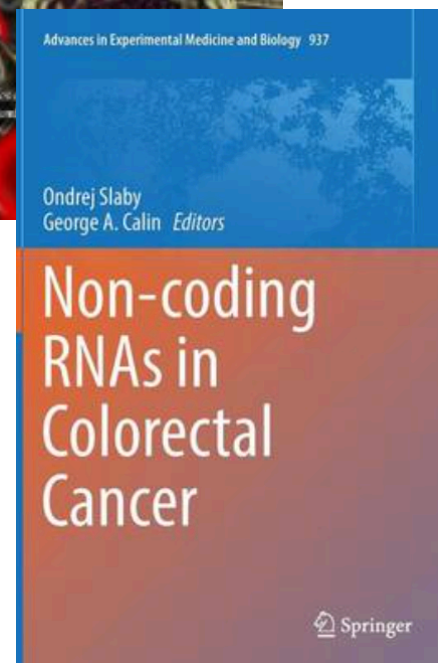
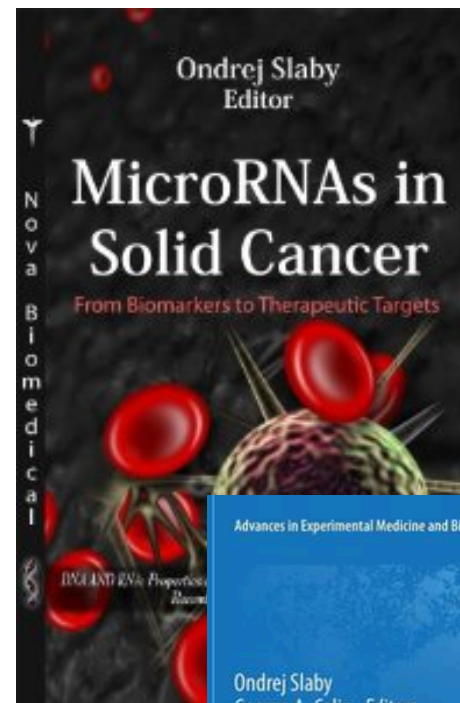
### MODELOVÁ STUDIE 3

Charakterizace miR-215 jako terapeutického cíle u kolorektálního karcinomu

# MikroRNA jako tkáňové biomarkery v onkologii



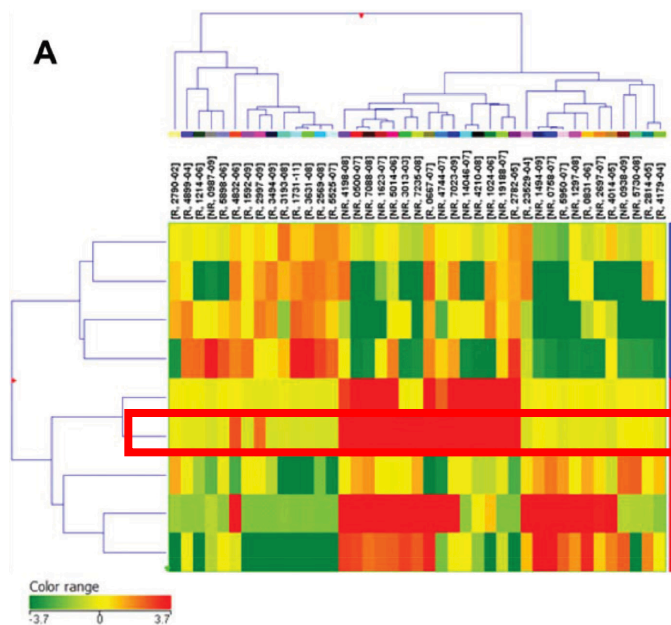
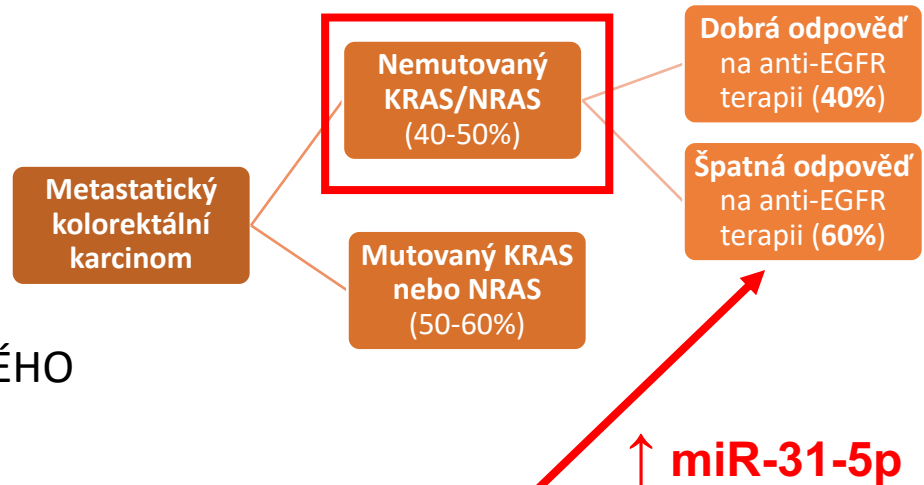
Slaby, Svoboda (Eds.) MikroRNA v onkologii, Galén, 2012



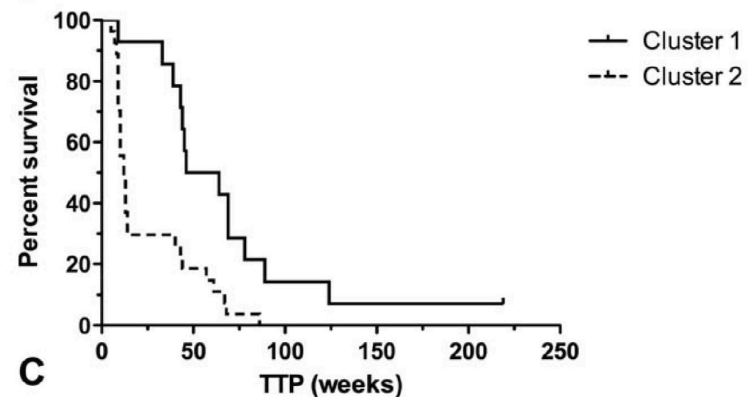
# MikroRNA jako prediktivní biomarkery u kolorektálního karcinomu

## MODELOVÁ STUDIE 2

MIKRORNA JAKO PREDIKTORY  
ODPOVĚDI NA LÉČBU PROTILÁTKAMI  
PROTI RECEPTORU EGFR U METASTATICKÉHO  
KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU



**B** Clusters according to heat map



Cluster	Patients (N = 41)	Median TTP (weeks)	Log-Rank P	Adjusted HR	95% CI	P
Cluster 1	14	55	0.0008	3.253	1.635 to 6.472	< 0.001
Cluster 2	27	12				

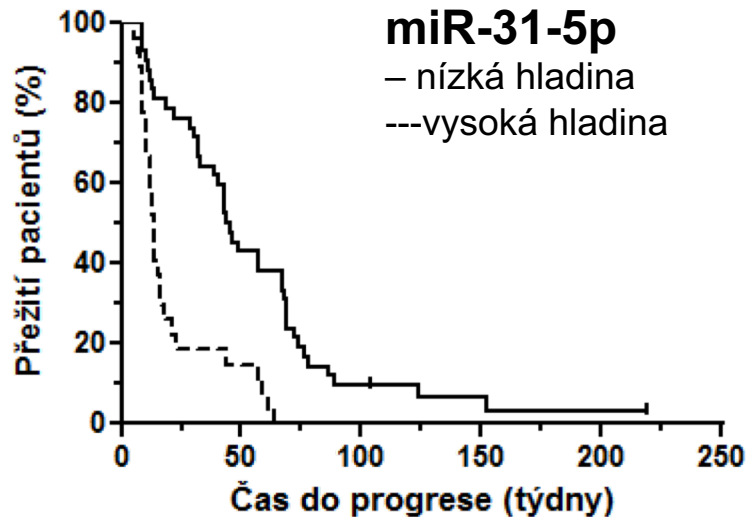
Mlcochova et al., Oncotarget, 2016

*Ve spolupráci se skupinou prof. Negriniho z univerzity ve Ferrare.*

# MikroRNA jako prediktivní biomarkery u kolorektálního karcinomu

## Nezávislá validace

### CETUXIMAB



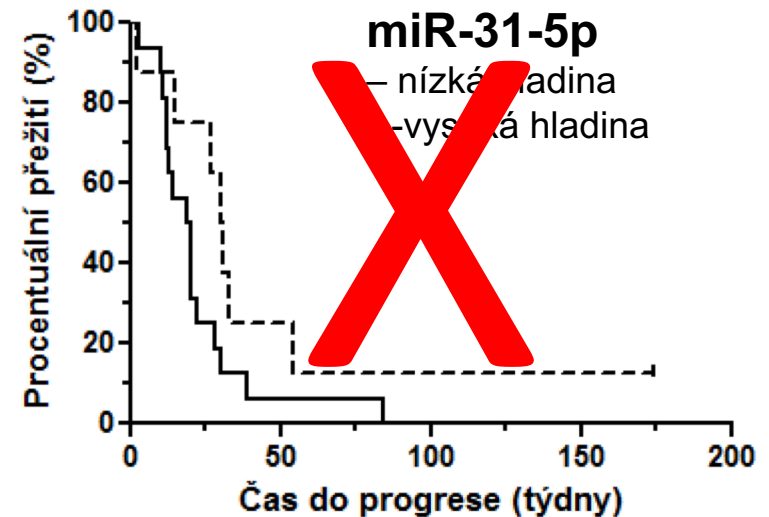
Nízká (66%) vs. vysoká hladina (34%)  
TTP\* - 45 vs. 14 týdnů  
HR 4.8,  $p < 0.001$

96 pacientů léčených cetuximabem

\* TTP, time to progression (čas do progresu)

Mlcochova et al., Oncotarget, 2016

### PANITUMUMAB



Nízká (42%) vs. vysoká hladina (58%)  
TTP – 20 vs. 29 týdnů  
HR 0.6,  $p = 0.261$

30 pacientů léčených panitumumabem

Srovnatelné s TTP pozorovaným u pacientů s mutovaným RAS

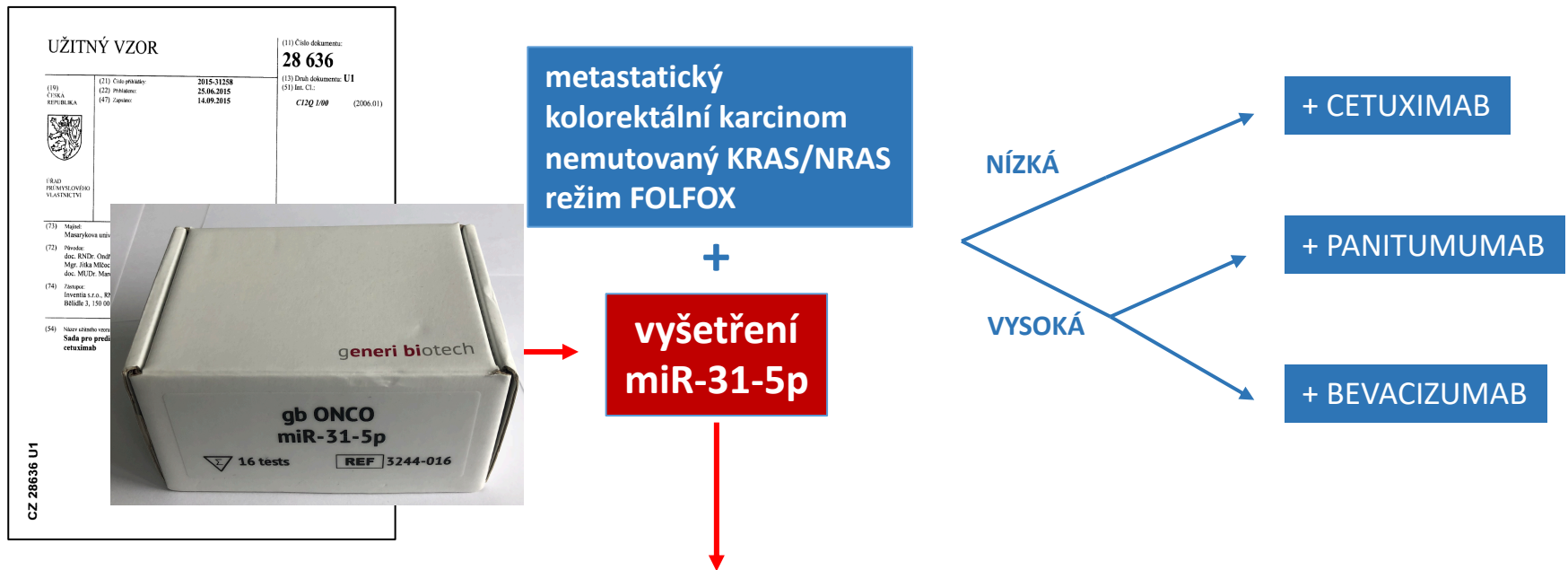
# MikroRNA jako prediktivní biomarkery u kolorektálního karcinomu

## Klinická studie RASMIR

Racionální indikace anti-EGFR terapie v první linii léčby pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem a nemutovaným onkogenem KRAS/NRAS na základě molekulárního prediktoru miR-31-5p

Akademická klinická studie

Masarykův onkologický ústav (Q3/2018)



Spolupracujeme na vývoji CE IVD diagnostické soupravy se společností Generi Biotech

# VYUŽITÍ MIKRONA V DIAGNOSTICE A LÉČBĚ KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

## CIKRULUJÍCÍ MIKRONA JAKO DIAGNOSTICKÉ BIOMARKERY

### MODELOVÁ STUDIE 1

Sérové mikroRNA v diagnostice kolorektálního karcinomu



## MIKRONA JAKO TKÁŇOVÉ BIOMARKERY

### MODELOVÁ STUDIE 2

Tkáňové mikroRNA jako prediktivní biomarkery odpovědi na léčbu protilátkami proti EGFR u metastatického kolorektálního karcinomu



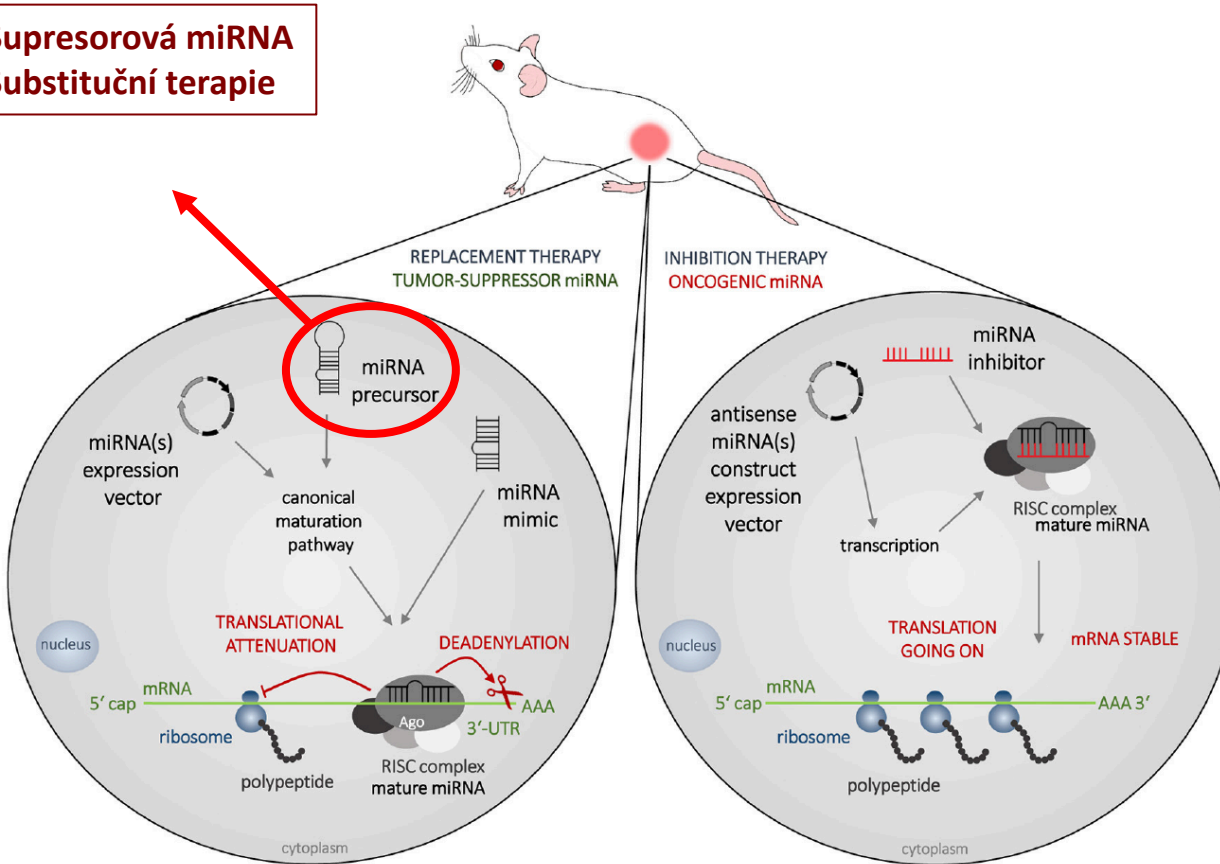
## MIKRONA JAKO TERAPEUTICKÉ CÍLE

### MODELOVÁ STUDIE 3

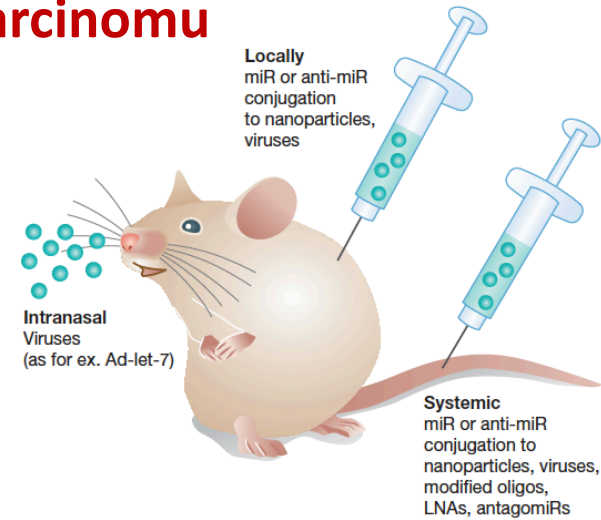
Charakterizace miR-215 jako terapeutického cíle u kolorektálního karcinomu

# MikroRNA jako terapeutické cíle u kolorektálního karcinomu

**Supresorová miRNA  
Substituční terapie**



Merhautova, Demlova, Slaby, *Frontiers in Pharmacology*, 2016



lorio et al., *EMBO Mol Med*, 2012



**Fig. 1.** Mouse with subcutaneous tumor seventh day postinoculation.

Merhautova, et al., *Physiol. Res.*, 2016



# MiR-215 expression levels are decreased in colorectal cancer tumor tissue

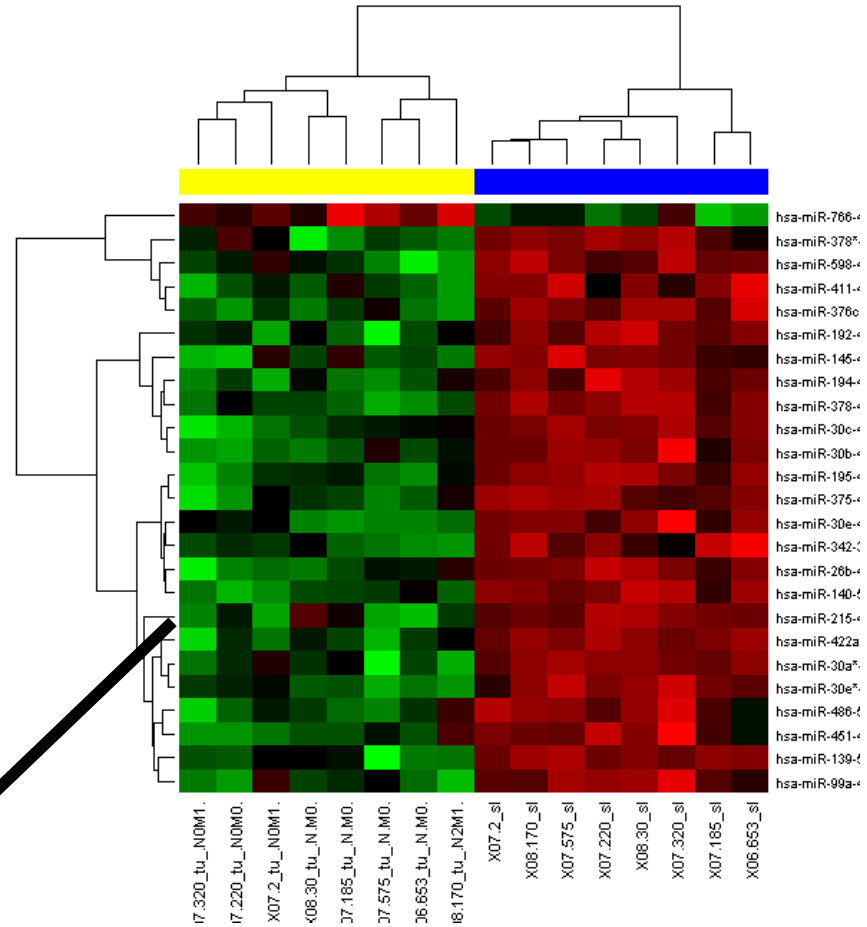
## MODEL STUDY 3

MiR-215 IS A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET IN CRC

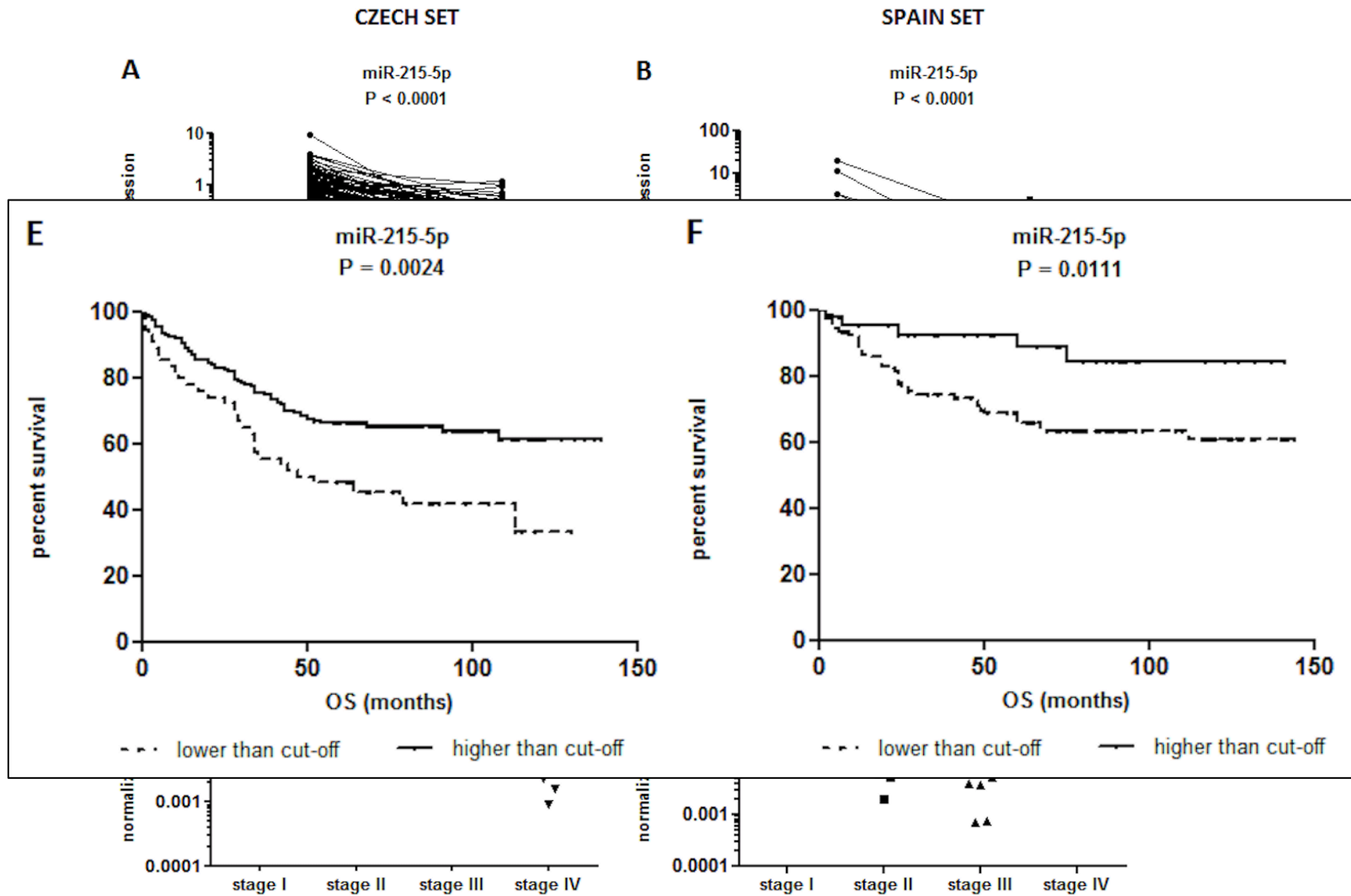
tumor tissue × non-tumor colonic tissue  
(paired samples)

25 miRNAs, P < 0.0001

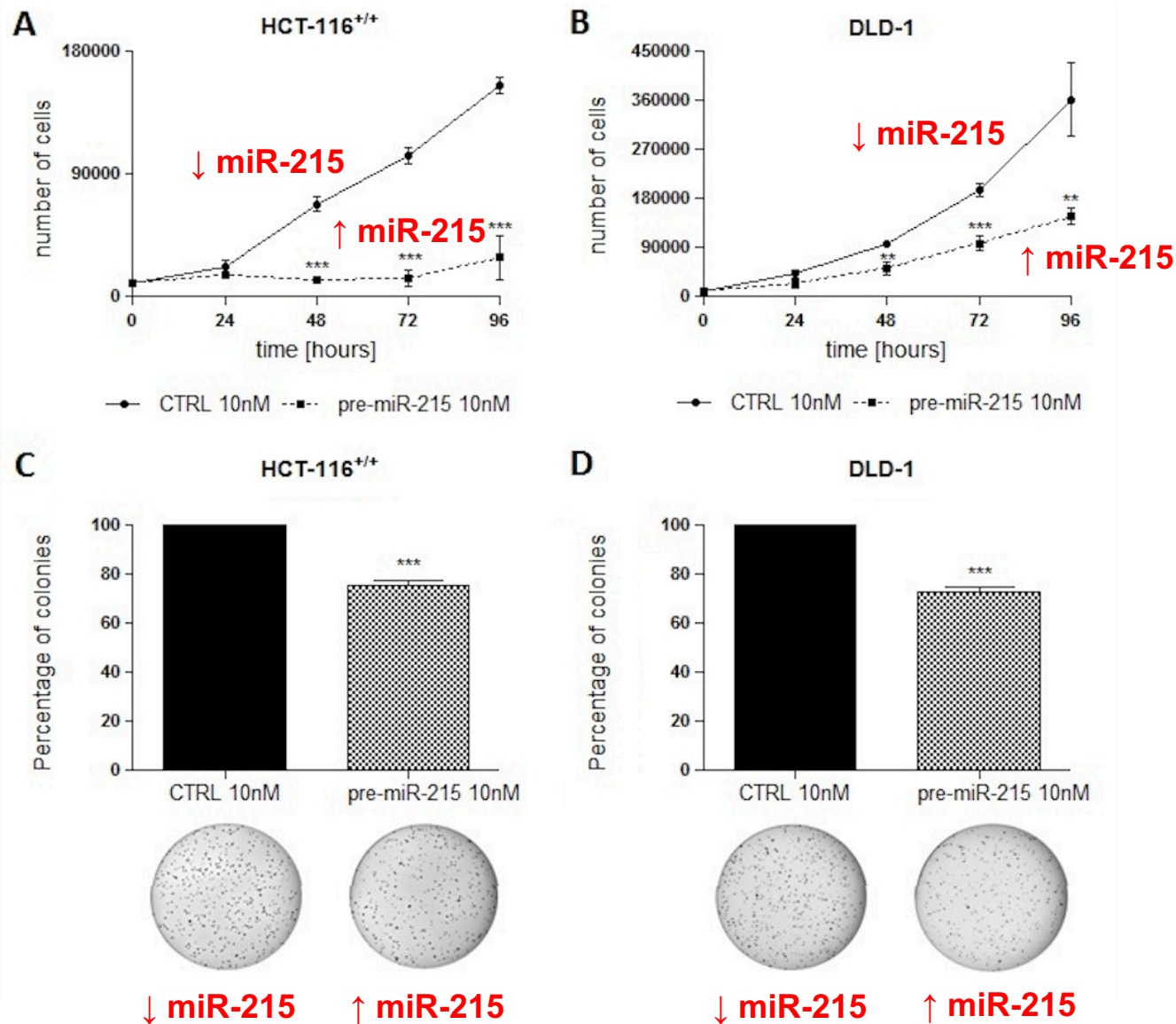
**miR-215**



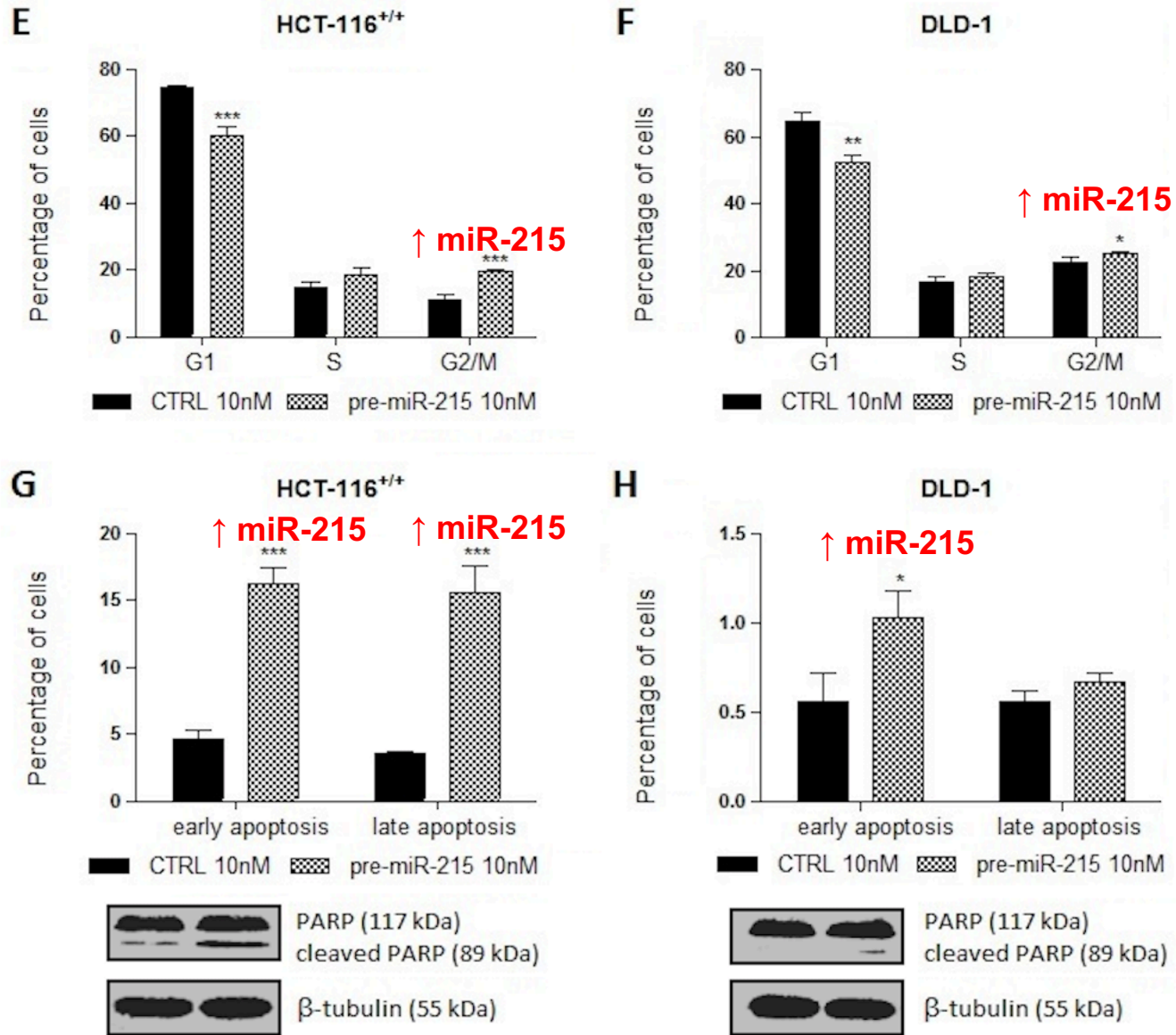
# MiR-215 as therapeutic target in colorectal cancer



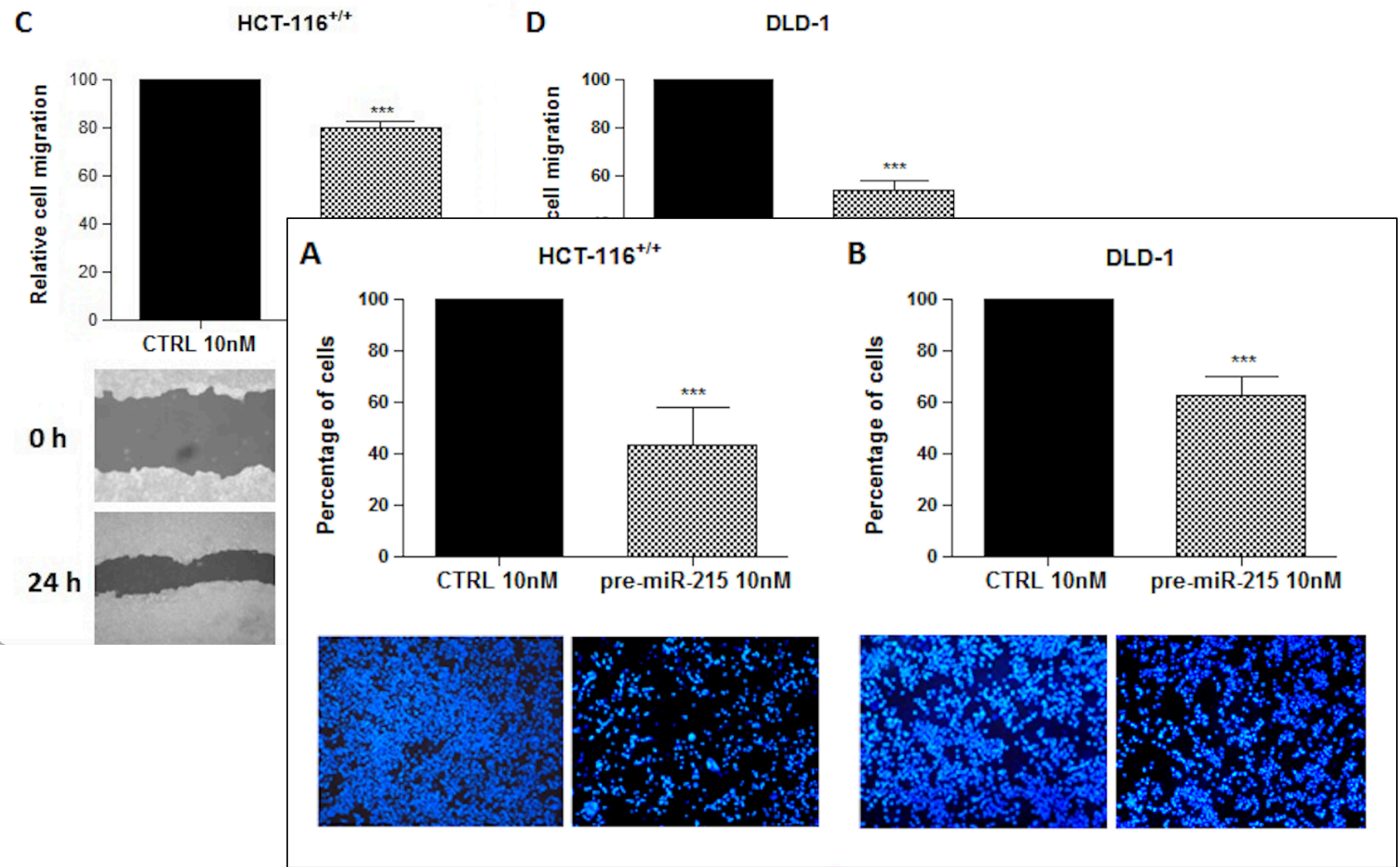
# MiR-215 is involved in regulation of CRC cell proliferation



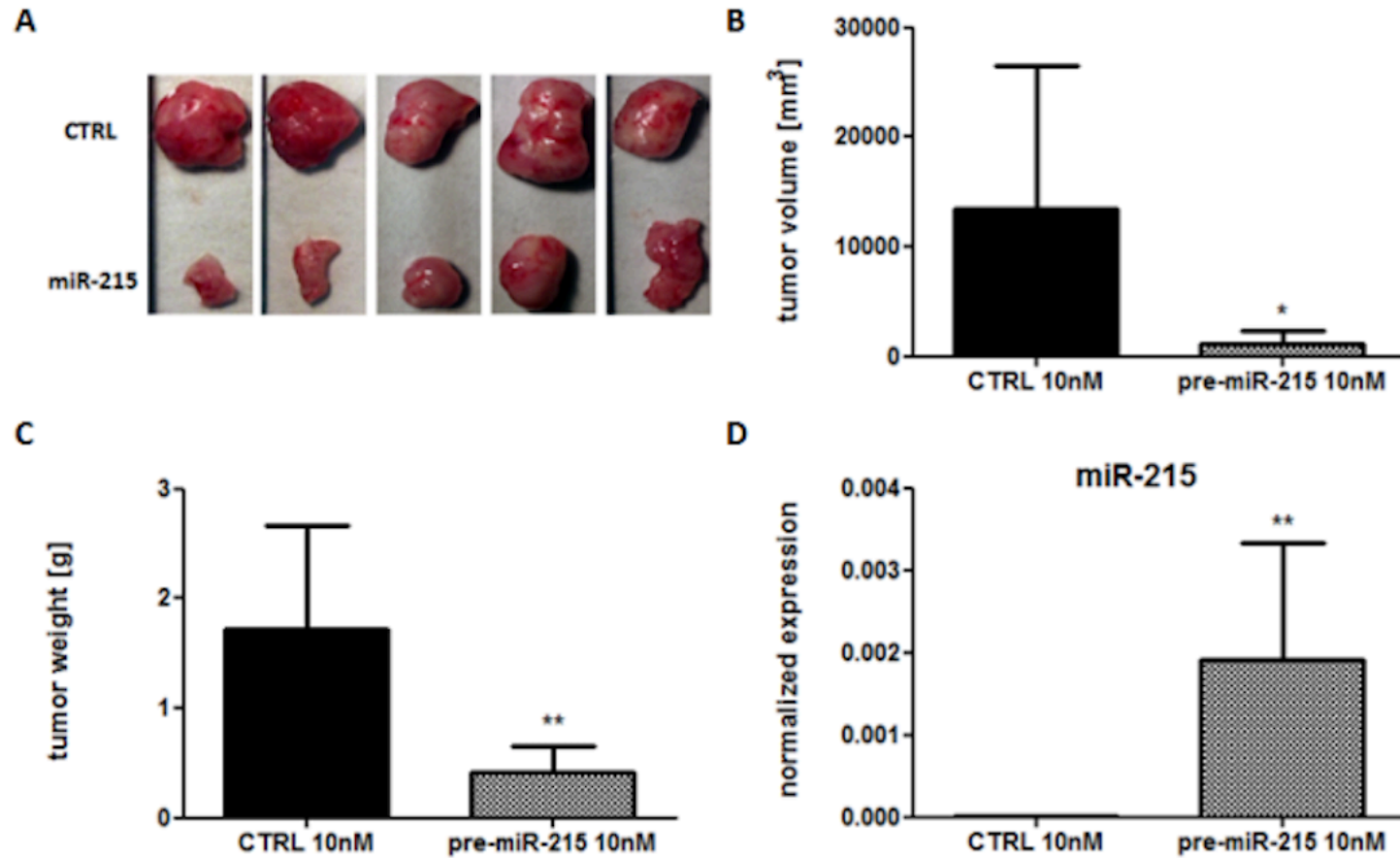
# MiR-215 induces G2-arrest and increases apoptotic rate in CRC cells



# MiR-215 attenuates migration of CRC cells in vitro

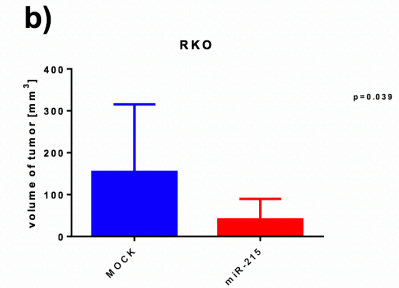
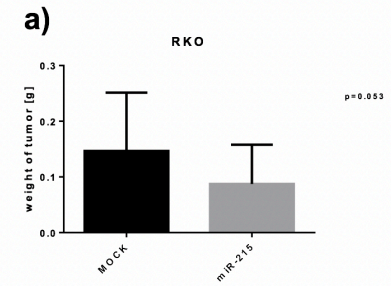
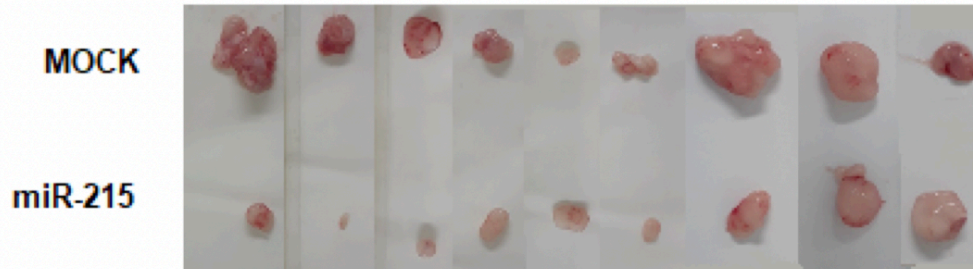


# MiR-215 inhibits tumor growth *in vivo* HCT-116

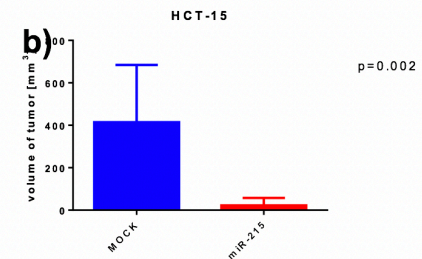
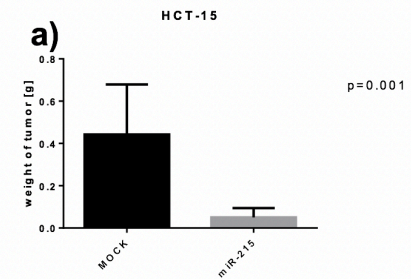
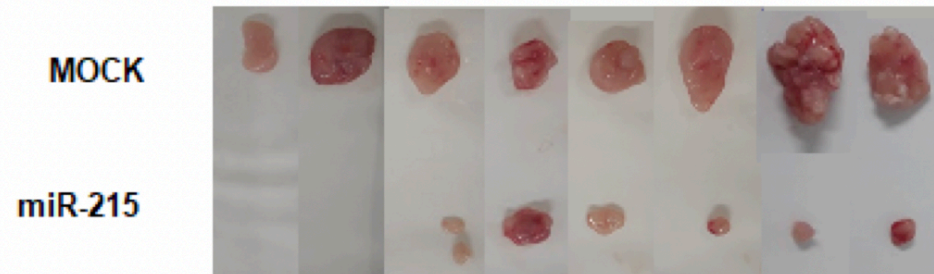


# MiR-215 inhibits tumor growth *in vivo*

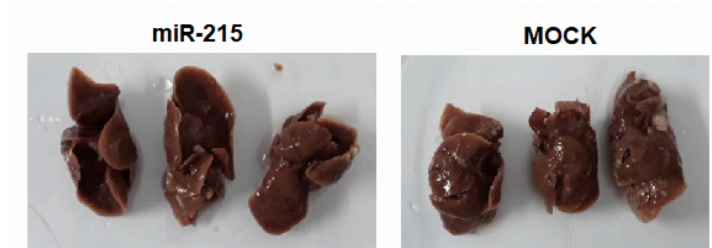
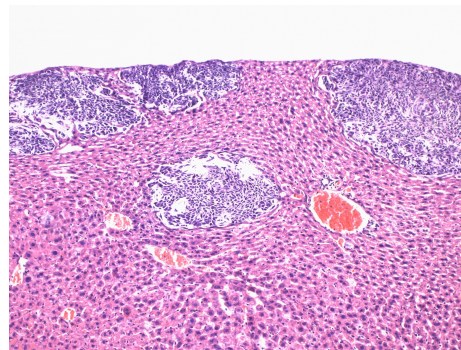
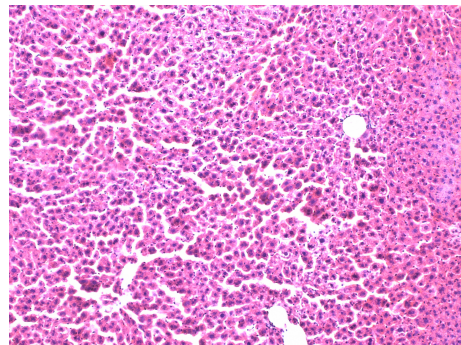
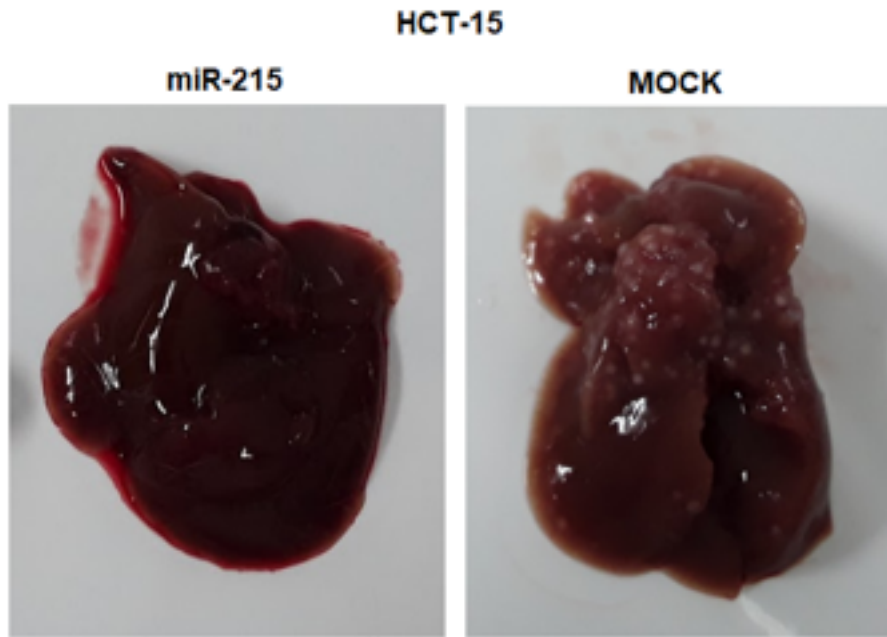
RKO



HCT15



# MiR-215 inhibits tumor metastatic spread *in vivo*



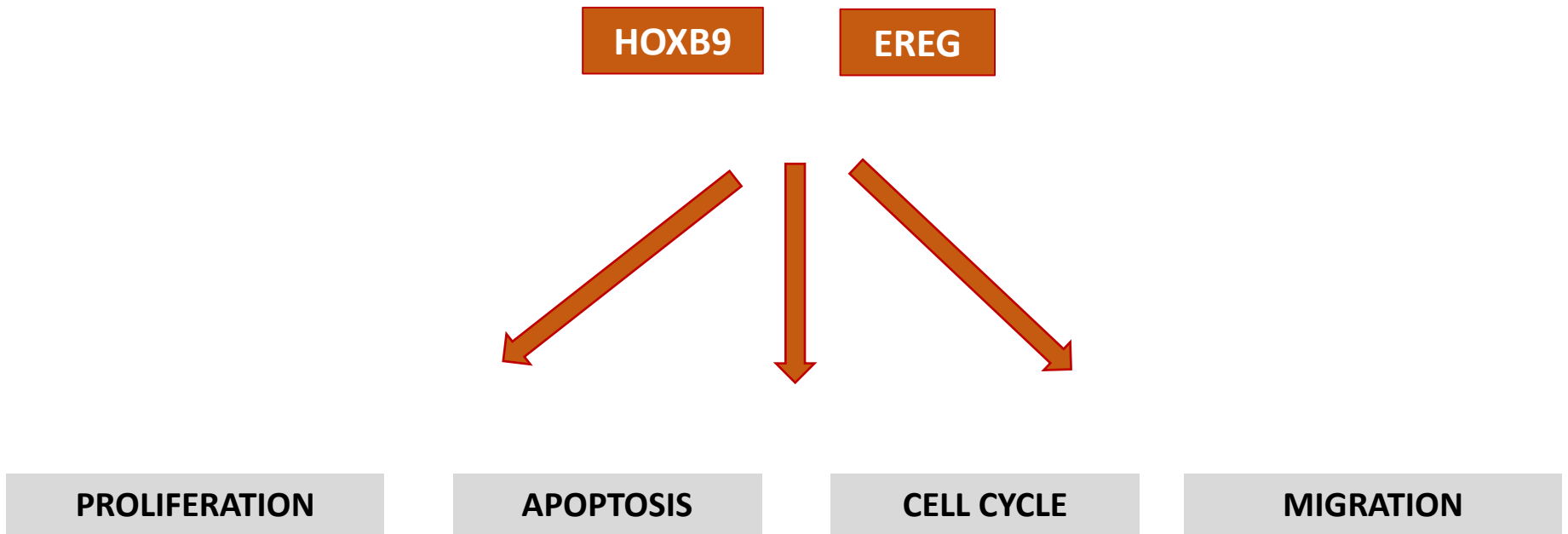
**Figure 4:** Metastatic model of CRC – intrasplenic injection of tumor cells. Left – livers of mice injected with HCT116 +/- cells transfected with miR-215. Right – livers of mice injected with HCT116 +/- cells transfected with scrambled oligo.

Cell line	Mean $\pm$ SD [number of lesions]	Approx. volume of lesions (mm <sup>3</sup> )
HCT-116 MOCK	18,8 $\pm$ 8,3	0,3
HCT-116 215	6,0 $\pm$ 5,5	0,2
HCT-15 MOCK	21,2 $\pm$ 9,7	0,9
HCT-15 215	0	0,0

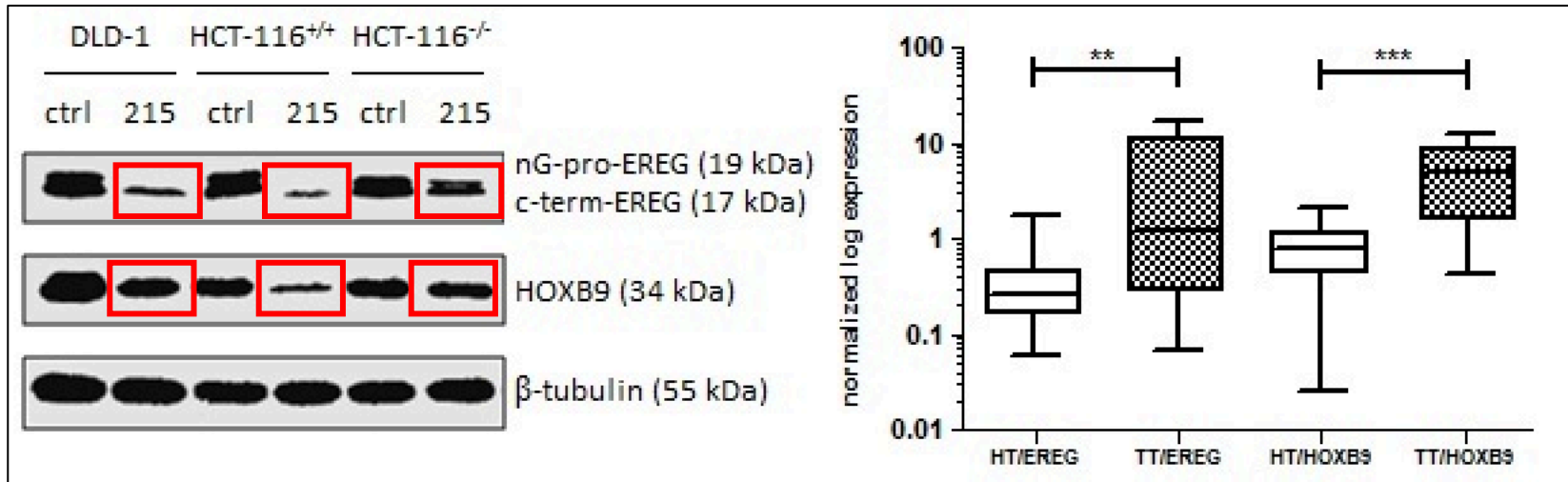


# What is the mechanism of miR-215 anti-cancer functioning?

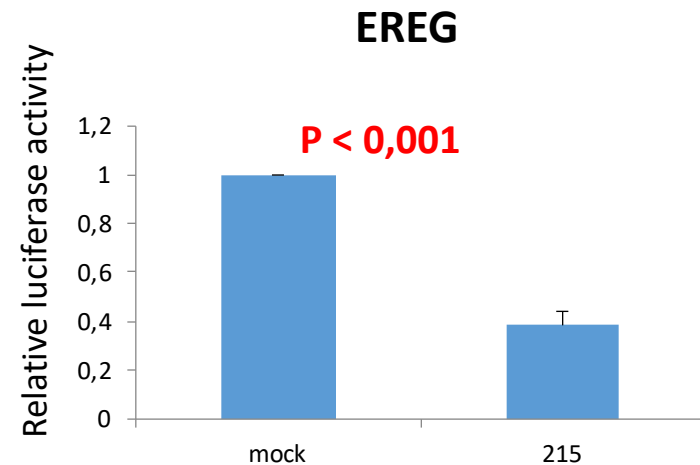
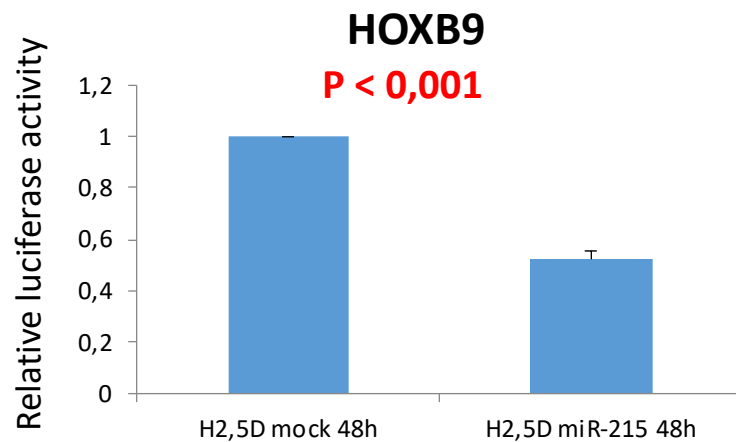
WHAT ARE miR-215 TARGET mRNAs???



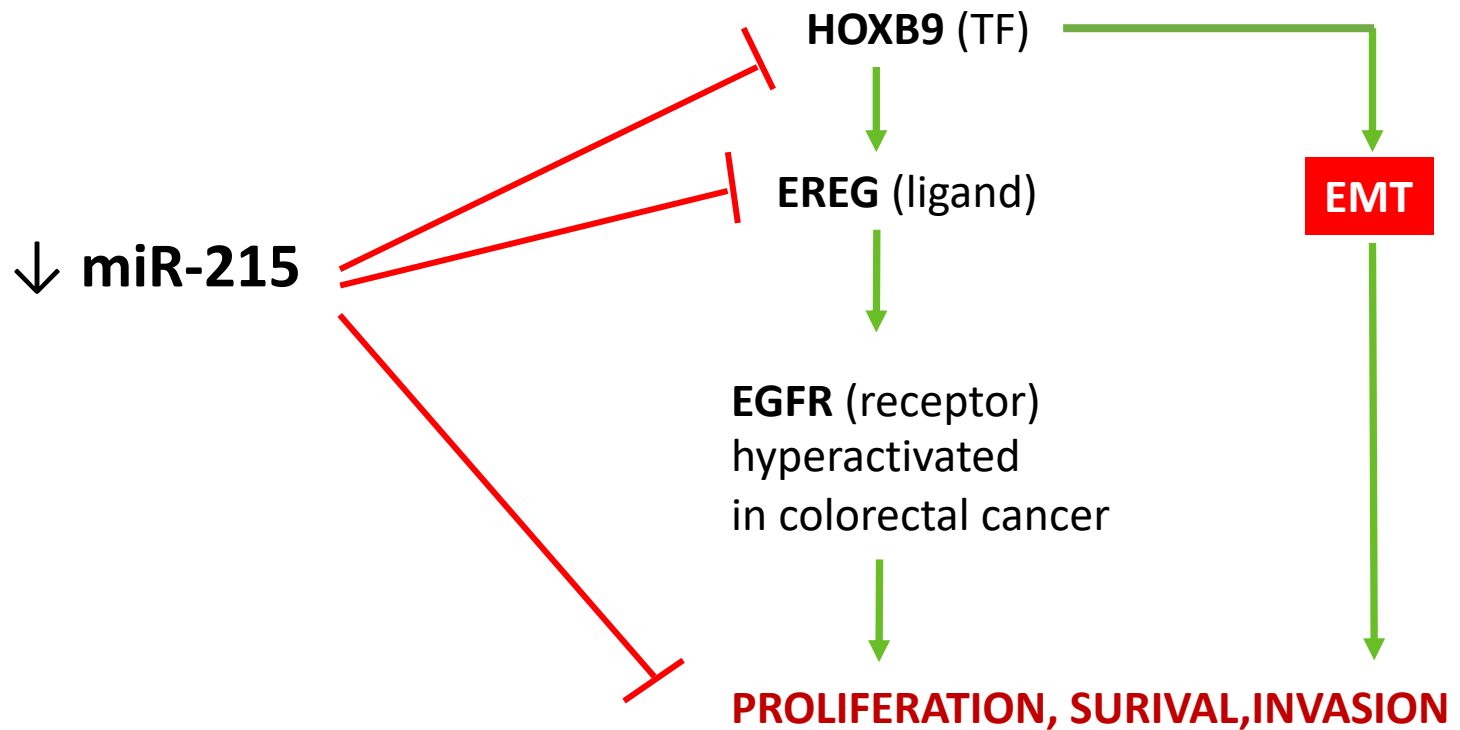
# Are EREG and HOXB9 targeted by miR-215?



## Luciferase assay



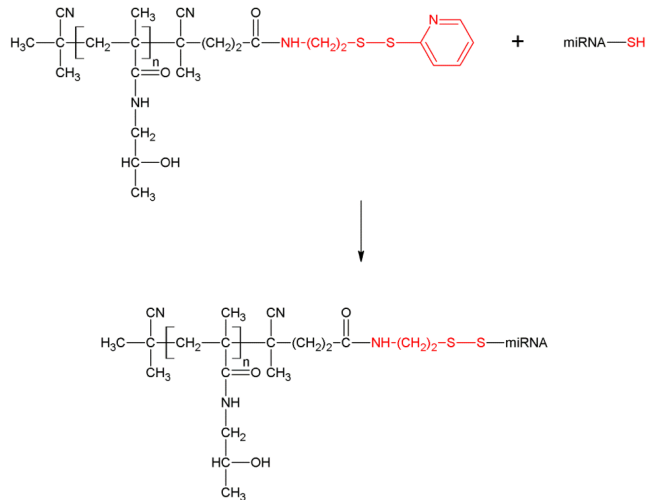
## Is miR-215 tumor suppressive miRNA in colorectal cancer?



Vychytilova et al, Oncogenesis, 2017

**MiR-215 is a tumor suppressor involved in colorectal cancer pathogenesis and potential therapeutic target for replacement microRNA therapy.**

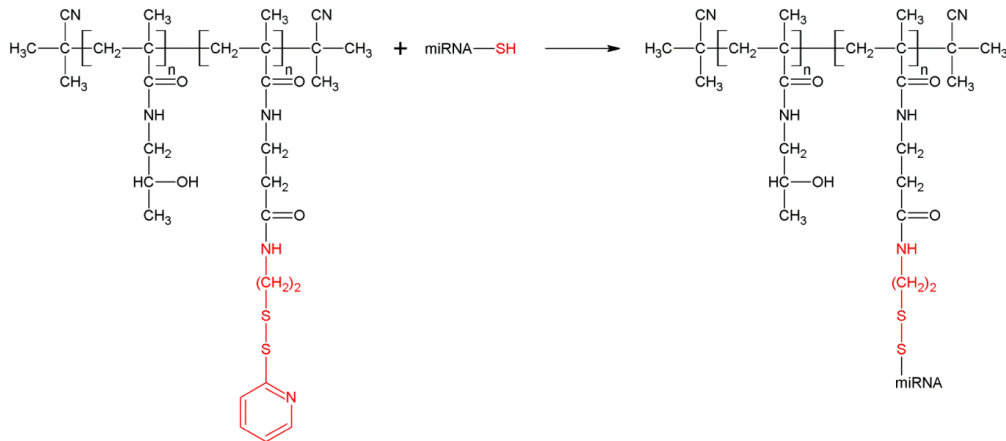
# Development of innovative polymeric delivery system for miR-215 mimic



in collaboration with  
***Institute of Macromolecular Chemistry  
Czech Academy of Science (dr. Laga)***

Two types of polymeric systems  
are currently tested *in vivo*

**Figure 5:** Scheme of conjugation of miRNA-SH passenger strand to the thiol-reactive semitelechelic homopolymer through the disulfide bond.



**Figure 6:** Scheme of conjugation of miRNA-SH passenger strand to the thiol-reactive multivalent copolymer through the disulfide bonds.

Miravirsen (SPC3649)

miR-122

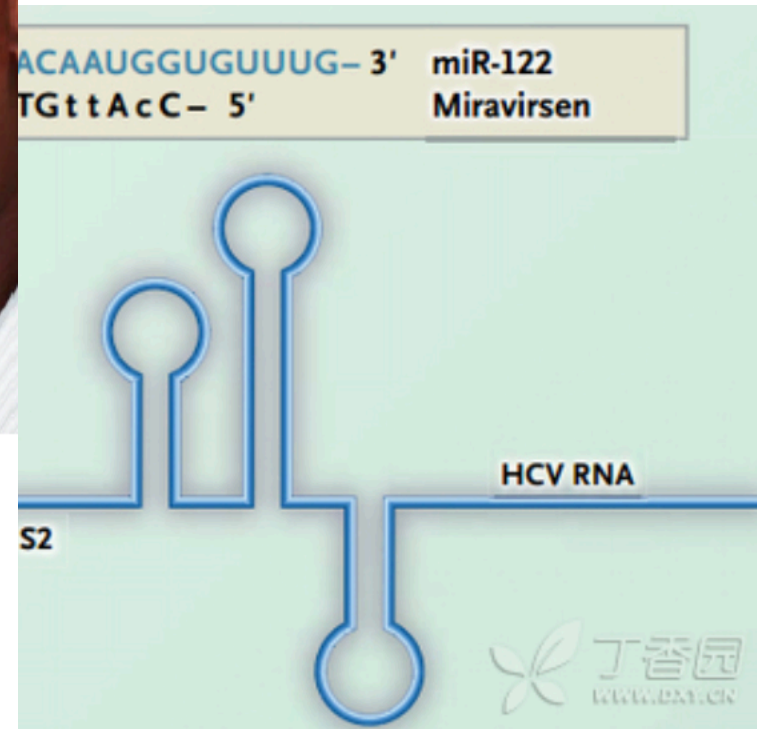
Hepatitis C



**Miravirsen** (SPC3649)  
A New Treatment Targeting Hepatitis C

**MikroRNA jako terapeutické cíle**

**Miravirsen, anti-miR-122**



*Delivering on the promise of RNA medicines today*

santaris  
pharma a/s  
RNA Medicines for the 21st Century

# VYUŽITÍ MIKRORNA V DIAGNOSTICE A LÉČBĚ KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

## MODELOVÁ STUDIE 1

DXscore založené na sérových miRNA umožňují časnou a neinvazivní detekci kolorektálního karcinomu a může tak zvýšit počet pacientů diagnostikovaných v dobře léčitelných časných stádiích onemocnění



## MODELOVÁ STUDIE 2

Tkáňová mikroRNA miR-31-5p umožňuje predikovat léčebnou odpověď na cílenou léčbu proti receptoru EGFR a může tak přispět ke zlepšení léčebných výsledků u pacientů s metastatickým stádiem onemocnění.



## MODELOVÁ STUDIE 3

Cílení miRNA představuje slibný terapeutický přístup pro pacienty s kolorektálním karcinomem, přičemž řada miRNA terapeutik je v různých stádiích preklinického vývoje a některá z nich již vstoupila do testování klinického (fáze 1/2).

# THANK YOU!

## Molecular Oncology II (O. Slaby) group



### CEITEC

Mgr. Hana Nosková, PhD  
Mgr. Martina Rédová, PhD  
Mgr. Jiří Šána, PhD  
Mgr. Kamila Součková, PhD  
Mgr. Jaroslav Juráček, PhD  
Mgr. Petra Vychytilová-Faltejsová, PhD  
Tina Catela Ivković, PhD  
Mgr. Elleni Michu  
Mgr. Soňa Klusová  
MVDr. Martina Vodínská  
Ing. Dana Knoflíčková

### DEPT. OF PATHOLOGY

doc. MUDr. Leoš Křen, Ph.D.  
MUDr. Marta Ježová, Ph.D.  
MUDr. Zdeněk Pavlovský, Ph.D.



Dr. Massimo Negrini  
University of Ferrara



Prof. George Calin  
MD Anderson Cancer  
Center



Prof. Klaus Jung  
Charite, Berlin



Dr. Markus Kretz  
University of Regensburg

