

S.C. Oncologia Medica C

Uso dei PNA anti-gene per inibire l'espressione di oncogeni responsabili della crescita delle cellule di linfoma

Linea di ricerca: 2 – Interazioni ospite-tumore

Programma: f - Sviluppo preclinico e di fase I di terapie biologiche antitumorali: immunoterapia, immunoterapia adottiva, terapie "antisense", terapia antiangiogenica, terapia genica e terapia cellulare

Responsabile: Lidia Boffa

Durata: 2006-2008

Parole chiave: Acidi Peptidil Nucleici (PNA); terapia anti-gene; oncogene c-myc; linfoma di Burkitt; topi SCID

Altre strutture IST: S.S. Malattie Linfoproliferative (G. Cutrona), Animal Facility (M. Cilli), S.C. Trasferimento Genico (A. Daga)

Altri Enti coinvolti: Sezione di Biochimica e Centro di Eccellenza per la Ricerca Biomedica, Università degli Studi di Genova (U. Benatti, G. Damonte, E. Millo); U.O. Anatomia e Istologia Patologica, ASL 5, La Spezia (S. Roncella, F. Fedeli)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: MIUR FIRB; MIUR FAR

Background

I PNA (Peptidil Nucleic Acids), omologhi strutturali sintetici degli acidi nucleici, sono inattaccabili dalle nucleasi e formano con il DNA/RNA complementare ibridi più forti e stabili di quelli naturali (DNA/DNA, DNA/RNA). I PNA anti-gene (complementari ad una sequenza genica), se legati ad un vettore nucleare, accedono al nucleo di cellule vitali bloccando la trascrizione del gene bersaglio.

Intendiamo quindi mettere a punto una terapia antitumorale basata sull' utilizzo dei PNA anti-gene. In particolare abbiamo già applicato questa strategia al Linfoma di Burkitt (BL) in cui la trasformazione neoplastica è causata dall'iperespressione dell'oncogene c-myc. Utilizzando un PNA specifico per c-myc (PNAmyc), abbiamo dimostrato che è possibile inibire selettivamente l'espressione dell'oncogene nelle cellule BL con conseguente blocco sia della proliferazione cellulare sia dell'apoptosi. PNAmyc però inibisce l'espressione di tutte le forme di myc che è un gene costitutivo ed un suo uso terapeutico potrebbe quindi danneggiare anche le cellule normali. Dato però che nella maggior parte dei BL la traslocazione cromosomica t(8;14) giustappone l'oncogene c-myc all'enhancer Emu dell'Ig locus (postulato come responsabile della deregolazione e ipertrascrizione del c-myc traslocato) abbiamo disegnato un PNA complementare specifico per la sequenza di Emu (PNAEmu). Si è quindi dimostrato che PNAEmu è in grado di inibire selettivamente e specificamente l'espressione solo di c-myc traslocato. Sulla base dell'efficacia in vitro di PNAEmu, abbiamo iniziato una serie di studi in vivo sul modello animale dei topi SCID in cui sono stati indotti tumori con inoculo di linee cellulari linfomatose umane. In questo sistema modello ne abbiamo valutato i parametri farmacocinetici di biodistribuzione e persistenza nei tessuti e nei tumori.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Nei linfomi non-Hodgkin's sono state descritte traslocazioni cromosomiche che coinvolgono oncogeni responsabili della trasformazione neoplastica i quali vengono a trovarsi in prossimità dell'enhancer Emu del locus delle immunoglobuline (Ig). Conseguenza di questo tipo di traslocazione è l'iperespressione dell'oncogene e la conseguente "disregolazione" della proliferazione cellulare del linfoma.

Scopo del presente progetto è proporre il PNA complementare alla sequenza "core" dell'enhancer Emu (PNAEmu) come farmaco molecolare biologico. Il PNAEmu bloccando l'enhancer, dovrebbe inibire l'espressione degli oncogeni patologicamente traslocati, e quindi indurre o facilitare la morte delle cellule linfomatose non-Hodgkin in vitro ed in vivo.

Beneficiari

Intendiamo definire un modello animale per valutare l'effetto antineoplastico nei linfomi non-Hodgkin's del PNAEmu solo o in combinazione con chemioterapici convenzionali. I risultati, oltre all'interesse intrinseco, permetteranno di ottenere informazioni sulle modalità di crescita dei linfomi e sul ruolo degli oncogeni correlati e saranno di fondamentale importanza nell'impostazione di uno studio di fase I nell'uomo.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Abbiamo messo a punto in un modello murino e per il linfoma di Burkitt (BL) una terapia antitumorale basata sull'utilizzo dei PNA anti-gene.

Nel BL, in cui la trasformazione neoplastica è causata dall'iperespressione dell'oncogene c-myc, abbiamo utilizzato dapprima un PNA specifico per il secondo esone di c-myc (PNAmyc). Con l'esposizione di cellule di BL in coltura a PNAmyc abbiamo dimostrato che è possibile inibire selettivamente l'espressione dell'oncogene bloccandone le due principali funzioni cioè la proliferazione cellulare e l'apoptosi (Cutrona et al., 2000, Nature Biotech., 18:300-303). PNAmyc è in grado di inibire non solo l'espressione del myc traslocato, ma anche di quello normale, in quanto è

Consuntivo progetti RC 2006-2008

complementare ad una sequenza presente in entrambe le forme dell'oncogene. Quindi un uso terapeutico di PNAmyc potrebbe causare anche una inibizione della proliferazione delle cellule normali. In alternativa dato che nella maggior parte dei BL una traslocazione cromosomica t(8;14) giustappone l'oncogene c-myc a sequenze regolatorie dei geni delle Ig, in particolare all'enhancer Emu, si è postulato che la vicinanza ad Emu fosse responsabile della deregolazione e ipertrascrizione del c-myc traslocato. Basandoci su questa ipotesi, abbiamo sia disegnato un PNA complementare ad una sequenza specifica di Emu (PNAEmu) sia dimostrato che è in grado di inibire selettivamente l'espressione del c-myc traslocato, ma non dell'oncogene normale. L'inibizione da parte di PNAEmu è veramente specifica, sia perché nei BL in cui la traslocazione non giustappone c-myc a Emu non ha alcun effetto sull'espressione di c-myc traslocato, sia perché una mutazione nella sequenza del PNA è sufficiente ad abolirne l'efficacia (Cutrona et al. Cancer Res, 2003, 63: 6144). Sulla base dei dati positivi ottenuti in vitro abbiamo iniziato una serie di studi in vivo sul modello animale dei topi SCID in cui sono stati indotti tumori con inoculo di linee linfomatose umane. In questo sistema modello PNAEmu non ha mai dato segni di tossicità, neppure alle più alte concentrazioni raggiungibili; inoltre in una valutazione dei parametri di farmacocinetica si è visto che ha una particolare biodistribuzione e persistenza nei tessuti, inclusi i tumori. Abbiamo infatti dimostrato che è ancora presente in quantità significativa, soprattutto nei tumori indotti da cellule BL, anche a tempi superiori alle 24 ore dopo la sua somministrazione. Inoltre la molecola attiva risulta inalterata (non degradata) come comprovato dall'analisi in spettrometria di massa del PNA estratto dai tessuti (Boffa et al., 2005 Oligonucleotides, 15:85).

Abbiamo anche dimostrato, con la batteria completa dei test standard S9, che PNAEmu non è né mutageno né clastogeno (Boffa et al., 2007 Mutat Res, 628:129). Inoltre in topi immunocompetenti PNAEmu si è rivelato non immunogenico (Cutrona et al. 2007 Oligonucleotides, 17:146)

Nel modello del topo SCID, inoculato subcutaneamente con cellule BL umane, abbiamo dimostrato che la somministrazione cronica, attraverso la vena caudale, del PNAEmu sia ritarda significativamente il tempo di comparsa sia inibisce la crescita delle cellule neoplastiche. Alla fine del trattamento i tumori dei topi cronicamente trattati con PNAEmu risultavano non solo aver un volume ridotto di un terzo rispetto ai topi di controllo, ma anche la massa tumorale presentava all'interno numerose aree necrotiche (Boffa et al., 2007 Cancer Gene Ther, 14:220).

Molto recentemente abbiamo valutato il potenziale terapeutico del PNAEmu in un modello murino in cui vengono indotti, con inoculo endovenoso di cellule BL trasfettate con il gene della luciferasi (BRG luc), tumori sistemici, che si espandono preferenzialmente in maniera simile a quella che si osserva nei pazienti umani adulti affetti da BL: a livello della cavità addominale, del sistema nervoso centrale e del midollo spinale.

Due gruppi di topi sono stati poi iniettati cronicamente per via intraperitoneale con PNAEmu o con un PNA di controllo. La crescita e la localizzazione delle cellule BRG luc può essere monitorata quantitativamente in vivo in luminescenza con un IVIS, Xenogen 100 Imaging system.

L'esperimento viene concluso quando gli animali di controllo sviluppano seri sintomi neurologici. In accordo con i dati in luminescenza, al momento della necropsia, la crescita tumorale dei topi che sono stati trattati con PNAEmu si è dimostrata inferiore dell'80% a quella dei topi di controllo.

Studi istologici confermano che, unicamente nei topi trattati, non solo si ha una drastica soppressione della crescita tumorale, ma essa è anche accompagnata da necrosi. Dati immuno-istologici mostrano come queste aree di necrosi siano anche accompagnate da una notevole downregolazione di c-myc.

L'insieme dei nostri studi quindi supporta l'idea che PNAEmu sia realmente un valido candidato nella terapia dei pazienti adulti affetti da linfoma di Burkitt.

Elenco pubblicazioni:

Boffa L.-Cutrona G.-Cilli M.-Matis S.-Damonte G.-Mariani M.-Millo E.-Moroni M.-Roncella S.-Fedeli F.-Ferrarini M.
Inhibition of Burkitt's lymphoma cells growth in SCID mice by a PNA specific for a regulatory sequence of the translocated c/myc.
Cancer Gene Ther. 14:220/226, 2007

Boffa L.-Menichini P.-Bolognesi C.-Cutrona G.-Roncella S.-Damonte G.-Millo E.-Mariani M.-Matis S.-Russo D.-Ciliutti P.-Ferrarini M.
Lack of mutagenicity and clastogenicity of PNAEmu/NLS targeted to a regulatory sequence of the translocated c/myc oncogene in Burkitt's lymphoma.
Mutat. Res. Gen. Tox. En. 628:129/137, 2007

Cutrona G.-Boffa L.-Mariani M.-Matis S.-Damonte G.-Millo E.-Roncella S.-Ferrarini M.
The peptide nucleic acid targeted to a regulatory sequence of the translocated c/myc oncogene in Burkitt's lymphoma lacks immunogenicity: follow up characterization of PNAEmu/NLS.
Oligonucleotides 17:146/150, 2007

Matis S.-Mariani MR.-Cutrona G.-Cilli M.-Piccardi F.-Daga A.-Damonte G.-Millo E.-Moroni M.-Roncella S.-Fedeli F.-Boffa LC.-Ferrarini M.
PNAEmu can significantly reduce Burkitt's Lymphoma tumor burden in a SCID mice model: cells dissemination similar to the human disease.
Cancer Gene Therapy, in press

Ottimizzazione del trattamento della leucemia linfatica cronica sulla base dell'espressione di fattori prognostici molecolari e cellulari

Linea di ricerca: 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Programma: a - Caratterizzazione del paziente con diagnostica convenzionale e biologica finalizzata all'ottimizzazione del trattamento

Responsabile: Manlio Ferrarini

Partecipanti: Daniele Reverberi, Lidia C. Boffa

Durata: 2006-2008

Parole chiave: leucemia linfatica cronica; cellule B; traduzione del segnale; chemioterapia; progressione neoplastica

Altre strutture IST: S.S. Malattie Linfoproliferative (G. Cutrona, S. Zupo); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini); S.C. Terapia Immunologica (M. Fabbì)

Altri Enti coinvolti: S.C. Ematologia, Ospedale di Cosenza (F. Morabito); S.C. Oncologia Medica, Ospedale di Catanzaro (S. Molica); S.C. Ematologia, Ospedale S. Martino di Genova (A.M. Carella); U.O. Ematologia 2, Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Milano - Ospedale Maggiore IRCCS (A. Neri); Feinstein Institute for Medical Research North Shore - LIJ Health System (N. Chiorazzi)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica sperimentale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: AIRC; MIUR FIRB

Background

Il presente progetto ha due aspetti, uno conoscitivo ed uno traslazionale, i quali sono strettamente collegati, ma per semplicità e maggior chiarezza verranno trattati separatamente.

Relativamente agli aspetti conoscitivi il progetto si propone di investigare le ragioni per cui leucemie le cui cellule esprimono ZAP-70, CD38 e utilizzano geni VH e VL delle Ig non mutati hanno una più rapida e tumultuosa espansione clonale e, in ultima analisi, un decorso molto più sfavorevole. Il modello più seguito e da noi proposto in passato postula che i geni VH e VL non mutati codificano per anticorpi ad attività naturale e polispecifica. Queste molecole sulla membrana delle cellule neoplastiche riconoscerebbero numerosi antigeni self, a seguito dell'interazione con questi, rilascerebbero l'espressione di marcatori di attivazione, inclusi CD38 e ZAP-70, i quali, a loro volta, manterrebbero la funzionalità della traduzione del segnale iniziata da IgM di membrana. Nelle leucemie dove le cellule utilizzano geni VH/VL mutati questa catena di eventi non verrebbe iniziata, in quanto le Ig di membrana non hanno attività anti self e le cellule si espanderebbero sotto la spinta di alcune (non ancora conosciute) alterazioni citogenetiche. Questo modello è ora testabile in vitro con i seguenti studi: i) studio del repertorio dei geni VH/VL delle LLC e clonaggio degli anticorpi prodotti dai cloni leucemici. In questo modo si dovrebbe stabilire una differenza significativa fra le specificità (autoreattive) dei cloni leucemici non mutati rispetto a quelli mutati; ii) studio dei meccanismi di traduzione del segnale iniziata da IgM o IgD di membrana per verificarne la funzionalità nei vari subsets di LLC. Inoltre, si potrà stabilire quali altri segnali (ad esempio provenienti da citochine o da cellule dello stroma) possano prevenire l'apoptosi e facilitare la crescita neoplastica; iii) studio della correlazione tra presenza di marcatori prognostici sfavorevoli e crescita cellulare. Come si è detto, il modello di lavoro presuppone una stimolazione antigenica come elemento promotore della LLC. Tuttavia, non tutte le LLC a prognosi sfavorevole e decorso clinico aggressivo presentano tutti i marcatori sfavorevoli; è, pertanto, opportuno verificare nell'ambito del modello proposto quali siano i ruoli fisiologici dei vari marcatori.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Negli ultimi anni, grazie alla collaborazione di svariati gruppi nel sud Italia e al Gruppo genovese di Ematologia, abbiamo potuto raccogliere all'incirca 500 casi di LLC da studiare con i marcatori molecolari e cellulari descritti sopra. Sono stati studiati retrospettivamente 350 casi stadio Binet A utilizzando tutti i parametri di decorso clinico e si è potuto verificare la predittività dei vari fattori prognostici. Infatti, i pazienti con più di due fattori sfavorevoli avevano un tempo al trattamento mediano inferiore ai tre anni, mentre quelli con fattori favorevoli non avevano virtualmente bisogno di trattamento. In conformità a questi dati, si è potuto elaborare un sistema di score sulla base del numero di fattori prognostici sfavorevoli presenti e sul loro peso individuale

In questo triennio ci siamo proposti di avviare una sperimentazione clinica controllata in cui i pazienti alla diagnosi (e allo stadio iniziale Binet) sono stati stratificati sulla base dello score. Quelli con score più sfavorevole sono stati randomizzati per essere avviati al trattamento subito o per attendere di raggiungere gli stadi più avanzati prima di essere trattati. Oggi, si attende che un paziente raggiunga gli stadi più avanzati in quanto si vuole essere sicuri della necessità del trattamento e si vuol evitare di trattare pazienti che non lo necessitano.

Sulla base dello score di fattori prognostici, si potrà individuare quei pazienti per i quali è prevedibile una rapida progressione e poi randomizzarli allo scopo di accertare l'effetto di un precoce trattamento, sull'andamento della malattia (end-point) time to re-treatment paragonato al time to treatment e sulla sopravvivenza globale. Il rationale di questo studio si fonda sul fatto che le cellule di LLC hanno un attivo turn-over (elevata proliferazione + elevata apoptosi) e che accumulano in questo processo nuove e più pericolose mutazioni trasformanti. Un blocco di questo turn-over, con la virtuale eliminazione del clone neoplastico in stadi precoci, dovrebbe causare una diminuzione di accumulo di queste mutazioni trasformanti.

Inoltre la sperimentazione con i PNA ha l'obiettivo di indicare nuove strategie terapeutiche non convenzionali mediante l'inibizione della stimolazione antigenica.

Nel suo complesso, lo studio servirà a chiarire i meccanismi di progressione neoplastica nella LLC, fornendo importanti spunti per attacchi terapeutici a vari livelli di questa crescita.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Beneficiari

I beneficiari di questo studio sono i pazienti con LLC. Sulla base dello score di fattori prognostici, si potrà infatti, individuare quei pazienti per i quali è prevedibile una rapida progressione e poi randomizzarli allo scopo di accertare l'effetto di un precoce trattamento, sull'andamento della malattia (end-point) time to re-treatment paragonato al time to treatment e sulla sopravvivenza globale. Il razionale di questo studio si fonda sul fatto che le cellule di LLC hanno un attivo turn-over (elevata proliferazione + elevata apoptosi) e che accumulano in questo processo nuove e più pericolose mutazioni trasformanti. Un blocco di questo turn-over, con la virtuale eliminazione del clone neoplastico in stadi precoci, dovrebbe causare una diminuzione di accumulo di queste mutazioni trasformanti.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

In collaborazione col Prof Antonino Neri dell'Università di Milano abbiamo ultimato un database di espressione genica di 80 casi di LLC in stadio Binet A e tipizzate per i fattori di prognosi e per le anomalie citogenetiche. I casi di LLC sono stati opportunamente assortiti per score (0, 1, 2, 3) e li abbiamo analizzati per espressione genica mediante analisi di 22.000 geni in microarray. Questo studio ha confermato differenze in "signature" nei quattro gruppi di LLC.

Questo studio è proseguito con l'analisi dei dati e di tutte le possibili correlazioni con i dati clinici dei pazienti. In particolare abbiamo trovato che le LLC con score 2-3, quindi a cattiva prognosi esprimono maggiormente rispetto a quelle a buona prognosi alcuni geni interessanti come TNFR11, CRY1, SRI ed LPL. Studi sono in corso per validare questi risultati. Abbiamo quindi organizzato nell'ambito del gruppo GISL la stesura di un protocollo di trial clinico "Prospective Randomized Trial of Immediate Treatment with Campath versus Deferred Therapy in Patients with Previously Untreated Binet Stage A B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia at High Risk for Disease Progression" e di un protocollo di studio prospettico "Prospective Collection of Biological Data of Prognostic Relevance in Patients with B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia".

Nel 2007 è stato presentato approvato dal comitato etico il protocollo per lo studio prospettico della durata di cinque anni e per il trial clinico con Alemtuzumab (Campath, CAM). Sono valutati ad oggi 280 campioni di LLC, provenienti dai centri che hanno aderito ai protocolli, per i markers biologici di prognosi (CD38, ZAP-70 e Mutazioni del gene H delle immunoglobuline). Alcuni dei pazienti positivi per 2 o 3 di questi markers (score 2-3) sono già stati randomizzati nell'ambito del protocollo del trial clinico.

Un gruppo di 18 pazienti con l'anomalia a prognosi infausta 17p- sono stati selezionati per lo studio molecolare e trascrizionale di questa anomalia mediante SNP e analisi di profilo genico, che hanno individuato 40 geni espressi diversamente nelle LLC con 17p- rispetto a quelle senza anomalia. 35 di questi erano downregolati perché mappavano nel cromosoma 17 delemo, indicando un notevole effetto dose del gene. Questi dati danno prova che la delezione del 17p ha un ruolo aggiuntivo nella patogenesi della LLC suggerendo una perdita di diversi geni soppressori del tumore.

Nell'ambito degli studi sul ruolo della stimolazione antigenica nella patogenesi della LLC, abbiamo disegnato e sintetizzato un PNA complementare all'inizio del primo esone di ZAP70.

Questo PNA, è in grado di downregolare il gene bersaglio non solo nella linea cellulare H9, fortemente ZAP70 positiva, ma anche da esperimenti preliminari in cellule B di LLC primarie ZAP70+, CD38-. L'inibizione di ZAP-70 è in grado di inibire la stimolazione da parte delle Ig di membrana di tutte le LLC trattate. Abbiamo inoltre sintetizzato PNA anti gene complementari alla catena mu delle immunoglobuline ed al gene syk. Abbiamo testato il PNA anti SYC che in maniera analoga ma più efficiente è in grado di inibire il "signaling" sia via IgM che IgD delle LLC testate.

Elenco pubblicazioni:

Chiorazzi N.-Ferrari M.

Evolving view of the in vivo kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells.

Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program :273/278, 2006

Cutrona G.-Colombo M.-Matis S.-Reverberi D.-Dono M.-Tarantino V.-Chiorazzi N.-Ferrari M.

B lymphocytes in humans express ZAP70 when activated in vivo.

Eur. J. Immunol. 36:558/569, 2006

De Toter D.-Meazza R.-Zupo S.-Cutrona G.-Matis S.-Colombo M.-Balleari E.-Pierri I.-Fabbi M.-Capaia M.-Azzarone B.-Gobbi M.-Ferrari M.-Ferrini S.

Interleukin/21 receptor (IL21R) is up regulated by CD40 triggering and mediates preapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells.

Blood 107:3708/3715, 2006

Ghiotto F.-Fais F.-Albesiano E.-Sison C.-Valetto A.-Gaidano G.-Reinhardt J.-Koltz JE.-Rai K.-Allen SL.-Ferrari M.-Chiorazzi N.

Similarities and differences between the light and heavy chain Ig variable region gene repertoires in chronic lymphocytic leukemia.

Mol Med. 12:300/308, 2006

Morabito F.-Damle RN.-Deaglio S.-Keating M.-Ferrari M.-Chiorazzi N.

The CD38 ectoenzyme family: advances in basic science and clinical practice.

Mol Med. 12:342/344, 2006

Boffa L.-Cutrona G.-Cilli M.-Matis S.-Damonte G.-Mariani M.-Millo E.-Moroni M.-Roncella S.-Fedeli F.-Ferrari M.

Inhibition of Burkitt's lymphoma cells growth in SCID mice by a PNA specific for a regulatory sequence of the translocated c/myc.

Cancer Gene Ther. 14:220/226, 2007

Boffa L.-Menichini P.-Bolognesi C.-Cutrona G.-Roncella S.-Damonte G.-Millo E.-Mariani M.-Matis S.-Russo D.-Ciliutti P.-Ferrari M.

Lack of mutagenicity and clastogenicity of PNAEmu/NLS targeted to a regulatory sequence of the translocated c/myc oncogene in Burkitt's lymphoma.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Mutat. Res. Gen. Tox. En. 628:129/137, 2007

Cutrona G.-Boffa L.-Mariani M.-Matis S.-Damonte G.-Millo E.-Roncella S.-Ferrarini M.
The peptide nucleic acid targeted to a regulatory sequence of the translocated c/myc oncogene in Burkitt's Lymphoma lacks immunogenicity: follow up characterization of PNAEmu/NLS.
Oligonucleotides 17:146/150, 2007

Dono M.-Burgio V.-Colombo M.-Sciacchitano S.-Reverberi D.-Tarantino V.-Cutrona G.-Chiorazzi N.-Ferrarini M.
CD5+ B cells with the features of subepithelial B cells found in human tonsils.
Eur. J. Immunol. 37:2138/2147, 2007

Molica S.-Cutrona G.-Vitelli G.-Mirabelli R.-Molica M.-Digiesi G.-Ribatti D.-Ferrarini M.-Vacca A.
Markers of increased angiogenesis and their correlation with biological parameters identifying high risk patients in early B cell chronic lymphocytic leukemia.
Leuk. Res. 31:1575/1578, 2007

Sabattini E.-Rocio O.-Campidelli C.-Zinzani P.-Callea V.-Zupo S.-Cutrona G.-Morabito F.-Ferrarini M.-Pileri S.
B cell chronic lymphocytic leukaemia small lymphocytic lymphoma: role of ZAP/70 determination on bone marrow biopsies.
J. Clin. Pathol. 60:627/632, 2007

Cutrona G.-Colombo M.-Matis S.-Fabbi M.-Spriano M.-Callea V.-Vigna E.-Gentile M.-Zupo S.-Chiorazzi N.-Morabito F.-Ferrarini M.
Clonal heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia cells: superior response to surface IgM cross linking in CD38, ZAP/70 positive cells.
Haematologica 93:413/422, 2008

De Toter D.-Meazza R.-Capaia M.-Fabbi M.-Azzarone B.-Balleari E.-Gobbi M.-Cutrona G.-Ferrarini M.-Ferrini S.
The opposite effects of IL/15 and IL/21 on CLL B cells correlate with differential activation of the JAK/STAT and ERK1/2 pathways.
Blood 111:517/524, 2008

Fabris S.-Mosca L.-Todoerti K.-Cutrona G.-Lionetti M.-Intini D.-Matis S.-Colombo M.-Agnelli L.-Gentile M.-Spriano M.-Callea V.-Festini G.-Molica S.-Lambertenghi G.-Morabito F.-Ferrarini M.-Neri A.
Molecular and transcriptional characterization of 17p loss in B cell chronic lymphocytic leukemia.
Genes Chromosomes Cancer 47:781/793, 2008

Molica S.-Digiesi G.-Mauro F.-Mirabelli R.-Cutrona G.-Vitelli G.-Morabito F.-Iuliano F.-Foa' R.-Ferrarini M.
Increased serum BAFF (B cell activating factor of the TNF family) level is a peculiar feature associated with familial chronic lymphocytic leukemia.
Leuk. Res. Epub Jun 13, 2008

Molica S.-Vitelli G.-Cutrona G.-Todoerti K.-Mirabelli R.-Digiesi G.-Giannarelli D.-Sperduti I.-Molica M.-Gentile M.-Morabito F.-Neri A.-Ferrarini M.
Prognostic relevance of serum levels and cellular expression of adiponectin in B cell chronic lymphocytic leukemia.
Int. J. Hematol. 88:374/380, 2008

Molica S.-Vitelli G.-Cutrona G.-Todoerti K.-Mirabelli R.-Digiesi G.-Morabito F.-Neri A.-Ferrarini M.
Serum thrombopoietin compared with ZAP/70 and immunoglobulin heavy chain gene mutation status as a predictor of time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia.
Leuk. Lymphoma 49:62/67, 2008

Presentazione a convegni:

Ferrarini M.-Dono M.-Burgio V.L.-Morabito F.-Colombo M.-Cutrona G.-Chiorazzi N.
The cell of origin of chronic lymphocytic leukaemia.
Hematology the European haematology association education program: 180/185. 11th Congress, Amsterdam 15-18 Giugno, 2006

Fattori genetici prognostici o predittivi di risposta alle terapie antineoplastiche

Linea di ricerca: 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

Programma: c - Identificazione di indicatori di risposta ai trattamenti

Responsabile: Manlio Ferrarini

Partecipanti: Loredana Miglietta, Patrizia Piccioli, Martina Serra, Fabrizio Loiacono, Simona Pedemonte, Sonia Lastraioli

Durata: 2006-2008

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Parole chiave: farmacogenetica; tailoring terapeutico; polimorfismi, SNP

Altre strutture IST: S.C. Oncologia Medica A (S. Chiara, L. Del Mastro); S.C. Patologia Clinica (M. Paganuzzi, P. Marroni); S.C. Genetica dei Tumori (M.P.Pistillo); S.S. Centro Tumori Ereditari (L. Varesco); S.S. Genomica Funzionale (U. Pfeffer); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini)

Altri Enti coinvolti: Oncologia, Università di Parma (A. Ardizzoni); Istituto Toscano Tumori (R. Notaro); IGB-CNR, Napoli (M. De Angioletti); Istituto Regina Elena, Roma (A.M. Cianciulli); Università Federico II, Napoli (B.M. Veneziani)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica sperimentale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Fondazione CARIGE; Ministero della Salute; Compagnia San Paolo

Background

L'efficacia e la tossicità dei farmaci può variare notevolmente nei singoli individui. Le cause della variabilità individuale nella risposta ai farmaci sono numerose, ma è verosimile che una discreta parte di essa sia dovuta a variazioni genetiche ereditarie delle molecole coinvolte nel metabolismo e nell'azione dei farmaci. La farmacogenetica studia le possibili correlazioni tra i marcatori genetici della variabilità individuale (in particolare quelli relativamente frequenti nella popolazione: polimorfismi) e il risultato, sia in termini di efficacia sia in termini di tossicità, dei trattamenti. Vari studi hanno identificato possibili correlazioni tra il risultato del trattamento e polimorfismi genici. Per es. studi preliminari suggeriscono che polimorfismi del gene CYP19, che aumentano i livelli di aromatasi, e polimorfismi del gene CYP2D6 e SULT1A1, coinvolti nel metabolismo del TAM, potrebbero influenzare la terapia ormonale. L'analisi della variabilità genetica potrebbe, quindi, fornire ulteriori criteri, da affiancare a quelli classici (clinici, anatomo-patologici e biologici), per la scelta della terapia ormonale ideale.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo è quello di valutare l'impatto di varianti polimorfiche di geni coinvolti nel metabolismo degli estrogeni e/o nel metabolismo dei farmaci antiestrogenici e di correlarle con l'efficacia e/o la tossicità delle terapie ormonali (tamoxifene o inibitori dell'aromatasi).

Vari geni della famiglia del citocromo P450 sono coinvolti nel metabolismo del tamoxifene. Tra questi un ruolo di primaria importanza è svolto dal CYP2D6 ed è stato dimostrato che alcune sue varianti polimorfiche a bassa attività riducono l'attivazione del tamoxifene. Analogamente per il SULT1A1, che catalizza la solfatazione di vari substrati tra cui metaboliti idrossilati del tamoxifene, è stata identificata una variante genetica (G638A) che codifica per una proteina con un'attività due volte inferiore a quella normale. Poiché CYP2D6 e SULT1A1 hanno un ruolo importante nel processo di attivazione ed inattivazione dei metaboliti del Tamoxifene, è probabile che varianti genetiche che influenzino l'attività di questi enzimi possano essere responsabili dell'efficacia e/o della tossicità del trattamento con Tamoxifene; tuttavia i dati finora disponibili sono controversi.

In collaborazione con la S.C. Oncologia Medica A e la S.S. Genomica Funzionale sono stati analizzati polimorfismi genetici del CYP2D6 e SULT1A1 per verificare la correlazione con la risposta al trattamento e con la tossicità/tollerabilità della terapia con TAM, in pazienti con cancro della mammella, recettore positivo, ricadute e non ricadute durante terapia, arruolate secondo uno schema caso-controllo. La frequenza delle varianti polimorfiche a bassa attività osservata nelle pazienti ricadute durante il trattamento (casi) sarà confrontata con quella osservata in pazienti con caratteristiche cliniche e biologiche simile che non sono ricadute (controlli). Sarà inoltre valutata la relazione tra i genotipi CYP2D6 e SULT1A1 e la frequenza di eventi avversi. Inoltre, nell'ambito di uno studio clinico prospettico (GIM5) sono stati analizzati polimorfismi (SNPs) del gene CYP19A1, che codifica per l'aromatasi, con l'obiettivo di predire l'efficacia (DFS e OS) e la tollerabilità della terapia con Letrozolo (in collaborazione con le suddette strutture).

Beneficiari

Pazienti operate per tumore della mammella ormono-responsivo candidate ad un trattamento con inibitori della aromatasi o con tamoxifene. Se le correlazioni tra polimorfismi ed efficacia di queste terapie saranno confermate, il semplice studio dei polimorfismi genetici permetterà di selezionare a priori le pazienti che beneficeranno di un certo farmaco e consentirà di scegliere per ogni singolo paziente il trattamento più adeguato.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Farmacogenetica del tamoxifene. In collaborazione con la S.S. Genomica Funzionale e la S.C. Oncologia Medica A è in corso uno studio caso-controllo per valutare il possibile ruolo di alcuni polimorfismi del citocromo P450 (gene CYP2D6), che definiscono soggetti poor metabolizer e del SULT1A1 (638G>A; ridotta attività enzimatica), sull'efficacia della terapia con tamoxifene, in pazienti con cancro della mammella. Sono state arruolate 156 pazienti di cui 17 casi e 138 controlli. L'analisi della variante CYP2D6*4 (1846G>A, splicing difettoso) evidenzia una frequenza complessiva di 0.817 per l'allele G e di 0.183 per allele A (2n=312), con una distribuzione, all'interno dei 2 gruppi sperimentali, di 0.79 nel gruppo dei casi (27/34) e 0.82 nel gruppo dei controlli (228/278) per l'allele G funzionale (*1) e rispettivamente di 0.21, nel gruppo dei casi (7/34) e 0.18, nel gruppo dei controlli (50/278), per l'allele A (*4). Ottanta dei 156 campioni raccolti sono stati analizzati per le varianti CYP2D6*3 (2549delA, frameshift) e *6(1707delT): sia i casi (n=17), sia i controlli (n=63) presentano il genotipo wild type (*1/*1); nel caso della variante *5 (delezione del gene CYP2D6) quattro campioni del gruppo di controllo (4/63) sono risultati eterozigoti *1/*5.

Lo SNP 638G>A del SULT1A1 è stato analizzato su 145 dei 156 pazienti arruolati. L'allele G wild type (*1) ha una prevalenza maggiore nel gruppo dei casi (0.88 casi vs 0.70 controlli, 2n=256); sono stati infatti osservati: a) nel gruppo dei casi: 13 omozigoti G/G (*1/*1; frequenza 0.76), 4 eterozigoti G/A (*1/*2; 0.24) e nessun omozigote A/A (*2/*2) e b) nel gruppo dei controlli: 64 omozigoti G/G (*1/*1; frequenza 0.5), 50 eterozigoti G/A (*1/*2; 0.39) e 11 omozigoti A/A (*2/*2; frequenza 0.11; deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg non significativa).

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Complessivamente, il numero di pazienti ad oggi arruolate è insufficiente per poter trarre conclusioni significative e/o stabilire correlazioni tra i polimorfismi analizzati e l'efficacia della terapia con tamoxifene.

Polimorfismi del gene CYP19A1 (studio GIM5). In collaborazione con le strutture di Oncologia Medica A e Genetica dei Tumori abbiamo analizzato, nell'ambito dello studio GIM5, quattro polimorfismi (SNPs) del gene CYP19A1 (aromatasi) in 265 donne in postmenopausa, con carcinoma mammario operato, trattate per cinque anni con letrozolo, dopo cinque anni di tamoxifene. La frequenza all'allelica osservata per lo SNPs rs10046(C>T) è risultata di 0.489 per l'allele C e di 0.511 per l'allele T (2n=530), con una distribuzione nei tre genotipi di 0.234 e 0.257 per gli omozigoti C/C e T/T e 0.509 per gli eterozigoti C/T. Per il polimorfismo rs4646 l'allele G è risultato più frequente rispetto all'allele T (0.74 vs. 0.26). Per lo SNP rs749292, 82 pazienti sono risultate omozigoti C/C (frequenza 0.309), 46 omozigoti T/T (0.174) e 137 eterozigoti C/T (0.517); per il polimorfismo rs727479, la frequenza osservata è risultata di 0.136 e 0.374 per gli omozigoti G/G e T/T e di 0.491 per gli eterozigoti T/G. Per tutti gli SNPs analizzati non sono state osservate deviazioni significative dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. Per 174 pazienti gli SNPs sono stati correlati con i livelli basali plasmatici di estrone solfato (Dott. Lunardi, Dott.ssa Vannozzi, S.C. Genetica dei Tumori). I risultati ottenuti indicano che determinati genotipi o aplotipi sono correlabili a livelli basali più alti di Estrone Solfato: in pazienti con aplotipo T-G (allele T, rs10046 ed allele G,rs4646) presente sia in singola (--/TG), sia in doppia coppia (TG/TG), i valori medi osservati sono risultati più alti del 38% e 51% (vs. pazienti --/--). Per l'aplotipo T-T (T-rs749292 e T-rs727479) si osserva un aumento del 36% e del 41% in pazienti --/TT e TT/TT vs. (--/--).

Espressione dell'aromatasi. In collaborazione con S.C. Oncologia Medica A, S.S. Genomica Funzionale, S.C. Anatomia e Citoistopatologia e S.C. Genetica dei Tumori è in corso un progetto che si propone, tra l'altro, di valutare se, nel tumore della mammella endocrino-responsivo, SNPs del gene CYP19A1 siano correlati ai livelli di espressione dell'aromatasi nel tessuto tumorale e normale ed all'efficacia della terapia (sopravvivenza libera da malattia a 5 anni). RNA è stato estratto da tessuto operatorio tumorale, tessuto adiposo vicino e distale di 17 pazienti; i livelli di espressione del gene CYP19A1 sono stati quantizzati tramite Real Time-PCR, normalizzati vs. i livelli di espressione di geni housekeeping (RP2-TBP) ed espressi vs. RNA di placenta, che ha alti livelli di aromatasi (calibratore). Il tessuto adiposo adiacente al tumore sembrerebbe esprimere livelli medi di messaggero per l'aromatasi, leggermente più alti, sebbene i risultati siano ancora molto preliminari.

Polimorfismi del gene CTLA-4. In collaborazione con la dott.ssa M.P.Pistillo (Lab. Tumori Mammari, S.C. Genetica dei Tumori) ed il Dott. R. Notaro (Ist. Tumori Toscano - Firenze) sono state messe a punto nuove metodologie per l'analisi degli SNPs -318C>T, +49A/G e CT60A>G del gene CTLA-4. Sono state analizzate 133 coppie di donatori-riceventi, sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche da fratello identico per HLA (Centro Trapianti di Midollo Osseo, Osp. San Martino, Ge). Il numero di copie dell'allele G (+49A/G) presenti nel ricevente è risultata significativamente associata ad un aumento della OS, così come ad una più lunga DFS e riduzione di ricadute; nessuna correlazione è stata osservata per gli altri 2 SNPs analizzati. L'analisi multivariata (regressione di Cox) ha confermato il significato prognostico indipendente dello SNP +49A/G del ricevente, sia per OS, sia per DFS.

Elenco pubblicazioni:

Piccioli P.-Serra M.-Gismondi V.-Pedemonte S.-Loiacono F.-Lastraioli S.-Bertario L.-De Angioletti M.-Varesco L.-Notaro R.

Multiplex tetra primer amplification refractory mutation system PCR to detect 6 common germline mutations of the MUTYH gene associated with polyposis and colorectal cancer.
Clin. Chem. 52:739/743, 2006

Balbi G.-Ferrera F.-Rizzi M.-Piccioli P.-Morabito A.-Cardamone L.-Ghio M.-Palmisano G.-Carrara P.-Pedemonte S.-Sessarego M.- De Angioletti M.-Notaro R.-Indiveri F.-Pistillo M.P.

Association of -318 C/T and +49 A/G cytotoxic T lymphocyte antigen/4 (CTLA/4) gene polymorphisms with a clinical subset of italian patients with systemic sclerosis.
Clin. Exp. Immunol. 149:40/47, 2007

Piccioli P.-Serra M.-Pedemonte S.-Balbi G.-Loiacono F.-Lastraioli S.-Gargiulo L.-Morabito A.-Zuccaro D.-Del Mastro L.-Pistillo M.P.-Venturini M.-De Angioletti M.-Notaro R.

Hexaprimer amplification refractory mutation system PCR for simultaneous single tube genotyping of 2 close polymorphisms. Letter.
Clin. Chem. 54:227/229, 2008

Lastraioli S.-Chiara S.-Gargiulo L.-Leonardi F.-Marroni P.-Serra M.-Sonaglio C.-Piccioli P.-Franzini E.-Ponzanelli A.-Paganuzzi M.-Boni L.-De Angioletti M.-Ardizzoni A.-Notaro R.

Polymorphisms in the UGT1A family and the risk of toxicity in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan.
Submitted

Piccioli P.-Balbi G.-Serra M.-Morabito A.-Lamparelli T.-Gobbi M.-Laurent S.-Dozin B.-Bruzzi P.-Bacigalupo A.-Notaro R.-Pistillo M.P.

CTLA-4 +49 A>G polymorphism of recipients of HLA-matched sibling allogeneic stem cell transplantation is associated with survival and relapse incidence.
Biol. Blood Marrow Transplant., submitted

Presentazione a convegni:

Balbi G.-Palmisano G.L.-Morabito A.-Piccioli P.-Notaro R.-Rizzi M.-Ferrera F.-Indiveri F.-Pistillo M.P.
Analysis of CTLA-4 genetic polymorphisms in Italian sclerodermic patients.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Comunicazione al Congresso "Skin, Rheumatism and Autoimmunity". Abano Terme 2-4 Febbraio 2006. Clinical and Experimental Rheumatology. Vol.24 suppl. 40, OP12 pg.S90, 2006

Lastraioli S.-Ponzanelli A.-Leonardi F.-Marroni P.-Serra M.-Sonaglio C.-Loiacono F.-Zuccaro D.-Naldi N.-Franzini E.-Boni L.-Paganuzzi M.-Ardizzoni A.-Chiara S.-Notaro R.
Polymorphisms in UGT1A1 and UGT1A7 may predict irinotecan toxicity in patients with advanced colorectal cancer.
VIII Congresso AIOM, Milano, 18 – 21 Novembre 2006

Balbi G.-Ferrera F.-Rizzi M.-Piccioli P.-Morabito A.-Cardamone L.-Ghio M.-Palmisano G.-Carrara P.-Notaro R.-Indiveri F.-Pistillo M.P.
Genetic polymorphisms of CTLA-4 gene in Italian patients with systemic sclerosis.
Comunicazione all'International Workshop on Systemic Sclerosis "Gene-polymorphisms, clinical variants and response to therapy", Milano 7-10 Marzo 2007

Piccioli P.-Balbi G.-Serra M.-Morabito A.-Lamparelli T.-Gobbi M.-Laurent S.-Dozin B.-Bruzzi P.-Bacigalupo A.-Pistillo M.P.-Notaro R.
CTLA-4+49 A>G polymorphism of recipient of HLA-matched sibling allogeneic stem cell transplantation is associated with survival and relapse incidence.
International Symposium on Cancer genotypes and Cancer phenotypes. Firenze, 4-5 luglio 2008

Lastraioli S.-Gargiulo L.-Sonaglio C.-Leonardi F.-Marroni P.-Serra M.-Boni L.-Paganuzzi M.-De Angioletti M.-Ardizzoni A.-Chiara S.-Notaro R.
Allele *3 of UGT1A7 gene identifies patients with high risk of experiencing severe toxicity when treated with irinotecan.
International Symposium on Cancer genotypes and Cancer phenotypes. Firenze, 4-5 luglio 2008

Piccioli P.-Balbi G.-Serra M.-Morabito A.-Lamparelli T.-Gobbi M.-Laurent S.-Dozin B.-Bruzzi P.-Bacigalupo A.-Notaro R.-Pistillo M.P.
CTLA-4+49 A>G polymorphism of recipient of HLA-matched sibling allogeneic stem cell transplantation is associated with survival and relapse incidence.
X Congress of the Italian Society of Experimental Hematology (SIES). Bari, 24-26 settembre 2008

Venturini M.-Serra M.-Piccioli P.-Levaggi A.-Boni L.-Vannozzi M.-Aitini E.-Boni C.-Bottini A.-Cianciulli A.-Cognetti, F.-DePlacido S.-DiBlasio B.-Driol P.-Fava S.-Merlano M.C.-Ponzzone R.-Porpiglia M.-Scognamiglio G.-DelMastro L.-Notaro R.-Lunardi G.
Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of CYP19A1 are associated with plasma levels of Estrone Sulfate (ES) in postmenopausal women with breast cancer (BC).
Annals of Oncology. Supplement 9: 10th National Congress of Medical Oncology, Verona 11-14 October 2008