

S.C. Oncologia Medica C

Splenic Marginal Zone Lymphoma (SMZL): caratterizzazione di subset fondata su marcatori cellulari e molecolari e identificazione della cellula di origine

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

Responsabile scientifico: Manlio Ferrarini

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Lidia C. Boffa, Daniele Reverberi

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: linfoma splenico della zona marginale; marker diagnostici; subsets; diagnosi differenziale; linfociti B

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini); S.S. Malattie Linfoproliferative (S. Zupo)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: diagnostica

Soggetti cofinanziatori: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; GISL

Background

Nell'ultima classificazione WHO dei tumori del sistema linfoide ed emopoietico, il linfoma splenico della zona marginale (SMZL) è definito, come una entità patologica indipendente che origina da cellule B mature periferiche. Il SMZL è un tumore raro che rappresenta meno del 2% dei linfomi a piccole cellule. La definizione di SMZL si basa principalmente su alcune caratteristiche clinico-patologiche generali, che includono splenomegalia, accumulo di linfociti B (con morfologia e caratteristiche fenotipiche simili ai linfociti B normali della zona marginale) nella milza, midollo e sangue periferico; ha generalmente un andamento indolente, che può tuttavia essere caratterizzato da citopenia, a volte severa. Nonostante alcune caratteristiche comuni, vi sono alcune criticità diagnostiche evidenziate nella classificazione WHO che suggeriscono che il SMZL comprenda in realtà diverse sub-entità. Queste indicazioni trovano supporto nella recente descrizione della eterogeneità fenotipica e funzionale sia delle cellule normali della zona marginale della milza che delle cellule delle aree equivalenti della zona marginale (cellule B dell'area sub-capsulare dei linfonodi, della zona sottoepiteliale delle placche di Peyer e dell'area sub-epiteliale delle tonsille). Le cellule della MZ o MZ equivalente comprendono infatti cellule IgM ++, IgD+/- specializzate in risposte T-indipendenti verso antigeni polisaccaridici dei batteri, che si pensa proliferino in situ nella MZ, ma anche cellule IgG e IgA. Una simile eterogeneità è stata descritta per le cellule maligne del linfoma splenico della zona marginale sia a livello fenotipico (sono generalmente CD20+, CD22+, CD24+, CD27+, FMC7 +, CD79b+), mentre altri marcatori come CD23 e CD5 sono variabili), molecolare (in certi casi il clone neoplastico utilizza per esempio segmenti genici IGH VDJ mutati, in altri casi i geni IGHV sono in configurazione germ line) e citogenetico (le più frequenti aberrazioni genetiche sono sul 3q e 12 q con guadagno di materiale genetico e delezione sul 7q22-36). L'eterogeneità dei pazienti e l'impossibilità di classificare al presente questa eterogeneità con precisione potrebbe spiegare i risultati piuttosto inconclusivi di un certo numero di trial clinici nei quali veniva valutato il trattamento dei pazienti affetti da SMZL con varie combinazioni di farmaci chemioterapici-immunoterapici. Inoltre, la risposta alla terapia e la durata di remissione sono le variabili maggiori e la splenectomia rimane l'approccio terapeutico più ampiamente usato nella corrente pratica clinica, nonostante i rischi connessi alla procedura chirurgica e al fatto che essa rappresenta una non definitiva opzione di cura.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

I maggiori problemi con il SMZL derivano dall'aspetto eterogeneo della patologia connessa alla differente origine cellulare e alle differenti caratteristiche del clone neoplastico nelle diverse forme di SMZL. Al fine di raggiungere una classificazione di queste rare entità patologiche, ci si propone di:

- definire le varianti del SMZL basandosi su criteri cellulari, molecolari e genetici
- determinare la cellula di origine del SMZL e delle sue varianti basata su un'accurata analisi fenotipica e sullo studio del repertorio genico usato dalle cellule neoplastiche e dalle corrispondenti normali.
- analizzare l'espressione genica (GEP) del SMZL e delle sue varianti confrontandola con i profili genici delle cellule della controparte normale.

Tutti questi approcci sono stati ampiamente utilizzati nei nostri laboratori in passato per le CLL ed hanno fornito importanti informazioni sull'eterogeneità di questa malattia. Questi studi verranno condotti in parallelo sulle cellule B della MZ e della zona equivalente della MZ di altri tessuti linfoidei, per ottenere significative correlazioni sul potenziale legame progenitore-effettore tra le cellule normali e le cellule neoplastiche. Il nostro gruppo di ricerca ha acquisito in tal senso una considerevole esperienza nella separazione e caratterizzazione delle diverse sottopopolazioni di cellule B normali.

Infine, i risultati di questi studi potranno delineare lo spettro di eterogeneità del linfoma SMZL e portare alla definizione di varianti caratterizzate da differenti proprietà delle cellule maligne che includono il fenotipo di superficie identificato con anticorpi monoclonali, il repertorio genico del gene IGHV, l'origine cellulare della cellula maligna e possibilmente anche il profilo genico. Questi studi potranno condurre all'identificazione di un limitato numero di marker

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

molecolari e cellulari capaci di distinguere le varianti della malattia. Stiamo collaborando con un network nazionale ed europeo che permetterà di accedere sia a materiale patologico conservato che a campioni freschi provenienti da trial clinici. Questo renderà possibile avere accesso ad una coorte di pazienti sufficientemente ampia per definire le distinte entità patologiche e rianalizzare alcuni trial clinici già conclusi, con una nuova stratificazione dei pazienti, basandosi su caratteristiche cellulari/molecolari sopra riportate.

Impatto assistenziale certo o potenziale

I maggiori problemi connessi al SMZL riguardano la diagnosi clinico-patologica e la classificazione. Questi problemi sono già descritti nell'ultima classificazione WHO che evidenzia una serie di criticità nella definizione classica di linfoma splenico della zona marginale. Inoltre questa classificazione include patologie spleniche che sono considerate "provvisorie" e comprendono "la variante del linfoma/leucemia splenico B inclassificabile, linfoma splenico diffuso a piccoli linfociti B della polpa rossa, una variante della hairy cell leukaemia". Queste patologie possono invero essere correlate al linfoma splenico della zona marginale. L'approccio qui proposto può aiutare a riclassificare tutte queste diverse forme patologiche su base "cellulare" che include la definizione di cellula di origine. Inoltre, questo studio può offrire nuovi mezzi per un approccio diagnostico semplificato estendibile alla routine di un laboratorio di patologia. Questo studio non solo ha il potenziale di portare risultati di valore concettuale, ma ha anche una importanza pratica. Data l'imprecisione nella diagnosi e classificazione del linfoma splenico, la terapia è infatti basata largamente su approcci tradizionali "empirici". Inoltre i trial clinici finora condotti con chemioterapie e immunoterapie hanno dati risultati insoddisfacenti, principalmente dovuti all'eterogeneità dei pazienti inclusi nello studio. Con una nuova modalità di classificazione sarà possibile definire delle linee guida per le terapie. Inoltre, i risultati dei vecchi trial saranno analizzati retrospettivamente alla luce di una nuova classificazione e nuovi trial dovranno tener conto di questa eterogeneità della malattia.

Risultati e prodotti 2009

Sebbene l'eziologia del SMZL sia ancora sconosciuta, è stato suggerito che almeno in alcuni pazienti una persistente stimolazione antigenica potrebbe essere responsabile della iniziale attivazione policlonale e della successiva selezione di un clone B, che a seguito di deregolazione genica, assume le caratteristiche di clone neoplastico. Da un punto di vista molecolare, gli studi dei riarrangiamenti IGH VDJ nel SMZL hanno evidenziato che la maggior parte dei pazienti presenta un clone con un gene IGHV mutato. Inoltre è stato evidenziato un non random utilizzo di geni IGHV con una prevalenza di cloni che utilizzano i geni IGHV1-3 e IGHV4-34.

Manca tuttavia in letteratura una analisi dettagliata delle cellule B della milza che è necessaria per comprendere la cellula di origine del linfoma splenico. Nel corso di quest'anno abbiamo completato il database di sequenze IGHVDJ ottenute mediante clonaggio molecolare delle cellule B isolate mediante FACS da diversi subset di cellule B normali della milza, in particolare linfociti del centro germinativo e della zona marginale. Il nostro studio si è focalizzato sullo studio dei geni IGHV 1, 3 e 4. L'analisi dei geni IGHV della zona marginale ha evidenziato che l'85% dei cloni è mutato, mentre una parte di questi è non mutata. Questa potrebbe rappresentare la controparte normale di quella piccola percentuale di linfomi splenici che presentano geni VH non mutati.

Da una prima analisi di questi dati è emerso che le cellule della zona marginale presentano segni di espansione e diversificazione in situ che sono il riflesso di una persistente stimolazione antigenica. Il fenomeno della diversificazione sembra peraltro essere esclusivo della zona marginale, almeno quando lo studio è focalizzato ai linfociti B di classe IgM, mentre nel centro germinativo il fenomeno della diversificazione è presente se si analizzano i linfociti B di classe IgG.

Il database attuale comprendente circa 700 sequenze isolate da 5 diverse milze potrà essere così confrontato con i riarrangiamenti IGHVDJ dei linfomi splenici già presenti in letteratura o ottenuti mediante analisi di prelievi afferenti al nostro laboratorio.

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Nel corso del 2010 le attività previste nell'ambito del progetto saranno volte all'ottenimento di campioni di SMZL al fine di una caratterizzazione fenotipica, molecolare e citogenetica completa.

Come è noto, il linfoma splenico della zona marginale rientra nella categoria delle malattie rare e quindi il reperimento di campioni non è di facile attuazione.

Nella banca cellule dell'Istituto sono presenti una decina di campioni di linfoma splenico della zona marginale.

Questi campioni saranno studiati attraverso una caratterizzazione cellulare mediante una serie di anticorpi monoclonali diretti verso CD19, CD3, CD20, CD5, CD10, CD23, CD24, CD27, CD11c, CD103, CD25 e verso le immunoglobuline di superficie per caratterizzare il profilo fenotipico del clone. Le cellule maligne verranno quindi analizzate in PCR per individuare il riarrangiamento IGH V-D-J e IGL- VJ espresso dal clone maligno. Studi di citogenetica convenzionale usando tecniche di banding e laddove possibile tecniche di FISH saranno applicate per individuare le anomalie genetiche.

L'analisi cellulare e molecolare è mirata all'identificazione della controparte normale della cellula di origine del linfoma splenico. In questo senso si estenderanno anche gli studi della controparte normale attraverso una colorazione in immunoistochimica e in immunofluorescenza (microscopio confocale) di sezioni di milza normale. Questa analisi permetterà una più dettagliata definizione della composizione cellulare della zona marginale. Infatti, le cellule della zona marginale della milza, che presentano una chiara localizzazione anatomica, sono invero una popolazione complessa ed eterogenea il cui ruolo di cellule memoria e di cellule rispondenti ad antigeni T-indipendenti deve essere ancora in parte chiarita. L'analisi fenotipica delle sezioni verrà infine completata da uno studio molecolare effettuato attraverso microdissezione delle aree di interesse (zona marginale e centri germinativi) e successivo studio del repertorio IGH VDJ delle cellule isolate da queste stesse aree anatomiche.

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

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

Responsabile scientifico: Lidia C. Boffa

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Manlio Ferrarini, Rosanna Massara

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: Acidi Peptidil Nucleici (PNA); terapia anti-gene; oncogene Bcl2; linfoma centro follicolare (FL); topi SCID

Altre strutture IST partecipanti: S.S. Malattie Linfoproliferative (G. Cutrona); S.S. 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 (G. Damonte, E. Millo); U.O. Anatomia e Istologia Patologica, ASL 5, La Spezia (S. Roncella, M. Moroni, F. Fedeli)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: MIUR; Ministero della Salute

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 terapie antitumorali basate sull'utilizzo dei PNA anti-gene. 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 nonché l'efficacia antitumorale anche nella forma disseminata del tumore, simile a quella umana.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Ci prefiggiamo di valutare l'efficacia terapeutica del PNAEmu, con sequenza complementare a quella dell'enhancer Emu del locus della catena IgH sul cromosoma 14, già utilizzato con successo nel trattamento del Linfoma di Burkitt in sistemi modello murini, come possibile farmaco a livello genico anche per il trattamento del linfoma centro follicolare (FL)

Infatti anche nel linfoma follicolare, l'oncogene bcl-2 viene traslocato vicino alla sequenza intronica Emu (enhancer dei geni Ig) che regola la trascrizione dei geni delle immunoglobuline (che nelle cellule B avviene a un ritmo elevato). La vicinanza con Emu, a seguito della traslocazione cromosomica, determina una iperespressione dell'oncogene anti apoptotico bcl-2 che codifica per una proteina della membrana mitocondriale BCL-2 che blocca la "programmed cell death" o apoptosi, con conseguente espansione clonale del linfoma follicolare. Il PNAEmu, inibendo efficacemente l'enhancer Emu, dovrebbe essere in grado di provocare il blocco della trascrizione di bcl2 traslocato, con effetti terapeutici a livello genico applicabili alla cura del linfoma follicolare.

Sarà anche valutato il potenziamento terapeutico del PNAEmu in combinazione con farmaci di provata efficacia nel FL e che agiscono attraverso meccanismi totalmente differenti/indipendenti come:

- (in vitro) etoposide/vepeside che inibisce la sintesi del DNA formando un complesso con la topo isomerasi II e il DNA. Questo complesso non solo induce rotture nella doppia elica del DNA ma ne previene il riparo. Il conseguente accumulo della frammentazione del DNA previene l'entrata delle cellule target nella fase mitotica della divisione e porta alla morte cellulare

- (in vivo) ciclofosfamide (una "prodrug" che viene convertita nel fegato nel principio attivo "mostarda di fosforamide") che forma crosslinking fra DNA a doppio filamento (interstrand crosslinkages) e fra i due filamenti del DNA a doppia elica (intrastrand crosslinkages) alla posizione N-7 delle guanine, portando così a morte cellulare

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

- il rituximab che è un anticorpo monoclonale anti-CD20 (cluster di differenziazione 20), espresso sulle cellule B. Anche se resta poco chiaro l'esatto meccanismo d'azione del farmaco, è stato possibile rilevare che gli effetti combinati conducono all'eliminazione delle cellule B (incluse quelle maligne) dall'organismo, permettendo così lo sviluppo di una nuova popolazione cellulare sana dalle cellule staminali della linea linfoide.

Impatto assistenziale certo o potenziale

FL è molto diffuso nei paesi industrializzati e per esempio negli USA comprende il 15-20% delle forme non Hodgkin. La maggior parte delle forme di FL sono indolenti con sopravvivenza superiore al 70% a 10 anni, anche senza trattamento, mentre per il 36% i pazienti sono ad alto rischio e spesso resistenti anche alle terapie più recenti ed efficaci (rituximab).

A seguito di questi dati si può evincere l'interesse di mercato del PNAEmu che è specifico per la lesione genica caratteristica di FL e che presenta minore tossicità dei farmaci convenzionali.

Risultati e prodotti 2009

Abbiamo proseguito la valutazione dell'efficacia terapeutica del PNAEmu, come farmaco antineoplastico a livello genico. In particolare ne abbiamo studiato l'efficacia per il trattamento del linfoma centro follicolare (FL) prendendo anche in considerazione il suo possibile potenziamento se usato in combinazione con farmaci di comprovata efficacia su FL ma operanti via meccanismi totalmente non correlati.

Nel 2009 quindi abbiamo prima di tutto effettuato una nuova sintesi del PNAEmu.wt nonché dei controlli PNAEmu.mut e PNAAbcl2 anti-gene in quantità e di qualità (purezza non inferiore al 98%) tali da permetterci di completare tutti gli studi pre farmacologici pianificati.

Per gli studi in vitro abbiamo utilizzato la linea cellulare RL derivata da un Linfoma Follicolare umano con iper espressione dell'oncogene anti apoptotico bcl-2 a seguito alla sua traslocazione cromosomica t(14;18) vicino all'enhancer Emu dei geni Ig. Su questa linea cellulare abbiamo effettuato una valutazione nell'induzione dell'apoptosi del PNAEmu; dell'anti neoplastico Vepeside (le cui proprietà sono legate alla capacità di bloccare strutture e meccanismi coinvolti nella divisione cellulare, attraverso l'interazione con l'enzima topoisomerasi II) e successivamente dei due farmaci in combinazione.

L'apoptosi cellulare è stata valutata in citometria di flusso dopo colorazione con PI e Annessina V.

Abbiamo determinato che in cellule RL in coltura l'esposizione:

- al PNAEmu, alla concentrazione ottimale standard in soluzione di 10 microM a 72h di esposizione, induce apoptosi cellulare dell'80%

- al Vepeside anche a concentrazioni relativamente alte e per tempi lunghi (150 micro gr/ml; 72h) porta ad un massimo di morte cellulare specifica dell' 80%.

Benché i risultati sopra descritti siano significativi, il nostro scopo è di ottenere la "cura" di FL equivalente in vitro all'apoptosi del 100% delle cellule. Per definire le condizioni che inducano l'effetto massimo/ottimale apoptotico abbiamo quindi valutato le combinazioni di varie concentrazioni sia del PNAEmu sia del Vepeside a vari tempi di esposizione.

PNAEmu e Vepeside si sono mostrati indubbiamente sinergici. Infatti una dose del PNAEmu pari metà a di quella finora dimostratesi ottimale (5microM) in combinazione con una concentrazione di Vepeside modesta (50 micro M) sono in grado di indurre un'apoptosi cellulare superiore al 96% già a 24h di trattamento. Nelle stesse condizioni sperimentali la vitalità cellulare è totalmente azzerata a 72h.

Pubblicazioni

Matis S.-Mariani M.R.-Cutrona G.-Cilli M.- Piccardi F.- Daga A.- Damonte G.- Millo E.- Moroni M.- Roncella S.- Fedeli F.- Boffa L.C.-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 16:786/793, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Vista l'efficacia sinergica in vitro dell'accoppiamento di PNAEmu e Vepeside nell'indurre sia il blocco della proliferazione cellulare sia l'apoptosi di cellule FL in coltura- ci proponiamo di verificarne il potenziale antineoplastico in vivo. A questo scopo stiamo mettendo a punto un modello animale che consiste in topi SCID in cui il Linfoma Follicolare viene indotto - nella forma disseminata simile a quella umana - con inoculo nella vena caudale di cellule della linea linfomatosa umana RL. Le cellule RL in questo caso sono state in precedenza transfettate con il gene della luciferasi che le rende visibili in luminescenza - in presenza della luciferina che è il substrato di questo enzima - con l'IVIS "imaging system" (RL-luc).

Il sistema modello deve essere messo a punto determinando:

- il numero minimo di cellule RL che inducono riproducibilmente FL sistemico in tutti i topi inoculati

- la localizzazione delle cellule FL-RL determinata in via preliminare in luminescenza con l'IVIS Imaging system e quindi paragonata ai risultati; autoptici/necroscopici; istologici; immunoistochimici (Bcl2)

- l'efficacia come antineoplastico per FL del PNAEmu di per sé

- la tossicità del Vepeside in tale sistema (LD 50).

Una volta ottenuti i dati da questi test pensiamo di poter razionalmente disegnare - con la combinazione di PNAEmu e Vepeside - una strategia terapeutica innovativa e migliorativa per il linfoma follicolare ad alto grado di resistenza.

In seguito si potrà anche valutare il potenziamento terapeutico del PNAEmu in combinazione con altri farmaci di provata efficacia su FL e che agiscono attraverso meccanismi totalmente differenti dal PNA.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Ottimizzazione del trattamento della Leucemia Linfatica Cronica (LLC) fondato sulla determinazione di fattori prognostici cellulari e molecolari

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

Programma: a - Definizione del profilo di rischio individuale in pazienti con neoplasia in fase iniziale o avanzata

Responsabile scientifico: Manlio Ferrarini

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Monica Colombo, Serena Matis, Daniele Reverberi, Lidia Boffa

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: leucemia linfatica cronica; chemio-immunoterapia; marcatori cellulari e molecolari; marcatori cromosomici

Altre strutture IST partecipanti: S.S. Malattie Linfoproliferative (G. Cutrona, S. Zupo)

Altri Enti coinvolti: Ospedale Maggiore IRCCS, Milano (A. Neri)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica osservazionale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; GISL

Background

La LLC è una malattia eterogenea, nonostante la uniformità di morfologia delle cellule neoplastiche, di presentazione clinica e di decorso iniziale dei pazienti. Infatti, una frazione soltanto dei pazienti (valutabile attorno al 30% circa) progredisce verso gli stadi più avanzati della malattia e la malattia stessa in questa fase assume un decorso ingravescente e spesso mortale, nonostante le cure. I rimanenti pazienti (circa il 70%) tendono a rimanere stabili negli stadi iniziali di malattia e spesso muoiono di cause non correlate alla LLC, che permane agli stadi iniziali. L'atteggiamento terapeutico sinora seguito è stato quello di un attento "wait and see", per cui i pazienti vengono stadiati, secondo la metodica di Binet o di Rai, e sono sottoposti a trattamento secondo regole precise, quando la ristadiazione determina una progressione verso lo stadio più avanzato. Questo atteggiamento, universalmente accettato, ha il vantaggio di evitare il trattamento di pazienti con malattia stabile e destinati a non progredire verso gli stadi avanzati, ma crea il problema che i pazienti con tendenza alla progressione vengono probabilmente sottoposti a trattamento in uno stadio più tardivo, quando si è cioè certi dell'aggressività della patologia, nel quale si potrebbe ipotizzare una minor efficacia del trattamento stesso.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'avvento di alcuni marcatori prognostici evidenziati nel passato, anche dal nostro gruppo, ha indicato la possibilità di cambiare l'atteggiamento clinico sovradescritto. Ad esempio, i pazienti, le cui cellule utilizzano geni codificanti per la parte variabile delle Ig "non mutati", ed esprimono CD38 e ZAP-70, hanno un decorso clinico più aggressivo dei pazienti con cellule che utilizzano geni "mutati", e non esprimono CD38 e ZAP-70. Il nostro gruppo ha proposto una metodica di scoring dei rischi e ha impostato, nell'ambito del Gruppo Italiano per lo Studio dei Linfomi (GISL), un trial clinico preliminare con l'obiettivo di chiarire se il trattamento precoce di pazienti a rischio determina un miglioramento del DFS e dell'OS. Il presente progetto si propone di ampliare le osservazioni sovraesposte nei modi seguenti:

- determinare un nuovo panel di marcatori che permetta di valutare più accuratamente le probabilità di progressione della LLC. Per questo obiettivo si ricorrerà alle tecniche di gene expression profiling (GEP),
- determinare i rapporti fra espressione dei marcatori cellulari e marcatori citogenetici nel determinare il decorso clinico (e quindi la prognosi) dei pazienti. Il fine ultimo è quello di utilizzare un algoritmo prognostico che faccia uso di combinazioni di diversi marcatori,
- Esplorare in nuovi trials clinici la potenzialità di nuove combinazioni di farmaci. Nel trial clinico attualmente in corso nel GISL i pazienti a cattiva prognosi vengono randomizzati per il trattamento immediato o a progressione con Alemtuzumab (Campath), un anticorpo monoclonale particolarmente efficace contro le cellule di LLC. Tuttavia l'uso di tale anticorpo può indurre complicazioni anche gravi e, come tutte le terapie oggi in uso nella LLC, ha una efficacia relativamente limitata. Pertanto, nella impostazione dei nuovi trials si dovrà considerare sia il trattamento precoce dei pazienti a rischio che il tipo di trattamento con nuovi farmaci (ad es. Bendamustina) o nuovi monoclonali (ad es. CD20 di seconda generazione).

Impatto assistenziale certo o potenziale

In aggiunta ai notevoli risultati concettuali su molecole (marcatori) evidenziabili con GEP, importanti sia nel meccanismo patogenetico della malattia sia nella sua classificazione, il progetto può fornire nuove strategie terapeutiche per la cura della LLC. Nonostante le affermazioni di molti trattati di medicina, la LLC è sì una malattia indolente e a prognosi benigna, ma ciò è vero per circa il 70% dei pazienti soltanto, mentre il rimanente 30% va abbastanza rapidamente incontro a progressione e poi a morte nonostante le attuali terapie, anche le più aggressive come l'auto e anche l'allotrapianto. Pertanto, una razionalizzazione della terapia, sia nel suo timing che nel tipo di farmaci prescelti, ha una valenza molto attuale e necessaria. Ciò è tanto più vero in quanto questi pazienti presentano la malattia a età superiore ai 65 anni, laddove terapie aggressive come megachemioterapie e trapianti sono spesso precluse. D'altra parte, l'atteggiamento attendistico suggerito dalle linee guida attuali, sebbene comprensibile, può

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

facilitare l'accumulo nel clone neoplastico in espansione di alterazioni genetiche capaci di conferire resistenza ai farmaci.

Risultati e prodotti 2009

I pazienti con CLL, le cui cellule utilizzano geni codificanti per la parte variabile delle Ig "non mutati" e esprimono in CD38 e ZAP-70, hanno un decorso clinico più aggressivo dei pazienti con cellule che utilizzano geni "mutati" e non esprimono CD38 e ZAP-70. Il nostro gruppo ha proposto una metodica di scoring del rischi e ha impostato, nell'ambito del Gruppo Italiano per lo Studio dei Linfomi (GISL), un trial clinico preliminare con l'obiettivo di chiarire se il trattamento precoce di pazienti a rischio determina un miglioramento del DFS e dell' OS. Al fine di ampliare le osservazioni sovraesposte durante il 2009 sono stati processati nel nostro laboratorio 147 casi di CLL, di cui 100 arruolati nell'ambito del protocollo osservazionale prospettico O-CLL1 attivato dal GISL tutti da pazienti con leucemia linfatica cronica in stadio Binet A alla diagnosi con età inferiore ai 70 anni, gli altri 47 pazienti provenienti da diverse ematologie Italiane e assortiti per i diversi stadi di malattia e senza restrizioni di età. Tutti i casi sono stati analizzati per l'espressione dei marcatori di prognosi conosciuti: CD38, ZAP-70 e stato mutazionale dei geni IgV. Sulla base della presenza/assenza di 1, 2, o 3 di questi marcatori di prognosi sfavorevoli abbiamo ottenuto 61 casi con score 0, 31 casi con score 1, 28 casi a score 2 e 20 casi a score 3.

Inoltre abbiamo analizzato alcuni di quelli ottenuti dallo studio di gene expression profiling (GEP) condotto su 80 casi di CLL assortiti per i diversi gruppi di score prognostico, basato sulla presenza di 0, 1, 2 o 3 marcatori di prognosi sfavorevole: TNFR1, TNFR2, IL21-R, IL23-R.

IL TNFR1 non è mai espresso dalle cellule di CLL, di contro il TNFR2 è espresso per lo più dalle CLL che hanno geni delle VH non mutati e quindi a prognosi sfavorevole. Anche IL23-R sembra correlare con i fattori di prognosi sfavorevoli.

Inoltre nell'ambito del trial clinico CAM-CLL1, attualmente in corso nel GISL, 41 pazienti a cattiva prognosi sono stati randomizzati per il trattamento immediato o a progressione con Alemtuzumab (Campath), un anticorpo monoclonale particolarmente efficace contro le cellule di LLC. Questi pazienti saranno valutati per la malattia minima residua con metodi citofluorimetrici e molecolari mediante valutazione del riarrangiamento clonale delle Ig.

Pubblicazioni

Cro L.-Morabito F.-Zucal N.-Fabris S.-Lionetti M.-Cutrona G.-Rossi F.-Gentile M.-Ferrario A.-Ferrarini M.-Molica S.-Neri A.-Baldini L.

CD26 expression in mature B-cell neoplasia: its possible role as a new prognostic marker in B-CLL.

Hematol Oncol. 27(3):140/147, 2009

Gentile M.-Cutrona G.-Neri A.-Molica S.-Ferrarini M.-Morabito F.

Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages.

Haematologica 94(6):887/8, 2009

Matis S.-Mariani M.R.-Cutrona G.-Cilli M.-Piccardi F.-Daga A.-Damonte G.-Millo E.-Moroni M.-Roncella S.-Fedeli F.-Boffa L.C.-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 16:786/793, 2009

Molica S.-Digiesi G.-Mauro F.-Mirabelli R.-Cutrona G.-Vitelli G.-Morabito F.-Iuliano F.-Foà 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. 33(1):162/5,2009

Molica S.-Digiesi G.-Mirabelli R.-Cutrona G.-Antenucci A.-Molica M.-Giannarelli D.-Sperduti I.-Morabito F.-Neri A.-Baldini L.-Ferrarini M.

Serum level of CD26 predicts time to first treatment in early B-chronic lymphocytic leukemia.

Eur J Haematol. 83(3):208/14, 2009

Morabito F.- Cutrona G.- Gentile M.- Fabbi M.- Matis S.- Colombo M.- Reverberi D.- Megna M.- Spriano M.- Callea V.- Vigna E.- Rossi E.- Lucia E.- Festini G.- Zupo S.- Molica S.- Neri A.- Ferrarini M.

Prognostic relevance of in vitro response to cell stimulation via surface IgD in binet stage a CLL.

Br J Haematol. Epub Dec 8, 2009

Morabito F.- Cutrona G.- Gentile M.- Matis S.- Todoerti K.- Colombo M.- Sonaglio C.- Fabris S.- Reverberi D.- Megna M.- Spriano M.- Lucia E.- Rossi E.- Callea V.- Mazzone C.- Festini G.- Zupo S.- Molica S.- Neri A.- Ferrarini M.

Definition of progression risk based on combinations of cellular and molecular markers in patients with Binet stage A chronic lymphocytic leukaemia.

Br J Haematol. 146(1):44/53, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

I pazienti con CLL continueranno ad essere arruolati nel 2010, sia gli esordi di malattia sia le progressione di malattia dei pazienti precedentemente inseriti nel protocollo. Tutti i casi saranno nuovamente testati per i fattori di prognosi vecchi e nuovi per valutarne la stabilità nei diversi stadi di malattia. Inoltre, in collaborazione col Prof. Neri, le CLL saranno tipizzate tutte per le anomalie citogenetiche più frequenti, quali 13q-, 17p-, 11q-, trisomia 12, facilmente evidenziabili con FISH. Infine saranno condotti degli studi di GEP e SNIPS sui campioni di cellule neoplastiche.

Nuove alterazioni citogenetiche saranno individuate con l'uso di queste metodiche, e successivamente testate su un'ampia casistica mediante FISH.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Studio di marcatori predittivi di risposta al trattamento chemioterapico in pazienti con carcinoma mammario localmente avanzato: T2-4, N1-2, ER+/-, PgR+/-

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

Programma: b - Predizione della risposta ai trattamenti, inclusa la possibilità di valutare precocemente la risposta definitiva

Responsabile scientifico: Loredana Miglietta

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Paola Vanella, Sonia Lastraioli, Martina Serra, Simona Pedemonte, Patrizia Piccoli

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: ca. mammario; terapia neoadiuvante; taxanidi; antracicline; marcatori biologici

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Oncologia Chirurgica (F. Cafiero, P. Meszaros); S.S. Day Surgery (L. Moresco), S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini, F. Carli, S. Salvi)

Altri Enti coinvolti: ASL3 Liguria (L. Canobbio, L. Anselmi); ASL5 Liguria (F. Vaira); Ospedale S. Corona, Pietra Ligure, Savona (C. Naso); Clinica Malattie dell'Apparato Cardiovascolare, A.O.U. San Martino, Genova (A. Balestrero, L. Tixi)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica sperimentale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute; Compagnia di San Paolo

Background

Il trattamento chemioterapico neoadiuvante è un'opzione terapeutica per le pazienti con carcinoma (ca.) mammario localmente avanzato (T2-T4, N1-N2).

La biologia del tumore mammario è estremamente articolata; semplificando, allo stato attuale, sono riconosciute almeno quattro tipologie di carcinoma mammario, definite in base a marcatori prognostici e predittivi : ca. mammario con recettori ormonali ER e PgR positivi, ca. mammario con recettori ormonali ER e PgR negativi, ca. mammario in cui l'espressione dell'oncogene Her2/neu è associato sia a recettori ormonali positivi, sia negativi e ca. mammario definito "Triple negative" (ER, PgR ed Her2/neu negativi).

Il nostro studio si rivolge a quel gruppo di pazienti con carcinoma mammario localmente avanzato, sia esso con recettore ormonali positivi, sia negativi.

E' infatti noto che le pazienti con ca. mammario localmente avanzato e recettori ormonali positivi, sottoposte a trattamento chemioterapico neoadiuvante, ottengono una remissione patologica completa (pCR) in una percentuale bassa (5%-18%). In contrapposizione, le pazienti con ca. mammario e recettori ormonali negativi sono tradizionalmente più sensibili alla chemioterapia e, dopo trattamento neoadiuvante, hanno una percentuale di pCR del 40-50%. Il raggiungimento della pCR è comunque un end point importante per entrambi i gruppi, perchè impatta significativamente sulla DFS (intervallo libero da malattia) e sull'OS (sopravvivenza) delle pazienti.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale: la realizzazione del progetto potrebbe portare all'identificazione di nuovi marcatori biologici in grado di selezionare un sottogruppo di pazienti che rispondono alle due classi di farmaci maggiormente utilizzate nel trattamento chemioterapico neoadiuvante: i Taxanidi e le Antracicline.

I risultati ottenuti, in termini di espressione e modulazione dei vari marcatori analizzati, consentirà di valutare e quindi selezionare:

- le pazienti in cui il ca. mammario risulti chemio-sensibile, suggerendo che questo gruppo di soggetti potrebbe essere sottoposto, come prima scelta terapeutica, alla chemioterapia;
- le pazienti con tumore chemio-resistent, da sottoporre, come prima scelta terapeutica, all'intervento chirurgico, evitando la tossicità collaterale alla chemioterapia e la possibile comparsa di nuovi cloni cellulari tumorali, in corso di trattamento non efficace.

Obiettivo primario:

- correlare i livelli di espressione di ciascun marcatore, sia singolarmente, sia in associazione, con la Risposta patologica Completa (pCR, e anche con una risposta parziale).

Obiettivi secondari:

correlare i livelli di espressione di ciascun marcatore, sia singolarmente, sia in associazione con i seguenti parametri clinici e patologici :

- risposta clinica sul tumore primario (downsizing) valutata dopo 3 e 6 cicli di trattamento
- breast conservative surgery (mastectomia vs quadrantectomia/tumorectomia)
- residual tumor burden (indice che comprende la valutazione patologica del tumore primario, dimensioni e cellularità) e le metastasi linfonodali (numero e dimensioni)

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

- DFS (intervallo libero da malattia)
- OS (sopravvivenza).

Impatto assistenziale certo o potenziale

L'identificazione di potenziali marcatori, che permettano di discriminare tra tumori chemio-sensibili o chemio-resistenti, fornirebbe al clinico un ulteriore strumento per la scelta della strategia terapeutica più opportuna (chemioterapia neoadiuvante vs. intervento chirurgico immediato). Questo sarebbe particolarmente rilevante nel caso dei tumori mammari localmente avanzati, con recettori ormonali positivi, che sono noti rispondere meno alla chemioterapia neoadiuvante.

La razionalizzazione del trattamento terapeutico ottimale potrebbe, inoltre, ottimizzare i costi e l'utilizzo delle risorse.

L'identificazione di nuovi marcatori biologici potrebbe, per di più, avere un'applicabilità generale, poiché questi marcatori potrebbero essere valutati su una casistica allargata di pazienti, trasferendo le nuove metodiche ad altri laboratori, servizi di anatomia patologica, oncologie mediche/chirurgiche della regione. Inoltre, questi marcatori, una volta validati opportunamente, potrebbero essere impiegati anche per l'ottimizzazione delle terapie adiuvanti.

Pazienti, Sistema Sanitario Nazionale e la Comunità Scientifica potrebbero esserne i potenziali beneficiari.

Risultati e prodotti 2009

Nel corso del 2009 è stato condotto uno studio di fattibilità per valutare le condizioni sperimentali ottimali, utilizzando un pannello di linee cellulari di tumore della mammella ed alcuni campioni di materiale tumorale congelato, già disponibili. Sono state inizialmente messe a punto le migliori condizioni di conservazione e di estrazione di RNA, utilizzando vari kit commerciali, sia in termini qualitativi (RIN), sia quantitativi (spett Nanodrop).

L'espressione dei trascritti di interesse è stata analizzata in Real Time PCR semiquantitativa (SyberGreen). Per ciascun gene target sono state selezionate le migliori coppie di primers e del relativo amplicone, in termini di concentrazione, curve di melting, strutture secondarie e di specificità (verificata mediante sequenziamento) e sono state successivamente eseguite delle curve standard (slope compresa tra -3.25 e -3-4, $R^2=0.98-0.99$).

I livelli di espressione di ciascun gene di interesse saranno normalizzati verso quelli di geni endogeni di riferimento (geni housekeeping). Per identificare il miglior housekeeping l'espressione di sette possibili geni candidati è stata analizzata su 5 linee cellulari e 7 campioni tumorali con diverse caratteristiche anatomo-patologiche; i risultati di questo screening ci hanno permesso di individuare 3 possibili geni housekeeping, definiti come geni la cui espressione non è influenzata da condizioni sperimentali e risulta il più possibile stabile tra i vari campioni.

Pubblicazioni

Miglietta L. - Vanella P. - Canobbio L. - Parodi MA - Guglielmini P. - Boccardo F.

Clinical and pathological response to primary chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer grouped according to hormonal receptors, her2 status, grading and ki-67 proliferation index.

Anticancer Res. 29:1621/1625, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Relativamente allo studio prospettico, nel corso del 2010 è previsto l'arruolamento di circa 25-30 pazienti e dei relativi Tru-Cut prelevati immediatamente prima l'inizio del trattamento chemioterapico sequenziale, con Taxanidi ed Antracicline. Per la maggior parte delle pazienti arruolate si prevede, inoltre, che nell'arco del 2010, sarà disponibile materiale tumorale prelevato al momento dell'intervento chirurgico (tempo 1).

I livelli di espressione dei geni di interesse saranno valutati su circa il 90% del materiale raccolto e risultato idoneo all'analisi istologica, secondo i criteri precedentemente stabiliti.