

# Programmazione 2009-2011

## 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 proliferano 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

## Programmazione 2009-2011

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.

### *Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi*

I campioni di pazienti SMZL saranno raccolti con diverse modalità. Le cellule neoplastiche verranno purificate da sangue periferico o da midollo o da biopsie di pazienti con sospetto linfoma splenico dopo consenso informato. Molti campioni saranno ottenuti primariamente attraverso un trial clinico organizzato dal GISL (Gruppo Italiano Studio Linfomi). Una minor parte invece provengono da campioni già congelati presso la banca di tessuti presente presso il nostro Istituto e in parte dalla normale attività diagnostica di routine. Lo scopo è quello di divenire un centro specializzato all'individuazione di marker prognostici e diagnostici per la caratterizzazione del SMZL e dei suoi sottotipi. Le procedure analitiche dello studio prevedono una caratterizzazione del fenotipo 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.

Accanto alla caratterizzazione del SMZL, si procederà all'analisi del repertorio delle cellule B normali isolate da milza e tonsilla. Tale caratterizzazione si avvarrà dell'utilizzo di numerosi marcatori cellulari (anticorpi monoclonali), inclusi le molecole del FCR-like, che permetteranno di identificare diversi subsets delle cellule della zona marginale. Queste cellule saranno poi analizzate per creare un database che includa il repertorio IGH V-D-J di queste cellule che potrà così essere confrontato con il repertorio IGH V-D- J espresso dal SMZL.

Il confronto cellulare e molecolare è mirato all'identificazione della controparte normale cellulare del linfoma splenico. Questo è anche il primo obiettivo che verrà investigato nell'ambito del progetto nel corso del primo anno, in quanto il nostro gruppo di ricerca possiede un database di sequenze di cellule B normali. Questo database verrà integrato mediante sequenziamento di alcuni subset di cellule B della zona marginale e confrontato con il repertorio del SMZL. Va altresì detto che il confronto è possibile grazie alla collaborazione con il Dr. Stamatopulos (Thessaloniki-Grecia) che, nell'ambito di un progetto europeo, ha un ampio database di sequenze di linfoma di SMZL.

L'identificazione della parte normale permetterà di analizzare infine i profili genetici del linfoma splenico rispetto alla controparte normale per una individuazione di nuovi marcatori prognostici e diagnostici.

### *Track record*

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

B lymphocytes in humans express ZAP-70 when activated in vivo.

Eur. J. Immunol. 36(3):558/569, 2006

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

Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates pro-apoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells.

Blood 107(9):3708/3715, 2006

Paulli M.-Artusi T.-Baroni CD.-Carbone A.-Coggi G.-Di Lollo S.-Facchetti F.-Falini B.-Franco V.-Gambacorta M.-La Rocca VM.-Leoncini L.-Magrini U.-Maiorana A.-Menestrina F.-Novero D.-Palestro G.-Pescarmona E.-Santucci M.-Stracca Pansa V.-Truini M.-Pileri S.

The Haemolymphopathology Italian Group (H.I.G.): an essential resource for the new technical and organization problems troubling modern haemolymphopathology diagnostics.

Pathologica. 98(1):37/40, 2006

Dono M.-Burgio VL.-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

## Programmazione 2009-2011

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(3):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(2):517/524, 2008

### **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); 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

## Programmazione 2009-2011

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
- 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.

### *Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi*

Si sono già avuti risultati incoraggianti dalla valutazione dell'efficacia di indurre l'apoptosi con PNAEmu in colture di cellule FL (RL: derivate da un paziente con FL e che mantengono la caratteristica traslocazione cromosomica t(14:18) e l'iperespressione di Bcl2).

Nel primo anno di ricerca, verrà prima di tutto effettuata la sintesi dei PNA (sintesi peptidica manuale in fase solida con monomeri e chimica tBoc) in quantità e di qualità che permetta studi pre farmacologici. I prodotti infatti verranno purificati con cromatografia a fase inversa:

- PNAEmuwT (GCAGGAAGCAGGTCACCG-NLS) (GenBank accession no.X00253. 1, bases136-157)
- PNAEmumut (GTAGGAAGTAGGTCATCG-NLS)
- PNAAbcl2 CTACGAGTGGGATGCG-NLS (GenBank accession no.M13995, bases227-242).

La purezza (non inferiore al 98%) verrà poi valutata con spettrometria di massa usando uno spettrometro di massa con trappola ionica equipaggiato con una sorgente electro spray di ioni.

Questo primo passo consentirà la valutazione del possibile effetto sinergico nell'induzione dell'apoptosi del PNAEmu con il Vepeside in cellule FL in coltura. In questa fase si valuteranno le combinazioni di varie concentrazioni nonché lunghezza dei tempi di esposizione cellulare, in modo da definire le condizioni che inducano l'effetto apoptotico massimo/ottimale. L'apoptosi verrà valutata in citometria di flusso dopo colorazione con PI e Annessina V.

Negli anni successivi seguiranno:

- trasfezione con il gene della luciferasi delle cellule FL-RL (RL-luc) in modo che la loro crescita e localizzazione possa essere monitorata quantitativamente in vivo in luminescenza con un IVIS, Xenogen 100 Imaging system
- messa a punto di un modello murino di FL con l'inoculo della quantità ottimale di cellule RL-luc
- studi dell'effetto di somministrazione cronica (a giorni alterni) di PNAEmu iniziando da una settimana dopo l'inoculo della dose ottimale di cellule RL
- simili studi saranno ripetuti somministrando PNAEmu in concomitanza con ciclofosfamide o con Rituximab
- i risultati quantitativi ottenuti in luminescenza con l'IVIS Imaging system verranno valutati per il loro valore statistico e paragonati ai risultati autoptici/necroscopici, istologici, immunoistochimici (Bcl2).

Al termine di questo complesso lavoro pensiamo di poter razionalmente disegnare una terapia innovativa e migliorativa per il linfoma follicolare ad alto grado di resistenza.

### *Track record*

Boffa L.C.-Cutrona G. -Cilli M.-Matis S.-Damonte G.-Mariani M.R.-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 Therapy 14:220/226, 2007

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

Lack of mutagenicity and clastogenicity of a PNA targeted to a regulatory sequence of the translocated c-myc oncogene in Burkitt's Lymphoma.

Mut. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 628:129/137, 2007

Cutrona G.-Boffa LC.-Mariani MR.-Matis S.-Damonte G.-Millo E.-Roncella S.-Ferrarini M.

The PNA targeted to a regulatory sequence of the translocated c-myc oncogene in Burkitt's Lymphoma lacks immunogenicity. Follow up characterization of PNAEmu-NLS.

Oligonucleotides 171:146/150, 2007

## Programmazione 2009-2011

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 Ther. Epub Apr 10, 2009

### 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 stadati, 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 del rischio 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 sovraespresse 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).

## Programmazione 2009-2011

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

### *Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi*

#### A - Identificazione di nuovi marcatori.

Questo progetto è in parte già iniziato in collaborazione con il Prof. Nino Neri dell'Università di Milano. In pratica, le cellule di una coorte selezionata di pazienti, arruolati nell'ambito di uno studio multicentrico GISL, sono state caratterizzate per i marcatori "classici" ZAP-70, CD38 e stato mutazionale dei geni delle Ig. Queste cellule vengono analizzate per GEP in maniera "supervised" in modo da rilevare alterazioni di espressione genica che correlano con l'espressione di marcatori sfavorevoli di prognosi. I dati ottenuti a livello di espressione genica (ad es. nei casi a cattiva prognosi si rileva una iperespressione di un determinato gene) verranno successivamente validati a livello proteico con citofluorimetria o Western Blotting in modo da poter utilizzare queste metodiche per la caratterizzazione prognostica ulteriore e più rifinita dei casi che giungeranno all'osservazione. Il valore prognostico di questi nuovi marcatori sarà ulteriormente validato in uno studio prospettico GISL per giungere alla formulazione di un algoritmo "prognostico" che determini con precisione le possibilità di progressione di malattia.

#### B - Rapporti fra espressione di marcatori di prognosi e alterazioni citogenetiche.

Nella LLC vi sono alterazioni citogenetiche, quali 13q-, 17p-, 11q-, trisomia 12, facilmente evidenziabili con FISH, le quali hanno un valore prognostico. Tuttavia, non si sa il peso di questi marcatori relativamente a quello dei marcatori cellulari e molecolari (vecchi e nuovi) descritti sopra. Pertanto, questi dati (raccolti nell'ambito della stessa coorte descritta sopra e studiata per GEP), vanno inclusi in un potenziale algoritmo prognostico. In aggiunta ci si propone, sempre in collaborazione con il Prof. Neri, di studiare nuove alterazioni citogenetiche utilizzando sia tecniche di SNIPS che di genome wide screening. Queste nuove alterazioni citogenetiche, eventualmente evidenziabili anche in FISH, possono essere incluse nell'algoritmo prognostico descritto sopra.

#### C - Studi clinici.

Nel primo anno di attività non si prevede di iniziare un nuovo studio clinico ma di terminare, invece, quello attualmente in corso e descritto sopra. Tuttavia, i dati degli studi descritti ai punti A e B serviranno per disegnare un nuovo trial clinico che dovrà tenere presente i dati di quello già in corso (che sarà presto terminato), dei nuovi algoritmi di determinazione del rischio di progressione e anche dei progressi in corso sui monoclonali utilizzabili in terapia.

### *Track record*

Boffa LC.-Cutrona G.-Cilli M.-Matis S.-Damonte G.-Mariani MR.-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(2):220/226, 2007

Boffa LC.-Menichini P.-Bolognesi C.-Cutrona G.-Roncella S.-Damonte GL.-Millo E.-Mariani MR.-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. 628(2):129/137, 2007

Cutrona G.-Boffa LC.-Mariani MR.-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(1):146/150, 2007

Dono M.-Burgio VL.-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(8):2138/2147, 2007

Sabattini E.-Orduz R.-Campidelli C.-Zinzani PL.-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(6):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(3):413/422, 2008

# Programmazione 2009-2011

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(2):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 Deliliers G.-Morabito F.-Ferrarini M.-Neri A.  
Molecular and transcriptional characterization of 17p loss in B-cell chronic lymphocytic leukemia.  
Genes Chromosomes Cancer 47(9):781/793, 2008

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):887/888, 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):44/153, 2009

**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 Piccioli

*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. Truni, 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

## Programmazione 2009-2011

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)
- 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 adjuvanti.

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

*Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi*

Sulla base di evidenze sperimentali e cliniche preliminari sono stati identificati alcuni potenziali marcatori biologici da analizzare. Tali marcatori appartengono genericamente a classi di geni, e relativi prodotti proteici, del ciclo cellulare (es. p27Kip, Skp2), del network di regolazione ed assemblaggio dei microtubuli (es. MAP, Tubuline), o dei processi di regolazione e controllo della trascrizione del DNA (es. Topoisomerasi 2A).

I marcatori biologici saranno valutati a partire da materiale bioptico (Tru-cut) prelevato da pazienti con tumore mammario localmente avanzato.

E' previsto l'arruolamento di almeno 80-100 pazienti, nell'arco dei tre anni, che saranno sottoposte a regime chemioterapico sequenziale (6 cicli totali) con Taxanidi (Docetaxel, 100mg/mq, q21 x 3 cicli o Paclitaxel, 80mg/mq x 9 settimane) ed Antracicline (Doxorubicina-CTX, 75mg/mq, q 21 x3 cicli o Epirubicina-CTX, 100mg/mq, q 21 x 3 cicli).

I criteri previsti per l'inclusione nello studio sono:

- adenocarcinoma infiltrante della mammella localmente avanzato
- stadio T2-T3-T4
- stato linfonodale: N1, N2
- stato recettoriale : ER+, PgR+, ER-, PgR-
- essendo criteri di esclusione:
- carcinoma della mammella ad istologia lobulare (controindicazioni terapeutiche al trattamento neoadiuvante)
- positività ad Her2/neu (definito in base a parametri immunostochimici; positività  $\geq 3$  o Fish positiva).

Il progetto sarà così articolato:

- Studio prospettico. L'analisi dei marcatori sarà effettuata su Tru-Cut prelevati al tempo 0 (prima del trattamento chemioterapico) e sul pezzo operatorio, al momento dell'intervento chirurgico (tempo 1).

L'espressione dei marcatori sarà valutata sia come espressione genica, sia come prodotto proteico. RNA, estratto secondo protocolli standard e retrotrascritto (cDNA), sarà analizzato in Real Time PCR semiquantitativa ed i livelli di ciascun trascritto saranno normalizzati verso quelli di geni costitutivamente espressi (housekeeping). L'espressione di ciascun trascritto sarà quantificata rispetto ad un calibratore di riferimento ed espressa come Delta-Delta Ct. I marcatori biologici selezionati saranno inoltre valutati con metodiche di immunostochimica, indipendentemente dai livelli di espressione dell'RNA messaggero.

Tali marcatori comprendono molecole collegate al ciclo cellulare, Cicline, Gata 3, P16, ed altri ancora che sono in corso di validazione.

Saranno scartati, a priori, quei Tru-cut che, ad una analisi istologica, non sono sufficienti per stabilire la presenza di una infiltrazione carcinomatosa certa, sia per insufficienza di elementi epiteliali diagnostici, sia per la presenza di una necrosi diffusa.

## Programmazione 2009-2011

I livelli di espressione di ciascun marcatore, sia singolarmente, sia in associazione, saranno correlati con la Risposta patologica Completa (pCR), valutata come assenza di residuo tumorale, sia sul tumore primario, sia sui linfonodi ascellari.

La pCR sarà valutata sull'esame istologico definitivo (dopo l'intervento chirurgico); la Risposta patologica sarà definita seguendo parametri standard (per es. parametri WHO) .

La risposta clinica del tumore primario (downsizing) sarà determinata mediante il confronto dei risultati ottenuti con indagini strumentali (Mammografia, Ecografia mammaria e RMN mammaria) eseguite al tempo 0 (diagnosi), in corso di terapia (dopo 3 cicli di trattamento) ed al termine della terapia (dopo 6 cicli di trattamento).

- Studio retrospettivo. Sarà condotto su materiale paraffinato, per validare i risultati precedenti, ma soprattutto, per correlare l'espressione di questi nuovi marcatori biologici con dati clinici e patologici registrati in un'ampia casistica retrospettiva.

In collaborazione con la S.S. Genomica Funzionale (Dott. U. Pfeffer, Dott.ssa G. Angelini), prevediamo inoltre di ampliare l'analisi dei marcatori, inserendo lo studio dei profili di espressione, tramite piattaforme di microarray.

Risultati attesi nel 2009

Messa a punto delle condizioni sperimentali ottimali; a questo scopo, sarà condotto uno studio di fattibilità su linee cellulari (prevalentemente di ca. mammario) che ci consentirà di valutare la quantità di RNA/cDNA da utilizzare, primers/sonde, specificità del trascritto etc. Una volta identificate le condizioni sperimentali ottimali, queste saranno verificate su di un sampling di materiale tumorale congelato, che sarà altresì impiegato per determinare le migliori condizioni di estrazione di RNA, sia in termini di qualità, sia di resa complessiva.

E' inoltre previsto, l'inizio dello screening su materiale tumorale, eventualmente già disponibile.

*Track record*

Carbone A.-Botti G.-Gloghini A.-Simone G.-Truini M.-Curcio M.- Gasparini P.-Mangia A.-Perin T.-Salvi S.-Testi A.-Verderio P.

Delineation of HER2 gene status in breast carcinoma by silver in situ hybridization is reproducible among laboratories and pathologists.

J. Mol. Diagn. 10:527/536, 2008

Testore F.-Milanese S.-Ceste M.-de Conciliis E.-Parello G.-Lanfranco C.-Manfredi R.-Ferrero G.-Simoni C.-Miglietta L.-Ferro S.-Giaretto L.-Bosso G.

Cardioprotective effect of dexrazoxane in patients with breast cancer treated with anthracyclines in adjuvant setting: a 10-year single institution experience.

Am. J. Cardiovasc. Drugs 8:257/263, 2008

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