

## s.c. Terapia immunologica

### Identificazione di nuovi marcatori di staminalità e progressione nel melanoma uveale e nei tumori polmonari

*Linea di ricerca:* : 2 - Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* a - Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

*Responsabile scientifico:* Rosaria Gangemi

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Silvano Ferrini, Gaia Barisione, Marina Fabbi, Antonella Brizzolara, Anna Maria Orengo, Maurizio Viale

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* cellule staminali tumorali; trasduzione del segnale; citochine; xenotrapianti; biomarcatori

*Altre strutture IST partecipanti:* s.c. Anatomia e citoistologia patologica (S. Salvi); s.c. Oncologia medica A (P. Queirolo); s.c. Patologia molecolare integrata (U. Pfeffer); s.s. Animal facility (M. Cilli)

*Altri Enti coinvolti:* Oncologia Oculare, Ospedali Galliera, Genova (C. Mosci)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Compagnia di San Paolo

#### *Background*

L'esistenza di cellule staminali tumorali (CSC) inizialmente dimostrata (Dick 1994) nella leucemia mieloide acuta, è stata confermata in diversi tipi di tumori solidi fra cui carcinomi mammari e polmonari, e tumori cerebrali. Sfruttando l'espressione di marcatori di superficie, come CD24, CD34, CD38, CD44 e CD133, sottopopolazioni con caratteristiche staminali sono state isolate da numerosi tumori solidi. La staminalità e la tumorigenicità della sottopopolazione identificata sono state dimostrate iniettando le cellule isolate in topi immunodeficienti (NOD-SCID). Sebbene dati recenti sul melanoma cutaneo mettano in discussione l'esiguità del numero delle CSC, in molti casi un numero molto piccolo di cellule selezionate per marcatori di staminalità è sufficiente per ottenere nel topo immunodeficiente un tumore che riproduce l'eterogeneità di quello umano (fenocopia). La componente staminale di molti tumori è responsabile della resistenza alla chemio/ radioterapia, delle metastasi e delle recidive tumorali. Per eradicare il tumore sembra indispensabile colpire le cellule staminali tumorali. Oltre alle caratteristiche intrinseche delle CSC sembra essere molto rilevante la loro responsività al microambiente (nicchia tumorale) costituita da fibroblasti, endotelio e macrofagi e matrice, nei processi di metastatizzazione ed immunoevasione.

#### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

Obiettivi generali del progetto sono la caratterizzazione delle cellule staminali tumorali del melanoma uveale, del carcinoma polmonare e l'individuazione di molecole specifiche coinvolte nelle metastasi e nell'immunoevasione.

Questi tumori sono stati scelti perchè tali patologie fanno riferimento al nostro Istituto in numeri discreti e per l'accessibilità ai dati di gene expression profile grazie alla collaborazione con l'unità di Patologia molecolare integrata (Dr U. Pfeffer). Inoltre, poiché altre unità del laboratorio (Dr.ssa M. Fabbi) sono impegnate in studi sul molecole coinvolte nella progressione dei carcinomi ovarici, valuteremo se i markers di staminalità o di progressione/immunoevasione identificati negli altri modelli tumorali siano rilevanti anche per questo tipo di patologia.

Geni/molecole candidati saranno infatti inizialmente identificati mediante analisi di microarray di tumori di pazienti a diverso stadio di malattia tramite l'unità di Patologia molecolare integrata. Verrà quindi valutato il possibile ruolo di alcune molecole come biomarcatori e target terapeutici attraverso lo sviluppo di modelli animali della malattia umana.

Intendiamo identificare e isolare sottopopolazioni staminali da colture primarie di melanomi uveali e tumori polmonari NSCLC. Nostri risultati preliminari indicano la presenza di sottopopolazioni di cellule CD133+ e MDR1+ in alcune linee umane dei melanomi uveali ed in alcuni tumori polmonari NSCLC di tipo neuroendocrino. Le sottopopolazioni isolate sulla base di questi marcatori verranno trapiantate ortotopicamente nell'animale immunodeficiente per dimostrarne la tumorigenicità. La capacità di ricreare una fenocopia del tumore originario, di dare metastasi e di riprodurre tumori in modo seriale saranno elementi condizionanti nel definire la staminalità di una popolazione identificata da markers fenotipici. Per rispondere alla questione della possibile acquisizione di nuove proprietà delle cancer stem cells nelle metastasi o di un loro arricchimento numerico, studieremo mediante microarray CSC isolate da tumore primitivo e metastatico. Dimostrata la staminalità della sottopopolazione isolata paragoneremo il suo profilo d'espressione genica con quello della componente non tumorigenica. Studi di expression profiling potranno indicare il possibile ruolo di meccanismi intrinseci o di fattori estrinseci presenti nel microambiente correlati al fenotipo metastatico o all'immunoevasione. In particolare verranno considerate l'espressione di recettori per chemochine, potenzialmente coinvolte nel processo metastatico, e recettori per citochine quali IL-4, IL-13 ed IL-6 e verrà valutato il possibile ruolo di loop autocrini o paracrini, coinvolgenti i rispettivi ligandi. Il ruolo del microambiente tumorale nel determinare l'induzione o la selezione di un fenotipo metastatico verrà studiato attraverso lo studio delle cellule del microambiente

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

(fibroblasti e macrofagi associati al tumore), capaci di produrre citochine immunosoppressive e neoangiogeniche e ad esperimenti di trapianto simultaneo di CSC con fibroblasti tumorali.

Nel caso del melanoma oculare verranno considerate molecole candidate identificate mediante l'analisi del profilo di espressione genica (microarray), in quanto associate allo sviluppo di metastasi di pazienti con melanoma uveale. Dati preliminari di microarray indicano infatti un'espressione eterogenea del recettore CXCR4 e dell'oncogene c-met e dei trasduttori di segnale quali SDCP e SOX4 in una casistica di 14 melanomi oculari. Intendiamo studiare se le CSC dei diversi tumori sono caratterizzate dall'attivazione prevalente di una via di trasduzione del segnale (AKT, KB, Notch, WNT). I dati dei microarray saranno confermati in vitro con tecniche di biologia molecolare e biochimica sulle linee in coltura continua, sulle colture primarie, sulle biopsie dei pazienti e, in vivo attraverso esperimenti di iperespressione genica o gene silencing. Ci proponiamo infatti di sviluppare un modello murino dei tumori umani mediante trapianti ortotopici ed eterotopici delle CSC in diversi ceppi di topi immunodeficienti. La produzione di un modello murino è di grande importanza sia per validare in vivo i risultati sperimentali che per lo sviluppo di nuovi protocolli terapeutici. A questo scopo utilizzeremo xenotrapianti ortotopici ed eterotopici in topi NOD-SCID e NOD-SCID IL2RG-/- . Il vantaggio dell'utilizzo di quest'ultimo ceppo, privo di catena gamma del recettore dell'IL-2, è la mancanza di cellule NK, potenzialmente coinvolte nel controllo delle metastasi. Questi modelli saranno utilizzati per una dimostrazione formale del ruolo di molecole candidate per la formazione di metastasi, mediante esperimenti di silencing con siRNA specifici o di lentivirus. Infine il siero degli animali potrà rappresentare anche un'utile sorgente per lo studio di possibili biomarker mediante tecniche immunologiche e di proteomica. Come obiettivi secondari ci proponiamo di determinare l'eventuale correlazione tra il numero di CSC e la prognosi del paziente e la possibilità di isolare CSC dal sangue circolante per definirne le caratteristiche rispetto a quelle dei tumori primitivi e la relazione con la prognosi. Inoltre verrà considerata la possibilità che molecole iperesprese dal tumore nel corso della progressione possano essere rilasciate dal tumore e rappresentare quindi biomarcatori del tumore. A tal fine inizialmente studieremo le proteine presenti nel secretoma di colture primarie o di linee o di melanomi uveali e NSCLC. Questo aspetto può essere particolarmente importante per il melanoma uveale, in quanto il marcatore S-100, utilizzato per i melanomi cutanei, non è un marcatore predittivo di metastasi.

### *Impatto assistenziale certo o potenziale:*

- Identificazione di marcatori di sottopopolazione di cellule staminali tumorali.
- Identificazione di potenziali bersagli terapeutici e loro validazione in modelli in vitro ed nel piccolo animale.
- Identificazione e validazione preliminare di potenziali biomarcatori.

Tali risultati saranno raggiungibili a medio o a lungo termine, trattandosi di studi pre-clinici che prevedono l'utilizzo di modelli animali.

### *Risultati e prodotti 2010*

Nel corso di quest'anno abbiamo proseguito lo studio del ruolo della Syntenin-1 nel melanoma uveale. Syntenin-1 è stata trovata espressa ad alti livelli in tutte le linee di melanoma uveale analizzate sia come mRNA che proteina. La sua espressione è stata inoltre studiata, mediante immunistochemica, sulle biopsie dei 31 melanomi uveali primitivi di cui abbiamo analizzato il profilo di espressione genica. Alti livelli di espressione proteica di syntenin-1 sono risultati correlati in maniera statisticamente significativa con la progressione metastatica. L'analisi di due indipendenti e distinti dataset di microarrays ha confermato anche a livello di RNA una correlazione statisticamente significativa dell'espressione di syntenin-1 con la prognosi. Abbiamo inoltre potuto confermare per immunistochemica l'elevato livello di espressione di syntenin-1 in metastasi epatiche. Per studiare il ruolo di syntenin-1 nel processo metastatico abbiamo silenziato il gene di syntenin-1 mediante l'uso di siRNA specifici, in due linee di melanoma uveale primitivo, Mel270 e 92.1. L'inattivazione del gene syntenin-1 ha determinato una riduzione della capacità migratoria delle cellule in vitro. Questi risultati suggeriscono un ruolo biologico di syntenin-1 nel processo di metastatizzazione. Esperimenti preliminari di xenotrapianto sono stati effettuati in topi immunodepressi per valutare la capacità tumorigenica delle linee di melanoma uveale. I trapianti sono stati effettuati nella camera posteriore dell'occhio (ortotopico), e nella milza o nel ventricolo sinistro del cuore (eterotopico), rispettando le normative che regolano l'uso degli animali da esperimento. Le linee trapiantate hanno dato tutte origine a tumori, tuttavia solo nei trapianti eterotopici hanno indotto metastasi epatiche. Abbiamo inoltre studiato ulteriormente il fenotipo delle linee di melanoma uveale individuando sottopopolazioni con elevata espressione di ABCB5, trasportatore di membrana presente nelle CSC di melanoma cutaneo, che potrebbe svolgere un ruolo centrale nella resistenza ai chemioterapici e come marker di staminalità.

In relazione allo studio di cellule staminali tumorali derivate da biopsie di NSCLC, abbiamo ulteriormente ampliato il pannello delle colture primarie e studiato il fenotipo. Una piccola percentuale delle linee in coltura in condizioni di staminalità si è dimostrata tumorigenica qualora le cellule vengano trapiantate ortotopicamente in topi NOD-SCID IL2RG-/- . Inoltre stiamo ultimando la raccolta dei terreni condizionati di cellule di NSCLC in condizioni di staminalità, al fine di caratterizzare la loro capacità di rilasciare citochine immunosoppressive, angiogeniche o supportive di una nicchia in cui le cellule staminali si annidano.

### *Pubblicazioni*

Gangemi R.-Barisione G.-Brizzolara A.-Mirisola V.-Lanza F.-Mosci C.-Salvi S.-Truini M.-Boccardo S.-Cilli M.-Airoldi I.-Queirolo P.-Jager M.J.-Daga A.-Pfeffer U.-Ferrini S.

Syntenin-1 is expressed in uveal melanoma and correlates with metastatic progression.

Submitted

Alama A.-Orengo A.M.-Ferrini S.-Gangemi R.

Targeting cancer-initiating cells drug-resistance: a roadmap to a new-generation of cancer therapies?

Submitted

# Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

## *Presentazioni a congressi*

Gangemi R.-Pfeffer U.

Role of the adapter protein syntenin-1 in metastatic progression of uveal melanoma.  
Presentazione orale all'ophthalmic Oncology Group (OOG), Liverpool, 20 marzo 2010

Gangemi R.-Barisione G.-Brizzolara A.-Mirisola V.-Lanza F.-Mosci C.-Salvi S.-Truini M.-Boccardo S.-Cilli M.-Airoldi I.-Queirolo P.-Jager M.J.-Daga A.-Pfeffer U.-Ferrini S.

Syntenin-1 expression correlates with metastatic progression in uveal melanoma  
Abstract al 52 Annual meeting of the Italian Cancer Society (SIC), Roma, 4-7 ottobre 2010

Gangemi R.-Barisione G.- Mirisola V.- Brizzolara A.-Lanza F.-Mosci C.-Salvi S.-Gulaco M.-Truini M.-Angelini G.-Boccardo S.-Cilli M.-Airoldi I.-Queirolo P.-Jager M.J.-Daga A.-Pfeffer U.-Ferrini S.

Syntenin-1 is expressed in uveal melanoma and correlates with metastatic progression.  
Abstract al XVI Convegno Nazionale IMI, Forlì, 25 ottobre 2010

## *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Intendiamo studiare l'espressione di syntenin-1 nel tumore primitivo e nelle metastasi in modelli di xenotrapianto ottenuti mediante l'inoculo di linee di melanoma uveale nella milza di topi NOD-SCID IL2RG<sup>-/-</sup>. Questo modello murino di melanoma uveale ci consentirà inoltre di valutare gli effetti dell'inattivazione del gene syntenin-1 sulla progressione metastatica in vivo. A questo scopo verranno trapiantate, nei topi NOD-SCID IL2RG<sup>-/-</sup>, cellule di melanoma uveale nelle quali il gene syntenin-1 sia stato stabilmente silenziato o cellule di controllo. Lo sviluppo del tumore e delle metastasi verrà identificato mediante IVIS. Se, come prevediamo, l'espressione di syntenin-1 risultasse determinante per la formazione di metastasi prenderemo in considerazione la possibilità di sintetizzare e usare piccole molecole inibitorie di syntenin-1 a scopo terapeutico.

Syntenin-1 è espressa ad alti livelli nel nucleo cellulare in alcune linee di melanoma uveale e in biopsie di melanoma uveale ottenute da pazienti. Ipotizziamo perciò che syntenin-1 possa influenzare la trascrizione genica o agire come fattore trascrizionale. Geni differenzialmente espressi in cellule di melanoma uveale syntenin-1/KO e su cellule di controllo verranno perciò identificati mediante gene expression profiling. L'espressione differenziale di questi geni verrà confermata mediante RT-PCR e immunofluorescenza o immunistochemical. Verrà quindi studiata la correlazione tra questi geni e la capacità invasivo/metastatica.

Gli effetti dell'inattivazione di syntenin-1 sull'attivazione (fosforilazione) di molecole di trasduzione del segnale e su molecole regolatrici dell'adesione come ERK, AKT e Focal adhesion Kinases, verranno valutati anche con approcci sperimentali di tipo biochimico (Western blot e immunoprecipitazione). Questi studi, oltre a contribuire all'identificazione dei meccanismi delle metastasi, ci consentiranno di identificare potenziali nuovi target terapeutici.

Poiché syntenin-1 è espressa nel surnatante delle linee di melanoma uveale, intendiamo valutare la presenza di syntenin-1 nel siero o nelle urine dei pazienti con melanoma uveale non metastatico e metastatico mediante test ELISA. Verranno valutate eventuali correlazioni tra i livelli di syntenin-1 nei liquidi biologici e lo stato metastatico dei pazienti affetti da melanoma uveale. I risultati di questo studio potrebbero consentire l'utilizzazione di syntenin-1 come marcatore diagnostico attraverso un semplice test ELISA.

Lo studio di gene expression profiling effettuato su 31 pazienti con melanoma uveale, ha evidenziato elevati livelli di espressione di ABCB5, un trasportatore di membrana legato alla farmaco-resistenza e alla staminalità. ABCB5 identifica nel melanoma cutaneo una sottopopolazione staminale tumorale. Intendiamo perciò verificare l'espressione di ABCB5 nelle linee di melanoma uveale e nelle biopsie di pazienti. Nel caso in cui ABCB5 fosse espressa su cellule di melanoma uveale, procederemo all'isolamento della sottopopolazione positiva e ne studieremo le caratteristiche di invasività, tumorigenicità e chemioresistenza.

Poiché non sono attualmente disponibili in commercio anticorpi sufficientemente idonei per studi fenotipici e biochimici di ABCB5, intendiamo produrre anticorpi monoclonali contro questa molecola nel nostro laboratorio. Per l'immunizzazione di topi balb/c, verranno selezionati peptidi potenzialmente immunogenici corrispondenti a domini di membrana della molecola ABCB5.

Questo studio ci consentirà di identificare nuovi marcatori e potenziali target terapeutici del melanoma uveale.

Lo studio delle cellule staminali di NSCLC prevede l'identificazione di molecole secrete (citochine/chemochine) specificamente da colture primarie in condizioni di staminalità rispetto alle colture standard. Queste molecole svolgono un ruolo importante nel mantenimento del self-renewal delle CSC nel microambiente tumorale e nell'attività soppressoria del sistema immunitario.

Questo studio verrà effettuato mediante test ELISA effettuati su supernatanti delle colture primarie e su linee derivate da diversi istotipi di NSCLC. Gli effetti di queste molecole, eventualmente identificate, sulla sopravvivenza, proliferazione e migrazione delle CSC, verranno dimostrati mediante test in vitro e nel modello ortotopico di xenotrapianto murino.

## **Mecanismi molecolari di regolazione dell'adesione cellulare in corso di neoplasia e risposta immunitaria**

*Linea di ricerca:* 2 – Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* a – Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

*Responsabile scientifico:* Marina Fabbi

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Silvano Ferrini, Anna Maria Orengo, Rosaria Gangemi

# Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* adesione cellulare; proteolisi; crescita invasiva; attivazione cellulare; trasduzione del segnale; biomarcatori

*Altre strutture IST partecipanti:* s.c. Oncologia ginecologica; s.s. Animal facility

*Altri Enti coinvolti:* Istituto Nazionale Tumori, Milano (S. Canevari, I. Bongarzone); Università degli Studi di Pisa (A. Rossello); Istituto G. Gaslini, Genova (C. Gambini, M.V. Corrias); Università di Heidelberg, Germania (A. Bierhaus)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; Ministero della Salute; Compagnia di San Paolo

## *Background*

Nella biologia del tumore il controllo dinamico delle molecole di adesione è importante in tutte le fasi del processo di metastatizzazione, dal distacco dal tumore primario all'invasione di altri distretti. Questi processi sono sostenuti da interazioni multiple e interconnesse, la cui conoscenza passa attraverso la definizione del contributo di ciascuna molecola di adesione coinvolta. In uno studio precedente abbiamo identificato, mediante lo screening di anticorpi prodotti in librerie fagiche (scFv), la molecola di adesione intercellulare ALCAM/CD166 sulla superficie di carcinomi ovarici e ne abbiamo definito alcune proprietà, quali internalizzazione e ricircolo (Piazza et al.). Abbiamo inoltre dimostrato che ALCAM è rilasciato in forma solubile da cellule di carcinoma ovarico, che il processo di rilascio è stimolato da recettori tirosina-chinasi come EGFR ed è mediato dall'attività proteolitica di metalloproteasi, soprattutto di ADAM17/TACE. Esperimenti di inibizione della metalloproteasi o di blocco delle funzioni adesive di ALCAM hanno evidenziato che la de-localizzazione di ALCAM dalla membrana è un momento importante nell'invasività di cellule di carcinoma ovarico in vitro (Rosso et al.). Questo dato è corroborato dall'osservazione che la perdita dell'espressione di membrana di ALCAM correla con una peggiore prognosi nei carcinomi ovarici (Mezzanzanica et al.). Secondo studi di altri autori, ALCAM può funzionare come un sensore di densità cellulare capace di regolare l'attività proteolitica che avvia la mobilitazione cellulare, e la sua espressione è correlata alla progressione di diverse patologie oncologiche (melanoma, carcinoma della mammella, della prostata e del colon). L'insieme di questi dati suggerisce che la regolazione dinamica di ALCAM sulla superficie cellulare sia direttamente coinvolta nei processi di metastatizzazione.

## *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

L'obiettivo generale del progetto è la caratterizzazione del ruolo di ALCAM e di ADAM17/TACE nella progressione tumorale e disseminazione metastatica, particolarmente in carcinoma ovarico, neuroblastoma e carcinoma della tiroide. Questo obiettivo viene perseguito attraverso i seguenti obiettivi secondari:

- Studio in vitro del controllo dinamico di ALCAM sulla superficie cellulare, in particolare del rilascio ('shedding') della molecola e del suo rapporto con la mobilitazione cellulare. Studio dei meccanismi di rilascio in relazione sia ai processi di attivazione cellulare, per esempio da parte di chinasi, che all'induzione di attività proteolitica, per esempio a carico di metalloproteasi. Studio della funzione pro- o anti-adesiva della molecola rilasciata e solubile, nell'ambito della biologia del tumore.
- Analisi dell'espressione di ALCAM in rapporto alla capacità di adesione e diffusione metastatica di cellule tumorali.
- Caratterizzazione dell'attività in vitro di una serie di inibitori di metalloproteasi di nuova sintesi, forniti dall'Università degli Studi di Pisa, e disegnati per incrementare la specificità dell'inibizione di ADAM17/TACE.
- Valutazione del valore prognostico dell'espressione di ALCAM in carcinoma ovarico e neuroblastoma, utilizzando ampie e ben caratterizzate casistiche a disposizione grazie alla collaborazione con l'INT di Milano e con l'Istituto G. Gaslini di Genova, rispettivamente.

Come obiettivo secondario nell'ambito dello studio del ruolo del microambiente nella disseminazione del carcinoma ovarico, proponiamo inoltre la valutazione del ruolo della citochina proinfiammatoria IL-18 come bio-marcatore e la caratterizzazione molecolare della forma prodotta (se pro-IL18, biologicamente inattiva, o IL-18 matura, biologicamente attiva).

*Impatto assistenziale certo o potenziale* L'impatto assistenziale è potenziale e consiste nella possibile identificazione di molecole utilizzabili come biomarcatori diagnostici, prognostici, predittivi del trattamento o come bersagli terapeutici.

## *Risultati e prodotti 2010*

L'obiettivo generale del progetto è la caratterizzazione del ruolo di ALCAM e di ADAM17/TACE nella progressione tumorale e disseminazione metastatica, particolarmente in carcinoma ovarico, neuroblastoma e carcinoma della tiroide. In questo contesto, il 2010 ha visto la definitiva pubblicazione dello studio di ALCAM come potenziale marcatore prognostico in pazienti con neuroblastoma (Corrias MV et al., Cell Oncol, 2010). Inoltre, lo studio di ALCAM e ADAM17/TACE nel carcinoma della tiroide, svolto in collaborazione con l'Istituto Nazionale Tumori di Milano, si è concretizzato nel manoscritto "Activated leukocyte cell adhesion molecule expression and shedding in thyroid tumors" di Miccichè F et al, attualmente sottomesso per la pubblicazione. In questo studio dimostriamo che nel cancro della tiroide ALCAM è iper-espresso e iper-glicosilato, ed è modulato dall'attività di ADAM17/TACE, che genera diverse isoforme solubili della molecola (sALCAM). Infine, lo studio di sALCAM come potenziale marcatore prognostico in pazienti con carcinoma ovarico è proseguito con la caratterizzazione biochimica delle isoforme circolanti, con l'analisi del loro rapporto con gli esosomi e con il dosaggio in siero e ascite di pazienti. I risultati parziali di questo studio sono

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

stati presentati al Congresso 2010 della International Society of Cellular Oncology (ISCO) (Fabbi M et al., Cell Oncol., 2010).

Come obiettivo secondario nell'ambito dello studio del ruolo del microambiente nella disseminazione del carcinoma ovarico, abbiamo investigato la citochina proinfiammatoria IL-18 come bio-marcatore prognostico. Abbiamo anche dimostrato che la forma prodotta e secreta dal tumore è il precursore "pro-IL18", biologicamente inattivo, che rappresenta quindi un potenziale fattore di "tumor escape" (Orengo AM et al., Int J Cancer, Epub 2010).

Un obiettivo chiave del progetto è costituito dalla caratterizzazione dell'attività in vitro di una serie di inibitori di metalloproteasi di nuova sintesi, forniti dall'Università degli Studi di Pisa, e disegnati per incrementare la specificità dell'inibizione di ADAM17/TACE, potenzialmente utilizzabili per inibire "loops" paracrini EGFR-dipendenti in vivo. La prima fase della produzione e caratterizzazione in vitro di questi nuovi prodotti è stata descritta in Nuti E et al. (J Med Chem, 2010). Abbiamo quindi proseguito in vivo la caratterizzazione farmacologica dell'inibitore che aveva dimostrato migliore attività e specificità in vitro. E' stata effettuata una valutazione preliminare della potenziale tossicità, nonché della capacità di inibire il rilascio di ALCAM anche in vivo, sia in animali sani che in portatori di xenotrapianto di carcinoma ovarico. I risultati preliminari sono stati incoraggianti per quanto riguarda la capacità di inibire l'attività di ADAM17, valutata attraverso il rilascio di ALCAM, ma hanno evidenziato una notevole criticità nella tossicità del veicolo necessario per la solubilizzazione dell'inibitore. E' quindi necessario migliorare la solubilità della molecola prima di continuare lo studio in vivo.

### *Pubblicazioni*

Corrias M.V.-Gambini C.-Gregorio A.-Croce M.-Barisione G.-Cossu C.- Rossello A.-Ferrini S.-Fabbi M.  
Different subcellular localization of ALCAM molecules in neuroblastoma: association with relapse.  
Cell. Oncol. 32:77/86, 2010

Nuti E.-Casalini F.-Avramova S.-Santamaria S.-Fabbi M.-Ferrini S.- Marinelli L.-La Pietra V.-Limongelli V.-Novellino E.-Cercignani G.- Orlandini E.-Nencetti S.-Rossello A.  
Potent arylsulfonamide inhibitors of tumor necrosis factor alpha converting enzyme able to reduce activated leukocyte cell adhesion molecule shedding in cancer cell models.  
J. Med. Chem. 53:2622/2635, 2010

Orengo A.M.-Fabbi M.-Miglietta L.-Andreani C.-Bruzzone M.-Puppo A.- Cristoforoni P.-Centurioni M.G.-Gualco M.-Salvi S.-Boccardo S.- Truini M.-Piazza T.-Canevari S.-Mezzanzanica D.-Ferrini S.  
Interleukin (IL)/18, a biomarker of human ovarian carcinoma, is predominantly released as biologically inactive precursor.  
Int. J. Cancer Epub Nov 8, 2010

### *Presentazioni a congressi*

Fabbi M.-Orengo A.M.-Mezzanzanica D.-Bongarzone I.-Brizzolara A.-Andreani C.-Emionite L.-Puppo A.-Centurioni M.G.-Bruzzone M.-Canevari S.-Ferrini S.  
Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule soluble form (sALCAM): a potential biomarker in epithelial ovarian cancer.  
Cell Oncol. 2010;32(3):196. Special Issue: Abstracts of the ISCO Congress 2010

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

I risultati attesi nel corso del 2011 riguardano principalmente due obiettivi del progetto. Il primo riguarda la caratterizzazione strutturale e funzionale della forma solubile di ALCAM in siero e ascite di pazienti affette da carcinoma ovarico, la valutazione della sua potenzialità come biomarcatore di malattia e lo studio delle sue interazioni molecolari. Le isoforme presenti nell'ascite e nel terreno di coltura di cellule di carcinoma ovarico verranno caratterizzate biochimicamente e verranno studiate la loro dipendenza dall'attività di ADAM17/TACE e la loro eventuale compartimentazione in vescicole esosomiali. Inoltre intendiamo valutare se i livelli di sALCAM nel liquido ascitico o nel siero possano correlare con lo stadio di malattia e con la sopravvivenza. Questi dati, oltre a validare sALCAM come biomarcatore, potrebbero essere utili per identificare sottogruppi di pazienti che potrebbero beneficiare di terapie mirate al blocco di ADAM17/TACE. Intendiamo anche verificare la capacità di ALCAM e di sALCAM di interagire con proteine della matrice e con danger factors, quali S100B e HMGB1, entrambi ligandi di RAGE, che potrebbe giocare un ruolo nei processi infiammatori importanti per la progressione tumorale. Valuteremo quindi i possibili effetti biologici di tale interazione su cellule tumorali e componenti del microambiente tumorale ovarico, con particolare riferimento ai macrofagi tumore-associati.

Studieremo anche il ruolo di ALCAM nella biologia delle "cancer stem cells" ovariche isolate da ascite ed espanse in vitro come "sferoidi" in terreni formulati per la crescita di cellule staminali. Inoltre verrà analizzato il secretoma di tali colture primarie mantenute in condizioni di staminalità, al fine di identificare nuovi biomarcatori.

Il secondo obiettivo riguarda la sintesi e caratterizzazione di nuovi inibitori di ADAM17/TACE, che parte dall'ipotesi che ADAM17/TACE contribuisca alla progressione dei tumori ovarici mediando il distacco intercellulare attraverso la proteolisi di ALCAM e l'attivazione di loop paracrini EGFR-dipendenti. Partendo dalle caratteristiche del set di inibitori già prodotti (Nuti E et al.), verranno sintetizzate nuove molecole con migliore solubilità ed eventualmente specificità, che verranno caratterizzate sulla base della loro attività di inibizione del rilascio di ALCAM solubile da parte di cellule ovariche in coltura e di blocco della motilità ed invasività cellulare, mediante test in vitro ("wound-healing", penetrazione in spugne di matrice).

# Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

## **Ruolo e meccanismi d'azione di citochine della famiglia dell'IL2 condizionanti la sopravvivenza di neoplasie linfatiche con andamento cronico**

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* a – Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

*Responsabile scientifico:* Silvano Ferrini

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Anna Maria Orengo, Marina Fabbi

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* leucemia linfatica cronica; linfomi follicolari; interleuchine; microambiente

*Altre strutture IST partecipanti:* s.s. Animal facility (M. Cilli); s.s. Diagnostica molecolare (S. Zupo, G. Cutrona)

*Altri Enti coinvolti:* Istituto G. Gaslini, Genova (I. Airoidi)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* Ministero della Salute; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

### *Background*

Molte evidenze indicano che il microambiente degli organi linfoidei secondari e del midollo osseo svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi di malattie linfoproliferative croniche delle cellule B, come la leucemia linfatica cronica (CLL) ed i linfomi follicolari (FL) o linfocitici (LL). Infatti cellule di questi tumori non proliferano e tendono ad andare incontro ad apoptosi spontanea se coltivati in vitro, poiché vengono a mancare stimoli del microambiente, quali la stimolazione antigenica, il CD40L e molteplici citochine, essenziali per la sopravvivenza e proliferazione delle cellule linfoidee B. In studi precedenti, la SC Terapia Immunologica ha dimostrato che due citochine della famiglia dell'interleuchina (IL)2: IL21 e IL15, svolgono funzioni opposte in cellule di CLL. Infatti, IL15 si comporta come un fattore di crescita, inducendo proliferazione e protezione dall'apoptosi spontanea, mentre IL21 induce apoptosi e si contrappone agli effetti mitogenici dell'IL15 (De Toter et al, Blood 2006).

Va ricordato che entrambe le citochine sono attivatrici della proliferazione e delle attività funzionali di cellule T ed NK. Dati gli effetti comuni di IL21 ed IL15 su cellule T ed NK il fatto che queste citochine possano indurre effetti opposti in cellule di CLL è difficilmente spiegabile. A tale riguardo, va ricordato che entrambe le citochine utilizzano la catena gamma comune del recettore dell'IL-2 (IL2RG) come componente dei loro complessi recettoriali e la tirosina chinasi JAK3, che è essenziale per la trasduzione del segnale tramite proteine STAT. Nel caso delle CLL gli effetti di IL21 e IL15, anche se di segno opposto, sono aumentati da una precedente stimolazione cellulare attraverso il recettore CD40. Questo stimolo determina una up-regolazione dell'espressione di IL21R e, in alcuni casi anche di IL15Ralpha e di IL2Rbeta, una componente del complesso recettoriale dell'IL-2 che è condivisa dall'IL15. Lo studio della trasduzione del segnale mediato da IL21 ed IL15 in cellule di CLL ha indicato che, come atteso, sia IL15 che IL21 attivano la fosforilazione di JAK3, tuttavia, IL21 induce prevalentemente la fosforilazione di STAT3, mentre IL15 attiva STAT5. Inoltre IL21, ma non IL15, attiva la via JAK1/STAT1, una via che è stata legata a fenomeni apoptotici in molti tipi cellulari. Di conseguenza la via JAK1/STAT1 potrebbe essere coinvolta nell'apoptosi indotta da IL21, mentre la via JAK3/STAT5 potrebbe essere importante per l'effetto mitogenico dell'IL15 in cellule di CLL. Infatti STAT5 è importante per lo sviluppo del sistema linfoide e per la proliferazione di cellule linfoidee. In effetti inibitori di JAK3 sono stati in grado di bloccare l'effetto mitogenico di IL15 in maniera dose-dipendente (De Toter et al, 2008).

La via MEK1/ERK1/2 è stata correlata a segnali mitogenici e anti-apoptotici in cellule di CLL in risposta a stimoli diversi. Poiché IL2Rbeta è in grado di reclutare l'adaptor protein Shc che, tramite la via Ras/Raf può attivare Mek1, abbiamo studiato l'effetto di IL21 ed IL15 su questa pathway in cellule di CLL. I nostri dati indicano che IL15, ma non IL21, induce fosforilazione di Shc e di ERK1/2. La via MEK1/ ERK1/2 sembra svolgere un ruolo molto importante nel segnale anti-apoptotico di IL15. Infatti, inibitori di MEK1 sono in grado di revertare l'effetto anti-apoptotico di IL15 e di aumentare l'apoptosi spontanea in cellule di CLL.

### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

L'obiettivo generale del progetto è lo studio dei mediatori intracellulari che regolano l'apoptosi o la sopravvivenza cellulare indotta da citochine della famiglia dell'IL-2 (IL21, IL15 ed IL4) in cellule di CLL o FL. Obiettivi intermedi saranno 1) La caratterizzazione dei recettori, vie di trasduzione del segnale e meccanismi di induzione di apoptosi in cellule di FL 2) Lo studio dei recettori per IL-4 espressi da cellule di FL e la caratterizzazione delle pathways di trasduzione del segnale anti-apoptotico 3) Lo studio della regolazione di geni e di miRNA da parte di IL15 ed IL21 in cellule di B-CLL mediante microarray ad alta densità. L'identificazione di geni differenzialmente regolati potrebbe fornire nuove indicazioni sulle vie che mediano l'apoptosi o la sopravvivenza in cellule di B-CLL 4) Studio di possibili inibitori di meccanismi molecolari di sopravvivenza/proliferazione a fini terapeutici in modelli in vitro ed in vivo.

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

L'impatto assistenziale è potenziale e consiste nella possibile identificazione di molecole utilizzabili come bersagli terapeutici nella B-CLL o nei FL che potrebbe tradursi in possibili applicazioni terapeutiche nel medio/lungo periodo.

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Tali inibitori potrebbero trovare un utilizzo al fine di limitare l'espansione di cellule di CLL o di sensibilizzarle a farmaci anti-tumorali pro-apoptotici.

### *Risultati e prodotti 2010*

Nel corso del 2010 è stato ultimato lo studio degli effetti della citochina IL21 su cellule di linfoma follicolare (FL), che è stato recentemente pubblicato (De Toter D et al, Exp Hematol, 2010). Cellule primarie isolate da FL esprimono elevati livelli di recettore per la IL21 (IL21R) e la coltura a breve termine di tali cellule in presenza di IL21 ne aumenta l'apoptosi. IL21R ha invece un'espressione ridotta su alcune linee continue di FL che, di conseguenza, mostrano una resistenza all'effetto pro-apoptotico di IL-21. Fa eccezione la linea SUDHL4 che esprime IL21R e viene indotta all'apoptosi da parte di IL21. Diversamente, la linea IL21R+ DOHH2 non è sensibile all'attività biologica di IL-21 a causa di un difetto della trasduzione del segnale, tramite le vie JAK-1/STAT-1 e JAK-3/STAT-3, in conseguenza dell'assente espressione della tirosina cinasi JAK3. IL21 potrebbe pertanto controllare la crescita di FL in fase iniziale. La resistenza all'attività pro-apoptotica di IL21 da parte di linee derivate da FL in fase di progressione suggerisce che i FL in fase avanzata sviluppino resistenza all'IL21. A conferma di questa ipotesi abbiamo trovato che cellule primarie di alcuni FL progrediti verso linfomi diffusi, mostrano una ridotta espressione di IL-21R e sono resistenti all'IL-21. Abbiamo anche iniziato a studiare gli effetti di IL-4, un'altra citochina della famiglia dell'IL2, che aumenta la sopravvivenza di cellule primarie di FL in vitro, svolgendo un ruolo opposto rispetto ad IL-21. Poiché IL-4 può agire attraverso due tipi di recettore stiamo attualmente studiando il recettore coinvolto e la sua via di trasduzione del segnale.

Abbiamo anche studiato le modificazioni del profilo di espressione genica in cellule di leucemia linfatica cronica (CLL) indotte da IL21 o da IL15, citochine che svolgono attività biologiche opposte su queste cellule, essendo la prima pro-apoptotica mentre la seconda induce proliferazione. Tra i geni differenzialmente regolati dalle due citochine abbiamo identificato quelli codificanti per le chemochine CCL3, CCL4, CCL3L, CCL17 e CCL22, che sono tutti down-regolati da IL21 ma non da IL15. Queste chemochine svolgono un ruolo nel cross-talk tra cellule di CLL e cellule supportive nel microambiente della nicchia in cui le CLL proliferano. Abbiamo quindi validato questi dati mediante RT-PCR quantitativa e mediante saggi a livello proteico (manoscritto in preparazione). Inoltre anche i geni delle citochine pro-infiammatorie TNF e linfotossina sono downregolati da IL21 mentre sono up-regolati da IL15, suggerendo che IL21 spenga un programma pro-infiammatorio importante per la sopravvivenza delle cellule leucemiche. Questi dati suggeriscono che IL21 possa alterare la generazione di una nicchia supportiva, che è causa di resistenza alla terapia e ricaduta nei casi progressivi di CLL. Inoltre abbiamo iniziato lo studio delle alterazioni indotte da IL21 ed IL15 sul profilo di espressione genica dei miRNA nelle cellule di CLL.

### *Pubblicazioni*

De Toter D.-Capaia M.-Fabbi M.-Croce M.-Meazza R.-Cutrona G.-Zupo S.-Loiacono F.-Tuini M.-Ferrari M.-Ferrini S.  
Heterogeneous expression and function of IL/21R and susceptibility to IL/21 mediated apoptosis in follicular lymphoma cells.  
Exp. Hematol. 38:373/383, 2010

### *Presentazioni a congressi*

De Toter D.-Capaia M.-Canevari S.-Orengo A.M.-De Cecco L.-Fabbi M.-Cutrona G.-Zupo S.-Ferrari M.-Ferrini S.  
Role of cytokines in lymphoid neoplasia cell survival.  
Cell Oncol. 32(3):1168, 2010. Special Issue: Abstracts of the ISCO Congress, Dresden, Germany, 2010

De Toter D.-Giannoni P.-Scaglione S. et al.  
Chronic Lymphocytic leukemia (CLL) B cells express the HGF receptor (C-MET) and are supported in their survival by HGF-producing mesenchymal stromal cells.  
Haematologica 95: 316, 2010. ESH meeting, 2010

De Toter D.-Capaia M.-Canevari S.-Orengo A.M.-De Cecco L.-Fabbi M.-Cutrona G.-Zupo S.-Ferrari M.-Ferrini S.  
IL-21 and IL-15 differentially regulate chemokine production and cell survival in CLL B cells.  
Minerva Medica, 2010. Proceedings of the SIICA congress, 2010

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Nel corso del 2011 intendiamo dapprima concludere gli studi sul linfoma follicolare (FL) e sulla leucemia linfatica cronica (CLL). In particolare per quanto attiene al possibile ruolo di IL21 nella storia naturale del FL intendiamo verificare se IL21 ed il suo recettore siano effettivamente espressi in tessuti di FL. A tale fine stiamo valutando diversi anticorpi specifici per queste molecole in analisi immunocitochimica. Inoltre, poiché IL21 induce fosforilazione di STAT-3 intendiamo verificare se questa effettivamente sia riscontrabile in vivo, così come l'espressione di geni up-regolati da questo trasduttore. A tal fine stiamo anche comparando l'effetto di IL21 e IL4 sull'espressione di geni codificanti e di miRNA in linee di FL. Infatti i miRNA svolgono importanti funzioni di controllo sulla proliferazione e sopravvivenza cellulare, in vari tumori, inclusi linfomi e CLL, tramite la loro capacità di regolare l'espressione proteica a livello post-trascrizionale.

Verranno anche proseguiti gli studi sugli effetti di IL21 ed IL15 sul profilo di espressione di geni codificanti e di miRNA delle cellule di CLL, al fine di meglio chiarire i meccanismi e le vie di trasduzione del segnale delle due citochine, anche mediante approcci di bioinformatica. Per quanto attiene questa possibilità intendiamo utilizzare opportuni algoritmi che consentono di raggruppare geni modulati in rapporto a pathways intracellulari e correlare miRNA modulati dalle citochine con profili di geni codificanti. Inoltre i risultati ottenuti tramite questi studi saranno oggetto di validazioni e conferma a livello di proteine espresse in differenti set di pazienti. Il ruolo funzionale di specifiche molecole proteiche o di miRNA verrà ulteriormente studiato con tecniche di trasfezione genica o di silenziamento. Nell'insieme i risultati di questi studi potranno fornire indicazioni sui meccanismi molecolari che regolano proliferazione e sopravvivenza di neoplasie linfatiche ed indicare nuovi potenziali target terapeutici.

# Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

**Studio dei meccanismi immunosoppressivi che limitano la risposta anti-tumorale indotta da vaccini cellulari in modelli preclinici e delle possibili strategie per ottenere una risposta immune efficace nei confronti del tumore**

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* b - Risposta immunitaria antitumorale: interazioni cellulari, fattori solubili e recettori

*Responsabile scientifico:* Anna Maria Orengo

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Silvano Ferrini

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* immunosoppressione; citochine; linfociti effettori

*Altre strutture IST partecipanti:* s.s. Animal facility (M. Cilli); s.c. Oncologia medica A (P. Queirolo); s.s. Banca biologica e cell factory (B. Parodi)

*Altri Enti coinvolti:* Università degli Studi di Bologna (P.L. Lollini); Istituto G. Gaslini, Genova (M.V. Corrias, V. Pistoia)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* Ministero della Salute; Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

## *Background*

Le cellule tumorali producono fattori solubili che possono impedire l'instaurarsi di una efficace risposta immune o indurre un fenotipo immunosoppressivo in cellule mieloidi e linfoidi o favorire il differenziamento di precursori a cellule mature a funzione soppressoria. La principale sottopopolazione di linfociti T a funzione regolatoria è rappresentato dalle Treg CD4+CD25+Foxp3+ che si sviluppano normalmente nel timo o possono essere indotte, da fattori di origine tumorale quali PGE2 e TGFbeta, a differenziare a partire da precursori CD4-CD25- circolanti. Queste cellule esprimono in superficie marcatori caratteristici quali GITR e CTLA-4 e producono IL-10 e TGFbeta, citochine a funzione immunosoppressoria. Inoltre anche i contatti cellula-cellula mediano segnali inibitori sulla risposta immune, mediante l'interazione tra TGFbeta e CTLA-4 espressi sulle membrana delle Treg con molecole espresse sulle cellule effettrici. E' stato descritto inoltre che svolgano una funzione immunosoppressiva sottopopolazioni di cellule TCD8+CD28-, Tr1, macrofagi tumore associati e cellule mieloidi soppressorie.

L'esistenza di queste diverse forme di immunosoppressione, che limita fortemente l'efficacia dei protocolli di immunoterapia, ha indotto a sperimentare l'associazione ai farmaci anti-tumorali di molecole in grado di rimuovere l'inibizione della risposta immune.

## *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

L'obiettivo generale del progetto consiste nel chiarire, grazie a studi preclinici in diversi modelli murini, i meccanismi immunosoppressivi che limitano la risposta anti-tumorale indotta da terapie cellulari e nello sperimentare strategie in grado di rimuoverli, permettendo così una risposta immune efficace nei confronti del tumore. Intendiamo inoltre produrre e utilizzare in modelli preclinici nuovi "vaccini" cellulari basati su cellule tumorali modificate con i geni di citochine immunostimolanti diverse da quelle fino ad oggi utilizzate e/o molecole costimolatorie. Alternativamente ci proponiamo lo studio di sistemi di veicolazione di DNA nudo codificante per antigeni tumorali e citochine. Tali sistemi di attivazione della risposta immunitaria verranno quindi associati a strategie in grado di superare l'immunosoppressione tumore-associata, quali, ad esempio, l'utilizzo di anticorpi inattivanti specifiche sottopopolazioni cellulari (anti-CD25, anti-CD4 o anti-OX40). Infine ci proponiamo di studiare le risposte indotte nell'animale dalle terapie, al fine di valutare l'eventuale ruolo protettivo svolto dalla risposta anticorpale tramite induzione di ADCC o CDC, e quello delle risposte cellulo-mediate, attraverso l'induzione di citochine secondarie o l'attivazione del programma citolitico.

Inoltre, nel momento in cui sarà attivato un trial clinico di vaccinazione nel melanoma, intendiamo utilizzare le competenze acquisite negli studi preclinici, per valutare il tipo di risposta indotta nel paziente, mediante test di rilascio di citochine da parte di linfociti T co-coltivati con il melanoma autologo, test di immunofluorescenza con tetrameri per gli antigeni del melanoma noti, test di citotossicità e valutazione di eventuali risposte anticorpali.

## *Impatto assistenziale certo o potenziale*

L'impatto assistenziale di questo progetto è potenziale, anche se l'eventuale attivazione di un protocollo di fase I-II di vaccinazione cellulare autologa potrebbe avvenire in tempi medio-brevi.

## *Risultati e prodotti 2010*

Nel modello di neuroblastoma murino AJ/N2a abbiamo dimostrato l'efficacia della terapia basata sull'utilizzo di cellule tumorali trasfettate con il gene della citochina immunostimolante IL-21 (N2a/IL-21) in animali singenici affetti da micrometastasi. Inoltre abbiamo osservato che l'associazione di anticorpi anti-CD25, in grado di depletare le cellule immunosoppressive Treg CD4+CD25+Foxp3+, cura solo il 50% degli animali. Abbiamo così associato al vaccino cellulare N2a/IL-21 anticorpi anti-CD4 che depletano le cellule CD4+ e quindi tutte le Treg, mentre la IL-21 prodotta dal vaccino supporta i linfociti T CD8+ citotossici responsabili del rigetto. La % degli animali curati, sale così all'80% e

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

tali animali sviluppano immunità duratura nei confronti del tumore. Nel corso del 2010 abbiamo studiato un protocollo terapeutico basato sull'utilizzo della IL-21 ricombinante (rIL-21). Abbiamo sottoposto topi AJ affetti da micrometastasi a 5 inoculi s.c. di rIL-21 associando o meno anticorpi depletanti anti-CD4. La terapia con rIL-21 ha esercitato effetti limitati (16% di animali privi di tumore), mentre la terapia combinata (rIL-21+anti-CD4) ha curato il 70% degli animali, mostrando un'efficacia simile a quella della terapia cellulare associata all'anti-CD4. La deplezione delle cellule CD8+ riduce la % dei topi curati al 28%, indicando chiaramente l'importanza di questa sottopopolazione di linfociti citotossici nell'efficacia dell'immunoterapia, anche se non si esclude un contributo delle cellule NK. Infine circa il 70% degli animali curati sviluppa una memoria immunologica nei confronti delle cellule tumorali. L'impiego nei pazienti di rIL-21, che presenta una bassa tossicità, in alternativa a una terapia cellulare personalizzata sarebbe estremamente vantaggiosa, in quanto richiederebbe minori costi e manipolazioni.

Abbiamo inoltre continuato lo studio di protocolli di vaccinazione terapeutica nel modello di melanoma murino B16/C57/BL6. Dal momento che sono stati spesso descritti nei pazienti oncologici deficit quantitativi e funzionali a carico delle cellule dendritiche, abbiamo prodotto un vaccino cellulare in grado di secernere GM-CSF, una citochina che induce la maturazione di tali cellule senza attivare le cellule mieloidi soppressore. Poiché dati di letteratura riportano che il tripeptide RGD (arginina-glicina-acido aspartico) si lega all'integrina  $\alpha_5\beta_3$ , overespressa sulle cellule endoteliali durante la neoangiogenesi indotta da tumori, nel vettore utilizzato per la trasfezione delle cellule di melanoma è stato inserito il motivo RGD, mezzo ideale per veicolare il vaccino alla sede tumorale. Abbiamo quindi inoculato i.v. gli animali singenici con cellule parentali tumorigeniche B16 e poi li abbiamo sottoposti a vaccinazioni sequenziali con le cellule B16/GM-CSF/RGD, ma abbiamo riscontrato solo una debole attività terapeutica.

### *Pubblicazioni*

Ghedini G.-Ciravolo V.-Tortoreto M.-Giuffrè S.-Bianchi F.- Campiglio M.-Mortarino M.-Figini M.-Coliva A.-Carcangiu M.-Zambetti M.-Piazza T.-Ferrini S.-Menard S.-Tagliabue E.-Pupa S.  
Shed HER2 extracellular domain in HER2 mediated tumor growth and in Trastuzumab susceptibility.  
J. Cell. Physiol. 225:256/265, 2010

Lipnik K.-Naschberger E.-Gonin Laurent N.-Kodajova P.-Petznek H.- Rungaldier S.-Astigiano S.-Ferrini S.-Sturzl M.-Hohenadl C.  
Interferon gamma induced human guanylate binding protein 1 inhibits mammary tumor growth in mice.  
Mol. Med. 16(5/6):177/187, 2010

Orengo A.M.-Fabbi M.-Miglietta L.-Andreani C.-Bruzzone M.-Puppo A.- Cristoforoni P.-Centurioni M.G.-Gualco M.-Salvi S.-Boccardo S.- Truini M.-Piazza T.-Canevari S.-Mezzanzanica D.-Ferrini S.  
Interleukin (IL)/18, a biomarker of human ovarian carcinoma, is predominantly released as biologically inactive precursor.  
Int. J. Cancer Epub Nov 8, 2010

### *Presentazioni a congressi*

Croce M.-Orengo A.M.-Borghi M.-Brizzolaro A.-Rigo V.-Carlini B.-Corrias M.V.-Ferrini S.  
Cell-depleting anti-CD4 antibodies potentiate IL-21-driven immunotherapy in a syngeneic neuroblastoma model.  
Presentazione orale. 7 th National Conference Italian Society Immunology, Clinical Immunology and Allergology. Bari, 26-29 Maggio 2010

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Per quanto riguarda il modello di neuroblastoma murino abbiamo intenzione di valutare la cinetica della ricostituzione delle Treg che segue la deplezione delle cellule CD4+. Infatti nel corso di precedenti esperimenti abbiamo osservato che a 30 giorni dall'inizio dell'esperimento la popolazione CD4+ è rappresentata al 50% e che a 90 giorni è completamente ricostituita. Ora intendiamo sottoporre a terapia e deplezione animali con metastasi per sacrificarli a diversi intervalli di tempo e valutare se e con quale velocità ricompaiono le cellule CD4+CD25+FoxP3+. Inoltre ci proponiamo di elaborare nuove strategie per migliorare l'efficacia terapeutica della rIL-21, ad esempio, sperimentando l'associazione con anticorpi diretti contro la molecola OX40, espressa sulla superficie delle cellule Treg. L'interazione tra l'anticorpo agonista e OX40 determina inibizione dell'attività funzionale delle cellule regolatorie e dovrebbe consentire l'instaurarsi di una efficace risposta anti-tumorale. Infine intendiamo validare le varie strategie immunoterapeutiche studiate in questo modello in topi transgenici per il proto-oncogene MycN, che sviluppano spontaneamente una malattia simile al neuroblastoma umano.

I risultati ottenuti nel topo C57/BL6 affetto da melanoma metastatico in cui il protocollo basato sull'utilizzo di cellule B16/GM-CSF/RGD ha avuto una modesta efficacia terapeutica, ci hanno indotto a sperimentare diversi modelli di vaccinazione. In particolare valuteremo in questo modello di melanoma murino l'efficacia della terapia con rIL-21 associata ad anticorpi depletanti le Treg, che ha fornito ottimi risultati nel modello di neuroblastoma.

Infine esploreremo la terapia combinata (rIL-21+anti-CD4) anche nel modello di adenocarcinoma mammario murino TS-A/Balb in cui si è dimostrata efficace la terapia con vaccino cellulare (TS-A/IL-21) associata ad anticorpi depletanti anti-CD25.

<b>Disegno e sintesi di nuove molecole in grado di annullare la resistenza pleiotropica in cellule tumorali resistenti e di inibire l'MDR1 in cellule staminali derivate da tumori umani di diverso istotipo</b>
--

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

# Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

*Programma:* c - Innovazioni terapeutiche: sviluppo dalle fasi precoci, incluse le correlazioni biologiche, agli studi d'efficacia, inclusa la verifica di applicabilità nella pratica clinica

*Responsabile scientifico:* Maurizio Viale

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Cinzia Aiello, Rosaria Gangemi, Anna Maria Orengo

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* diltiazem; nifedipina; multidrug resistance; attività antitumorale; doxorubicina; tumor stem cells

*Altre strutture IST partecipanti:* s.s. Biopolimeri e proteomica (C. Rosano); s.s. Animal facility (E. Ognio)

*Altri Enti coinvolti:* Dip. di Biologia Animale, Università di Pavia (C. Fenoglio); Dip. di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Bari (M.A. Mariggiò); Dip. di Chimica Organica A. Mangini, Università di Bologna (D. Spinelli); Dip. di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università di Napoli "Federico II" (B. Cosimelli)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* MIUR PRIN, Compagnia di San Paolo

## *Background*

Nonostante i progressi compiuti negli ultimi anni nella chemioterapia antitumorale i fenomeni di resistenza intrinseca o acquisita con le conseguenti ricadute di malattia rimangono uno dei principali problemi che i clinici incontrano durante il trattamento dei pazienti neoplastici. Inoltre, negli ultimi anni, analizzando l'eterogeneità del potenziale tumorigenico delle cellule tumorali, si è sviluppata l'ipotesi riguardante le cellule staminali tumorali (CST) che postula che solo una piccola frazione di cellule tumorali è caratterizzata da illimitate potenzialità proliferative asimmetriche, ovvero capaci di generare tutte le sottopopolazioni del tessuto tumorale, ed ha la responsabilità della ricrescita tumorale e del fallimento terapeutico di tanti tumori. Queste cellule sono state per molti istotipi tumorali caratterizzate dal punto di vista fenotipico e funzionale per cui oggi è possibile con varie metodiche isolarle e studiarle. Proprio da questi studi è risultato che molte di queste cellule sono caratterizzate dall'aumentata espressione di trasportatori di membrana legati alla famiglia delle "ATP-binding cassette transporters" [ABCB1 (Pgp); ABCG2 e ABCB5]] inizialmente conosciuti per essere coinvolti in molti fenomeni di resistenza pleiotropica. Questo meccanismo, ormai noto da tempo, permette la selezione di cellule tumorali resistenti ad una varietà d'agenti antitumorali non chimicamente correlati fra loro come le antracicline, gli alcaloidi della vinca, le epipodofillotossine, i taxani ed altre molecole. La resistenza nella sua forma acquisita è causata principalmente da una sovraespressione di uno o più di tre geni [ABCB1 (Pgp-170 ); ABCG2 e ABCB1]] che codificano per molecole di membrana che hanno funzionalmente il compito di far effluire sostanze tossiche (o, nel caso di resistenza, farmaci) dalle cellule in modo ATP-dipendente. Quindi, cellule tumorali, siano esse o meno staminali, che sovraesprimono tali molecole in modo significativo rendono impossibile l'accumulo di adeguate quantità citotossiche di farmaco antitumorale, rendendone così vanificata l'attività.

Attualmente si pensa sia possibile attraverso sistemi diversi rendere le CST più sensibili all'azione dei farmaci antitumorali, in particolare proprio utilizzando molecole che siano in grado di inibire l'attività dei trasportatori di membrana così da facilitare l'accumulo di farmaci antitumorali altrimenti esclusi dalle cellule. Tale procedura è del tutto sovrapponibile a quella utilizzata per inibire la Pgp (ABCB1) nei tumori con resistenza acquisita. Ed è proprio su questa base che molte sostanze chimiche nuove o già utilizzate come farmaci vengono studiate per annullare i fenomeni di resistenza pleiotropica, ma sebbene alcune di esse si siano dimostrate attive nei saggi preclinici in vitro ed in vivo, una volta entrate in sperimentazione clinica hanno mostrato forti limitazioni dovute al loro scarso effetto, alla loro tossicità intrinseca e a interazioni farmacocinetiche negative con i farmaci antitumorali somministrati in associazione.

Negli ultimi anni parte del nostro lavoro di ricerca si è concentrato sulla sintesi e valutazione farmacologica come inibitori della Pgp-170 di sostanze chimiche nuove derivate da farmaci inibitori dei canali del  $Ca^{++}$  come il diltiazem e la nifedipina. Ciò ha portato alla selezione di alcune di queste molecole caratterizzate da una buona attività nel inibire l'attività della Pgp-170 e capacità di contrastare i fenomeni di resistenza pleiotropica in modelli cellulari in vitro.

## *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

L'obiettivo finale di questo progetto consiste quindi nella selezione di un numero significativo di molecole in grado di inibire la resistenza pleiotropica intrinseca o acquisita in modelli sperimentali in vitro ed in vivo in tumori murini e/o umani resistenti impiantati eterotopicamente e/o ortotopicamente nel topo.

Gli obiettivi secondari di questo progetto consistono:

- 1) nella selezione e nella valutazione in vitro ed in vivo di una o più molecole capaci di co-inibire il trasportatore di membrana ABCG2 e nell'identificazione di trattamenti in associazione con linfocine ad attività antitumorale attivi su CTS originate da tumori di istotipo diverso;
- 2) nella definizione di un modello in silico capace predire l'attività delle molecole e di definirne modifiche strutturali capaci di migliorarne l'attività farmacologica eventualmente riducendone l'impatto tossicologico.

## *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Essendo un progetto di natura sostanzialmente preclinica l'impatto assistenziale andrà comunque considerato potenziale e a medio-lungo termine. Questa ricerca offre la possibilità di definire strutture molecolari efficaci nell'inibire

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

la resistenza pleiotropica e di migliorarle attraverso un'attenta analisi eseguita con i metodi del "drug-design". Accanto a questa possibilità va anche considerata l'opportunità di coinvolgere industrie farmaceutiche nello sviluppo di quelle molecole che dovessero dimostrarsi particolarmente interessanti.

### *Risultati e prodotti 2010*

Sulla base della critica fornitaci da un "referee" della rivista "Molecular Pharmacology", che suggeriva di utilizzare la struttura cristallografica dell'MDR1 murino definita da Aller et al., nel 2009 (Science 323,1718-22) per "predire", mediante tecniche di "docking" molecolare, l'attività dei nostri inibitori di MDR1 (Viale et al, J Med Chem, 2009), abbiamo applicato ai dati d'attività dei nostri composti questo modello per valutarne la capacità predittiva. I risultati, confrontati con quelli ottenuti nel 2008 con il modello costruito secondo i principi dell'analogia strutturale a partire dal modello tridimensionale di MDR1 gentilmente concessoci dal Dr. Aina Westrheim Ravna (University of Tromsø, Norway), hanno dimostrato che quest'ultimo ha un valore predittivo molto migliore e permette di disegnare molecole caratterizzate da una maggiore attività inibitoria, quando dotate di un meccanismo d'azione coinvolgente un legame all'interno della cavità che alberga il "loop" che connette le porzioni TM4 e TM5 nella conformazione aperta di MDR1. Tale inaspettata differenza sarebbe attribuibile a piccole differenze strutturali in prossimità del supposto sito di legame (peraltro le due strutture mostrano un grado d'identità molto elevato, 87%) che renderebbe particolarmente difficoltosa l'interazione con le molecole inibitrici.

Sulla base delle indicazioni forniteci dal nostro modello molecolare di MDR1 abbiamo quindi sintetizzato una nuova serie di composti dotati, come previsto, di una maggiore attività inibitrice rispetto alla molecola "leader", in particolare in riferimento a variazioni della struttura spaziale nel centro chirale, alla presenza o meno di Br o Cl sulla molecola, alla lunghezza del residuo alchilico e alla presenza o meno di un doppio legame cis in tale catena.

Infine abbiamo iniziato lo studio dell'attività inibitrice delle molecole saggiate su MDR1 sul trasportatore di membrana ABCG2, utilizzando come modello cellulare la linea transfettata HEK/R2 che sovra-esprime tale trasportatore, senza trovare al momento alcuna molecola significativamente attiva.

### *Pubblicazioni*

Rosano C.-Cosimelli M.B.-Gangemi R.-Spinelli D.  
ABCB1 structural models and molecular dockings.  
J. Chem. Inform. Model., submitted

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

- Nel 2011 continuerà il disegno, la sintesi e la valutazione in vitro di nuovi inibitori di MDR1 insieme alla valutazione della loro attività nel modello cellulare Hek/R2 di valutazione dell'inibizione di ABCG2.

- Sulla base dei dati disponibili in letteratura si cercherà di costruire un modello di predizione dell'attività degli inibitori di ABCG2 e se ne suggerirà il potere predittivo sulla base dei dati ottenuti in vitro.

**Studi farmacodinamici e farmacocinetici per valutare l'applicabilità terapeutica di nuove associazioni farmacologiche, di nuove sostanze ad attività antitumorale e di nuovi trasportatori macromolecolari e nanotecnologici di farmaci antitumorali**

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

*Programma:* c - Innovazioni terapeutiche: sviluppo dalle fasi precoci, incluse le correlazioni biologiche, agli studi d'efficacia, inclusa la verifica di applicabilità nella pratica clinica

*Responsabile scientifico:* Maurizio Viale

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Cinzia Aiello, Rosaria Gangemi, Michela Croce

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* derivati dinitrobutadienici; derivati pirazolici; nanoparticelle; attività antitumorale; farmaci antiaritmici; anestetici locali

*Altre strutture IST partecipanti:* s.s. Biopolimeri e proteomica (C. Rosano); s.s. Animal facility (E. Ognio); s.c. Trasferimento genico (D. de Toterò)

*Altri Enti coinvolti:* Dip. di Biologia Animale, Università degli Studi di Pavia (C. Fenoglio); Dip. di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università degli Studi di Bari (M.A. Mariggiò); Dip. di Chimica Organica "A. Mangini", Università degli Studi di Bologna (D. Spinelli); Dip. Di Chimica e Chimica Industriale, Università degli Studi di Genova (G. Petrillo); Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Genova (A. Balbi); Dip. di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche, Università degli Studi di Genova (S. Cafaggi); Dip. di Discipl. Chirurgiche, Morfologiche e Metodologie Integrate, Università degli Studi di Genova (P. Santi); Lab. de Chimie Organique et Analytique, Université Sultan Moulay Slimane, Béni-Mellal, Morocco (E.M. Rakib)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

# Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

*Soggetti cofinanziatori:* MIUR PRIN

## *Background*

Sia la validazione preclinica di nuovi schemi terapeutici e di nuove formulazioni di farmaci già nell'uso clinico, sia la definizione di nuove molecole a potenziale attività antitumorale rappresenta un ovvio quanto obbligato passaggio mirato al miglioramento delle strategie terapeutiche in campo oncologico.

Da molti anni il nostro laboratorio è impegnato in questo tipo di ricerca preclinica volta sostanzialmente al miglioramento dell'indice terapeutico di farmaci antitumorali già impiegati in clinica e alla scoperta di nuove entità molecolari capaci di svolgere attività antitumorale caratterizzata da nuove specificità, minore tossicità (migliore indice terapeutico rispetto a quelli dei classici farmaci antitumorali) e capacità di sfuggire ai meccanismi di resistenza farmacologica siano essi specifici che di tipo pleiotropico.

Su queste basi abbiamo iniziato a studiare le caratteristiche farmacologiche di nuove sostanze appartenenti alle categorie dei composti nitrobutadienici e 1,5-pirazolici (e isomeri 1,3-pirazoli) e di nuove formulazioni del cisplatino su base nanotecnologica con risultati in parte preliminari ed in parte ormai consolidati estremamente incoraggianti.

L'1,4-bis(1-naphthyl)-2,3-dinitro-1,3-butadiene (Naph-DNB), molecola sintetizzata a partire dal 2,3-dinitro-1,3-butadiene, è dotato della capacità di inibire la proliferazione cellulare e di indurre apoptosi tramite l'attivazione della p53. Da questa molecola sono state derivate per sintesi chimica due altre molecole attive l'1,4-bis(2-naphthyl)-2,3-dinitro-1,3-butadiene (2-Naph-DNB), capace di legarsi anche ai microtubuli, e l'1-methoxycarbonyl-1-methylthio-3-nitro-4-(1-naphthyl)-2,3-butadiene (1-Naph-NMCB) dotato di un'attività in vitro e in vivo maggiore rispetto agli altri due composti. Dal punto di vista meccanicistico tutte e tre le molecole sono in grado di legarsi, sebbene in modo diverso, al DNA che quindi potrebbe rappresentare uno dei bersagli molecolari di queste molecole (oltre ai microtubuli per il 2-Naph-DNB). L'uso di queste molecole è peraltro problematico a causa della loro scarsa solubilità. Nell'insieme esse rappresentano veri e propri "lead compounds" sui quali poter effettuare opportune variazioni della struttura (anche in rapporto alle indicazioni dell'analisi "docking") in modo da migliorarne sia le caratteristiche farmacotossicologiche che la solubilità in mezzi acquosi. Quest'ultimo obiettivo potrebbe essere ottenuto grazie all'inserimento delle molecole in trasportatori macromolecolari come le ciclodestrine e i liposomi in grado sia di migliorarne la solubilità e quindi la somministrazione sia il "targeting", quest'ultimo fortemente legato alle proprietà fisiche di questi complessi macromolecolari.

Per quanto riguarda invece i composti 1,5-pirazoli e isomeri 1,3-pirazoli N-sostituiti essi ricoprono ruoli essenziali in numerosi composti farmaceutici come gli analgesici, gli antiinfiammatori, gli antibatterici, gli agenti antiangiogenetici e gli inibitori della CDK2/CiclinaA. Essi sono ampiamente studiati anche come chemioterapici antitumorali ed è in questa veste che saranno analizzati in questo progetto sulla base di modificazioni sintetiche del loro residuo eterociclico, modificazioni capaci di modificarne profondamente l'attività biologica generale. Delle nuove molecole via via sintetizzate dal DISCIFAR verranno analizzate le proprietà antiproliferative, citotossiche, apoptotiche e di induzione dei marcatori molecolari legati a questo fenomeno di morte cellulare. Una volta selezionate in vitro alcune molecole attive esse saranno avviate alla valutazione preclinica in vivo con saggi tossicologici e di attività farmacologia valutata in modelli tumorali murini o umani trapiantati in topi immunodeficienti.

Com'è noto il cisplatino è uno dei farmaci antitumorali classici più efficaci ed utilizzati nei confronti d'alcune patologie oncologiche quali le ovariche, le testicolari e del distretto cervico-cefalico. Peraltro, la sua elevata tossicità nei confronti del rene, dell'orecchio interno e del sistema nervoso periferico rendono difficile la gestione del paziente trattato. Abbiamo già dimostrato che farmaci non antitumorali come la procainamide e la procaina sono in grado di aumentare l'indice terapeutico del cisplatino grazie all'azione combinata del potenziamento dell'attività antitumorale e la riduzione dell'effetto tossico di questo farmaco, dimostrando inoltre che tali azioni sono legate sia a meccanismi di tipo farmacocinetico che a meccanismi più strettamente farmacodinamici.

In questo progetto raccoglieremo dati preclinici in vitro ed in vivo riguardanti i meccanismi attraverso cui i fenomeni di potenziamento si realizzano soprattutto per quanto riguarda il potenziamento dell'attività apoptotica del cisplatino.

Infine, allo scopo di migliorare l'indice terapeutico del cisplatino mediante variazioni delle sue caratteristiche farmacocinetiche e/o farmacodinamiche valuteremo poi nuove formulazioni di natura nanotecnologica basate sulla sintesi di nanoparticelle contenenti chitosano a diverso grado di metilazione, alginati e acido ialuronico a diverso peso molecolare. Le diverse combinazioni a livello di sintesi di nanoparticelle permetteranno di selezionare i "carrier" più attivi sia in vitro che in vivo e con caratteristiche antiproliferative, apoptotiche, di tossicità ed attività antitumorale ben definite. Accanto a queste nanoparticelle contenenti cisplatino inizieremo la sintesi di prodotti nanotecnologici basati sulla tecnologia delle nanogabbie d'oro. Quest'argomento piuttosto recente offre spunti molto interessanti per la ricerca preclinica essendo queste particelle in grado di veicolare farmaci, sistemi di riconoscimento cellulare e, soprattutto, di essere in grado di convertire lunghezze d'onda vicine all'infrarosso in emissione localizzata di calore e produzione di temperature in grado di uccidere le cellule. Analizzeremo quindi parametri come l'inibizione della proliferazione cellulare, l'induzione di apoptosi e dei geni ad essa correlati, l'attività in vivo per quelle particelle attive nei saggi in vitro ed i fenomeni di sinergismo fra l'attività fototermica e quella dovuta ai farmaci trasportati.

## *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

L'obiettivo generale di questo progetto consiste:

- nella selezione di nuove molecole e/o di nuovi sistemi di veicolazione dei farmaci che abbiano buoni requisiti in termini d'attività antitumorale, meccanismi d'azione nuovi ed originali, selettività e superamento delle barriere di resistenza
- nel raccogliere dati preclinici in vivo sulla protezione dai principali effetti tossici del cisplatino e dati preclinici in vitro ed in vivo riguardanti i meccanismi attraverso cui i fenomeni di potenziamento si realizzano, così da mettere a punto un protocollo di associazione fra cisplatino e procainamide (e/o procaina) che possa essere proposto per l'applicazione in sicurezza nell'uomo.

Obiettivi secondari:

- definizione del meccanismo d'azione delle molecole attive
- valutazione della sovra- o sottoespressione di geni specifici coinvolti nei processi di apoptosi

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

- valutazione mediante analisi "docking" dell'interazione delle molecole attive con specifici bersagli molecolari
- "drug design" di nuove molecole con caratteristiche migliorate rispetto ai "lead compound"
- valutazione in vivo della tossicità tissutale e dell'attività antitumorale dei derivati nitrobutadienici e pirazolici attivi in vitro
- valutazione dell'attività in vivo e della farmacocinetica plasmatica e tissutale del cisplatino dopo somministrazione di nanoparticelle caricate con questo farmaco
- analisi in vivo dell'attività apoptotica del cisplatino dopo co-somministrazione con procainamide/procaina

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Sebbene di natura prettamente preclinica il progetto può considerarsi, per taluni suoi aspetti, come ad esempio quelli relativi agli studi sul miglioramento dell'indice terapeutico del cisplatino grazie all'associazione con farmaci come la procainamide e la procaina, con un impatto assistenziale potenziale a medio termine grazie al fatto che le molecole coinvolte sono già ampiamente utilizzate in clinica e potrebbero agevolmente essere introdotte in studi clinici disegnati ad hoc.

Per quanto riguarda l'insieme delle sperimentazioni che riguardano nuove molecole e/o nuove formulazioni l'applicabilità risulta evidentemente a più lungo termine e l'impatto assistenziale certamente potenziale.

Accanto all'impatto assistenziale va inoltre considerata l'opportunità di coinvolgere industrie farmaceutiche nello sviluppo di quelle molecole e/o sistemi di veicolazione farmacologica che dovessero dimostrarsi particolarmente attivi.

### *Risultati e prodotti 2010*

Nel 2010 la nostra attività si è concentrata sostanzialmente su 4 linee di ricerca, ovvero la sintesi e valutazione: 1) di nuove entità liposomiali contenenti cisplatino; 2) di nuovi composti spiro-eteociclici e d'estratti del frutto della carruba ad attività antitumorale; 3) di gel di fibrina quali mezzi di rilascio controllato del cisplatino in soluzione o legato a "carrier" macromolecolari" e, infine 4) dell'attività di composti eterociclici su linee resistenti a farmaci antitumorali selezionate in vitro od ottenute mediante transfezione di proteine di trasporto di membrana.

Per quanto riguarda i liposomi abbiamo sintetizzato, in collaborazione con il Dip. di Scienze del Farmaco, dell'Università "G. D'Annunzio" di Chieti, particelle contenenti cisplatino che hanno dimostrato ottime caratteristiche di stabilità e attività antiproliferativa in vitro, quest'ultima paragonabile se non addirittura migliore di quella del cisplatino in soluzione. Questi risultati hanno aperto la prospettiva ad un successivo lavoro di realizzazione di liposomi contenenti associazioni farmacologiche fra cisplatino e farmaci ad attività antidotica nei confronti della tossicità di questo complesso del Pt, in modo da coniugare le caratteristiche di "targeting" dei liposomi con gli effetti protettivi e, in alcuni casi, di potenziamento dell'attività antitumorale delle molecole associate.

Abbiamo inoltre valutato, in collaborazione con la Facoltà di Scienze e Tecnologia dell'Università "Sultan Moulay Slimane" di Béni-Mellal in Marocco, sia l'attività antiproliferativa in vitro di una serie di nuove sostanze spiro-terocicliche che hanno dimostrato in alcuni casi una discreta attività antitumorale sia l'attività antiproliferativa d'alcuni estratti del frutto della carruba, riuscendo in questo caso ad identificare una frazione dotata di una significativa capacità di inibire la proliferazione in vitro di linee cellulari tumorali. Questo ci ha offerto la possibilità di iniziare una collaborazione per l'identificazione d'eventuali sostanze naturali dotate d'attività antitumorale.

Per quanto riguarda i gel di fibrina, sintetizzati con l'obiettivo di utilizzarli quale mezzo di rilascio di farmaci antitumorali in sede locoregionale dopo asportazione chirurgica del tumore, abbiamo sperimentato due tipi di gel a concentrazione di fibrina diversa (8 e 22 mg/ml) e gelificati in presenza di trombina e cisplatino. Su questi abbiamo valutato sia la cinetica di rilascio del farmaco antitumorale che l'attività in vitro su cellule P388 sospese in agar. I nostri risultati indicano che la concentrazione maggiore di fibrina rallenta, seppure non di molto, la dispersione del farmaco mentre ulteriori differenze in termini di rilascio ed attività si sono avute sostituendo il cisplatino con una forma di cisplatino complessato ad una macromolecola "carrier". Con entrambi i composti antitumorali i gel si sono dimostrati attivi nell'inibire la proliferazione delle cellule tumorali.

Infine, sulla base dei risultati ottenuti nel 2009 dall'analisi dell'attività antiproliferativa di nuovi composti eterociclici pirazolici, composti che giocano un ruolo essenziale nella costituzione di farmaci come gli antibiotici, gli antiinfiammatori e gli angiogenetici, abbiamo effettuato uno studio d'attività delle molecole inizialmente selezionate come attive su linee cellulari rese resistenti a farmaci antitumorali diversi mediante selezione in vitro o transfezione di trasportatori di membrana come l'ABCG2. I dati raccolti ci hanno permesso di confermare ulteriormente l'attività di queste molecole e il loro meccanismo d'azione e di scoprire che il meccanismo di resistenza verso queste molecole è di tipo MDR e risiede principalmente nella sovra-espressione della molecola di trasporto ATP-dipendente ABCG2. Inoltre, i nostri dati dimostrano che i meccanismi di resistenza agli agenti antimicrotubulari della famiglia del taxolo rendono le cellule maggiormente sensibili agli agenti pirazolici che hanno un meccanismo d'azione di tipo disaggregante della struttura dei microtubuli.

### *Pubblicazioni*

Fontana A.-Viale M.-Guernelli S.-Gasbarri C.-Rizzato E.-Maccagno M.-Petrillo G.-Aiello C.-Ferrini S.-Spinelli D.  
Strategies for improving the water solubility of new antitumour nitronaphthylbutadiene derivatives.  
Org. Biomol. Chem. 8:5674/5681, 2010

Sekkak H.-Mojahidi S.-Rakib E.M.-Abouricha S.-Kerbal A.-Aiello C.- Viale M.  
Synthesis and antiproliferative evaluation of spirothiadiazolopyridazine derivatives.  
Lett. Drug Des. Discov. 7:743/746, 2010

### *Presentazioni a congressi*

Petrillo G.-Spinelli D.-Viale M.  
Fighting against tumours.

4th International Symposium Current Trends in Drug Discovery Research "CTDDR-2010", 17-21st February 2010, Lucknow, India. Med Chem Res, 19 (Suppl 1), S34-S35, 2010

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

- Sintesi e valutazione di nuovi composti indazolici ad attività antitumorale. Valutazione in vitro dell'attività antiproliferativa e pro-apoptotica.
- Valutazione tossicologica e dell'attività antitumorale in vivo dei composti eterociclici pirazolici.
- Sintesi e valutazione in vitro e, possibilmente, in vivo in modelli tumorali murini, di liposomi contenenti associazioni farmacologiche fra cisplatino e farmaci protettivi nei confronti della sua tossicità.
- Valutazione nel ratto del rilascio del cisplatino dai gel di fibrina e la sua penetrazione nel tumore, del passaggio dei farmaci nella circolazione sanguigna e, preliminarmente, dell'efficacia del rilascio locale dei farmaci dai trasportatori a base di fibrina nel modello tumorale Walker 256 impiantato sottocute.
- Studio farmacocinetico e d'attività del cisplatino legato ai gel di fibrina in modelli specifici di melanoma umano con la definizione del rilascio dei farmaci nella circolazione sistemica e la valutazione dell'efficacia del rilascio locale dei farmaci dai gel/film di fibrina.