

RECETTORI PER CHEMOCHINE COME MARCATORI BIOLOGICI E MOLECOLARI DI RISPOSTA CLINICA E TARGET DIAGNOSTICO TERAPEUTICO

Stefania Scala

Dipartimento di Immunologia Clinica, Istituto Tumori Napoli, Fondazione G. Pascale, Napoli

Base di partenza e razionale

Le chemochine sono una famiglia di piccole proteine di 8-10 kDa con attività chemotattica. Esse sono caratterizzate da una vasta gamma di attività biologiche, incluso la regolazione del trafficking leucocitario, la modulazione della proliferazione di cellule ematopoietiche e l'adesione alle molecole di matrice extracellulari. Recentemente è stato identificato un ruolo dell'asse chemochine-recettori per chemochine nelle neoplasie umane. Principalmente il recettore CXCR4 e la relativa chemochina, CXCL12 sono stati descritti in numerose neoplasie. CXCL12 è una chemochina di tipo C-X-C che interagisce con un recettore specifico, CXCR4, un recettore a sette-domini transmembrane, associato ad una proteina G-.

Cellule di neoplasia mammaria esprimono elevati livelli di CXCR4 e la specifica chemochina, CXCL12, è massimamente espresso ai luoghi di metastasi di neoplasia mammaria. Trattamento con anticorpi neutralizzanti per CXCR4 riducono drammaticamente la metastasi. Anche nel modello di melanoma, carcinoma del colon, carcinoma renale, del colon retto, del polmone, glioblastoma, carcinoma della prostata l'asse CXCR4/CXCL12 ha dimostrato un ruolo centrale nella metastatizzazione. Pertanto il ruolo dei recettori per chemochine e relativi ligandi ha un ruolo cruciale nel processo di metastatizzazione. Recentemente inoltre abbiamo dimostrato un ruolo prognostico per l'espressione del recettore CXCR4 in associazione all'espressione del VEGF nelle neoplasie del colon retto e un valore prognostico per l'espressione del CXCR4 nel melanoma primitivo. Per definire i meccanismi alla base e evincere strategie inibenti saranno condotti studi sia nel carcinoma prostatico umano (*in vitro*) sia nel modello murino di sviluppo spontaneo del carcinoma prostatico TRAMP (*Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*). Inoltre, numerose evidenze sperimentali suggeriscono che i tumori solidi sono generati e mantenuti da una piccola popolazione di cellule tumorali capaci di proliferare indefinitamente e di dare origine ad una progenie di cellule differenziate. L'espressione di recettori per chemochina, e in particolare del CXCR4 è stata descritta diffusamente su cellule staminali neoplastiche. Verrà pertanto valutato l'analisi del sistema CXCR4-SDF1 a livello delle cellule staminali tumorali, con l'intento di dimostrarne la rilevanza nei tumori primitivi e nelle metastasi. Valutare l'espressione di chemochine e recettori per le cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cell, CSC*), o sfere, ottenute da vari tumori solidi, in particolare tumori del polmone, del colon, melanoma e glioblastoma. I livelli di espressione, in particolare del recettore CXCR4 saranno valutati anche su cellule più differenziate ottenute mediante coltura delle sfere in condizioni differenzianti oppure direttamente sulle cellule tumorali ottenute dalla dissociazione di campioni tumorali freschi. In parallelo verranno effettuati studi simili nelle leucemie acute mieloidi nelle quali è stato possibile dimostrare che i livelli di espressione del CXCR4 rappresentano un fattore prognostico negativo. Da tali evidenze consegue che l'antagonismo del segnale mediato da CXCR4 attraverso peptidi e/o piccole molecole potrebbero rappresentare un interessante approccio terapeutico. Valutazione di

potenziali strategie terapeutiche innovative in grado di ridurre i livelli di espressione di CXCR4 sulle CSC, quindi potenzialmente di ridurre la capacità invasiva, e il processo di *homing* delle CSC nella “nicchia” metastatica attraverso identificazione e sintesi di specifici antagonisti peptidici e/o piccole molecole.

Il progetto proposto indicherà un nuovo approccio terapeutico inibendo l’asse del CXCR4. Inoltre, l’identificazione di un nuovo bersaglio terapeutico potrebbe essere rapidamente trasferita in studi clinici con inibitori del CXCR4.

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi del progetto sono:

1. Valutare l’espressione di chemochine e relativi recettori in neoplasie solide e in leucemie acute mieloidi per identificare pattern di espressione. Saranno condotti anche studi nel carcinoma prostatico (*in vitro*) sia nel modello murino di sviluppo spontaneo del carcinoma prostatico TRAMP.
2. Valutare il ruolo dei recettori delle chemochine nelle cellule staminali tumorali. CSC–CXCR4 positive verranno isolate e analizzate per capacità proliferativa, di adesione e di migrazione delle diverse sotto-popolazioni di cellule staminali. In saggi *in vivo* verrà invece prevalentemente valutata la capacità metastatica delle due sottopopolazioni cellulari. Infine analizzare retrospettivamente la correlazione tra espressione di CXCR4 sulle cellule staminali e la prognosi dei pazienti.
3. Sintetizzare specifici inibitori dei recettori per chemochine o di chemochine. Innanzitutto l’obiettivo sarà quello di sintetizzare analoghi di natura peptidica/peptidomimetica del ligando endogeno, rispetto al quale risultino più stabili alla degradazione enzimatica *in vivo* e in grado di essere irrigiditi nella conformazione idonea all’interazione con il recettore prescelto mediante l’introduzione di strutture cicliche nel *backbone* peptidico, nonché con l’introduzione di aminoacidi non naturali dotati di catene laterali la cui topologia è in grado di incrementare l’affinità verso il sistema recettoriale.
4. Valutare l’effetto *in vitro* di inibitori del CXCR4 su blasti leucemici di LAM overesprimenti il CXCR4. In particolare, utilizzando modelli *in vitro* d’interazione fra cellule leucemiche e cellule stromali o molecole della matrice extracellulare, si cercherà di valutare se l’inibizione del CXCR4 sia in grado di modificare la risposta ai chemioterapici anti-leucemici. Questi studi verranno anche estesi a modelli *in vivo*.
5. Effettuare la validazione biologica delle molecole prodotte. In particolare i composti verranno testati per tossicità in un sistema cellulare *in vitro* e successivamente *in vivo*.
6. Eseguire sintesi, purificazione e analisi di complessi metallici coniugati a molecole di natura peptidica.
7. Utilizzare possibilmente in Studi Clinici di Fase I le molecole validate, nonché eventuali terapie basate sull’uso combinato di trattamenti tradizionali (chemioterapia, terapie anti-angiogenesi, ecc.) e nuove molecole selezionate.
8. Allestire studi clinici basati sul valore prognostico attribuito ai pattern di espressione dei recettori delle chemochine sulle cellule staminali tumorali.

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione del progetto Recettori per chemochine come marcatori biologici e molecolari di risposta clinica e target terapeutico

Proponente (Coordinatore del progetto)	Unità Operativa (UO) (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo	
Pascale (Stefania Scala)	UO1 (Pascale: Stefania Scala)	Pascale	Alfredo Siani	
		Pascale	Stefania Scala	
		Pascale	Vincenzo Rosario Iaffaioli	
		Pascale	Paolo del Rio	
		Pascale	Claudio Arra	
		CNR	Pietro Omodeo	
	UO2 (ISS: Ruggero Marchiano De Maria)	CNR	Stefania de Luca	
		ISS	Alessandra Carè	
		ISS	Ugo Testa	
		ISS	Franca Podo	
		ISS	Giuseppe Arancia	
		UO3 (HSR: Matteo Bellone)	HSR	Matteo Bellone
			HSR	Rossella Galli
	HSR		Claudio Doglioni	

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

L'obiettivo principale del secondo anno di attività è stata la validazione *in vivo* dei peptidi inibenti il CXCR4. Al fine di validare la capacità dei peptidi di spiazzare il ligando endogeno del recettore esperimenti di *binding* sono stati condotti utilizzando ligando SDF-1 α /CXCL12 marcata con il fluorocromo Alexa Fluor647. In questo saggio i peptidi Ciclo-Phe-7inv e Ciclo-Hys-7inv hanno dimostrato una capacità di spiazzamento analoga a quella dell'inibitore modello AMD3100.

I peptidi Ciclo-Hys-OH, Ciclo-Hys-7inv e Ciclo-Phe-7inv sono stati valutati nell'inibizione metastatica in un sistema di melanoma murino B16 trasfettate con il recettore CXCR4 umano (B16-hCXCR4). Il trattamento con i peptidi Ciclo-Phe-7inv e Ciclo-Hys-OH ha determinato una riduzione, sia nel numero che nella dimensione, delle metastasi polmonari maggiore di quella ottenuta con l'AMD3100. Un altro modello *in vivo* ha utilizzato cellule di carcinoma renale umano SN12C, trasfettate con il plasmide p-EGFP: il trattamento con i peptidi Ciclo-Phe-7inv e Ciclo-Hys-OH riduce la crescita del tumore primario. Attualmente è in corso validazione in un sistema di osteosarcoma murino K7M2 in topi BALB/c immunocompetenti.

I peptidi che hanno mostrato una marcata attività antagonista sono stati selezionati per ulteriori saggi *in vivo*. Questi corrispondono ai peptidi allungati di due residui all'N-terminale rispetto al nucleo ciclico a 5 termini, in modo da inserire un altro residuo carico positivamente conservato nelle due sequenze di chemochine considerate (SDF-1 α e vMIP-II) e con il verso della sequenza corrispondente a quella della chemochina endogena (SDF-1 α). Parallelamente, è stato condotto uno studio teorico per l'ottenimento di un modello tridimensionale del complesso

SDF-1 α /CXCR4, La regione N-terminale del recettore è stata modellata usando come vincolo la conformazione assunta nel complesso con SDF-1 α . Al fine di effettuare studi di imaging ottico, paramagnetico ed eventualmente radioattivo, sono stati progettati e sintetizzati coniugati in cui la sequenza di Ciclo-Phe 7 inv è covalentemente legata ad un fluoroforo sulla sua estremità N-terminale e ad un agente chelante sulla catena laterale di un residuo di lisina inserito nel segmento peptidico.

Cellule CXCR4 positive in campioni di melanoma metastatico e i livelli di espressione di tale recettore nella popolazione staminale tumorale sono state valutate. Cellule di melanoma CXCR4+ migrano rispetto alle cellule che non esprimono il recettore. È attualmente in corso la valutazione della capacità di inibire la formazione di metastasi in topi nudi inoculati con cellule di melanoma utilizzando inibitori peptidici specifici per il CXCR4.

È stata identificata una regolazione dell'espressione di CXCR4 da parte del miR146a, del miR-219 (mediante la regolazione di una glicoproteina nota come CD164 che si associa al recettore) e del miR-222. Per quest'ultimo e per l'inibitore del ciclo cellulare p27Kip, è stato individuato quale target il fattore trascrizionale Ets-1, fattore che regola l'espressione di geni prometastatici, CD44 e CXCR4. Inoltre in leucemie acute mieloidi (LAM) è stato valutato un effetto della downmodulazione del recettore. Dati preliminari suggeriscono che il blocco dell'asse CXCR4/SDF-1 sensibilizza le cellule leucemiche al trattamento chemioterapico. Inoltre, sempre su cellule di LAM, è stato valutato l'effetto dell'ipossia sull'espressione di CXCR4 e del miR146a, dimostrando come l'ipossia moduli in maniera opposta l'espressione di entrambe le molecole.

CXCR4 nei meccanismi migratori e invasivi in delle cellule di glioblastoma umano U87. Mediante saggi di stimolazione effettuati in microambiente condizionato con CXCL12, AMD3100, peptide Ciclo-Phe-7Inv è stato osservato che l'SDF-1 α incrementa l'attività migratoria delle cellule U87 del 15%, ma non invasione in Matrigel. Trattamento Ciclo-Phe-7Inv riduce la capacità migratoria e per circa un quarto l'invasività delle cellule U87, in assenza di CXCL12. Tale inibizione risulta essere significativamente maggiore dell'AMD3100, sia in assenza che in presenza di CXCL12.

In vivo è stata valutata la risposta al trattamento con il peptide PhE-7 in un modello di glioblastoma ottenuto dall'impianto di cellule U87 nel topo nudo mediante immagini MR.

L'inizio del trattamento nello stesso giorno dell'inoculo ha indicato che i trattamenti sia con PhE-7 che AMD rallentavano la crescita del tumore rispettivamente di circa 35% e 60%, in confronto al trattamento con salina.

Prosegue lo studio delle relazioni tra l'asse CXCR4/CXCL12 e il ciclo della fosfatidilcolina (PC) cellule leucemiche (CEM), per valutare il significato diagnostico e prognostico del profilo spettrale ¹H MRS della "colina totale" in cellule tumorali. I risultati hanno mostrato che: 1) il contenuto medio intracellulare di fosfocolina è sensibile sia alla stimolazione di CXCR4 da parte della chemochina SDF-1 α , sia all'inibizione recettoriale da parte di AMD3100; 2) l'espressione su membrana di CXCR4 viene down-modulata per inibizione selettiva di una fosfolipasi specifica per PC. Inoltre, l'esistenza di una associazione molecolare tra CXCR4 e PC-plc è stata evidenziata mediante esperimenti di co-immunoprecipitazione.

Il ruolo di CXCR4/CXCL12 nel processo di metastatizzazione del carcinoma prostatico è stato studiato mediante due diverse azioni:

1. Analisi dell'espressione di CXCR4 in biopsie di tumore umano e su modelli in vivo di neoplasia prostatica (TRAMP, TRansgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate)

Sono stati testati 11 anticorpi commerciali specifici per CXCR4 al fine di identificare i candidati all'uso in immunoistochimica su materiale fissato e incluso in paraffina. Sono stati selezionati due anticorpi con pattern di reazione atteso (membrana e citoplasma), di

cui uno mono e uno policlonale. Sono stati quindi valutati 120 campioni di carcinoma prostatico con varie caratteristiche di stadio ed evoluzione clinica. In parallelo all'analisi per CXCR4 i campioni sono stati valutati per l'espressione di CXCL12, così come per altri marcatori di staminalità, quali CD133 e SOX2, che hanno mostrato reattività nei campioni selezionati.

Abbiamo inoltre raccolto sieri e apparato urogenitale da topi TRAMP e wild type (WT) di differenti età. Abbiamo quindi condotto studi in citofluorimetria e immunohistochimica per valutare l'espressione di CXCR4/SDF1 sulle cellule neoplastiche e stromali nel modello TRAMP. Le analisi in citofluorimetria dei tumori prostatici hanno evidenziato in generale una bassa espressione di CXCR4. Il dato è stato confermato sulla linea di tumore prostatico TRAMP-C1, che ha mostrato una bassa espressione di CXCR4, per altro ristretta a < 20% della popolazione cellulare. Purtroppo gli anticorpi a nostra disposizione hanno dimostrato una bassa affinità in immunohistochimica per i tessuti murini.

2. *Generazione di cellule staminali tumorali da topi TRAMP e analisi dell'espressione di CXCR4/SDF1 in cellule staminali tumorali*

Utilizzando specifiche condizioni di coltura siamo riusciti ad ottenere linee di cellule staminali da prostata murina sana e linee di cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cells*, CSC) da lesioni PIN, adenocarcinoma e tumore neuroendocrino. Tutte le linee hanno dimostrato *in vitro* la capacità di autorigenerarsi e differenziarsi.

Publicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo secondo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Cecchetti S, Ricci A, Iorio E, Pisanu M, Paris L, Portella L, Scala S, Podo F. Links between CXCR4/CXCL12 axis and phosphatidylcholine cycle in a human lymphoblastoid cell line. In: *SIC 2009 Annual Meeting abstracts - 51° Congresso Nazionale della Società Italiana di Cancerologia - Cancer research in the technological post-industrial era*, November 23-26, Milano. Poster P46.
2. Felicetti F, Errico MC, Bottero L, Segnalini P, Stoppacciaro A, Biffoni M, Felli N, Mattia G, Petrini M, Colombo MP, Peschle C, Carè A. The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer Res* 2008;68(8):2745-54.
3. Felicetti F, Errico MC, Segnalini P, Mattia G, Carè A. MicroRNA-221 and -222 pathway controls melanoma progression. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8(11):1759-65.
4. Ierano C, Giuliano P, D'Alterio C, Cioffi M, Mettivier V, Portella L, Napolitano M, Barbieri A, Arra C, Liguori G, Franco R, Palmieri G, Rozzo C, Pacelli R, Castello G, Scala S. A point mutation (G574A) in the chemokine receptor CXCR4 detected in human cancer cells enhances migration. *Cell Cycle* 2009;8(8):1228-37.
5. Labbaye C, Spinello I, Quaranta MT, Pelosi E, Pasquini L, Petrucci E, Biffoni M, Nuzzolo ER, Billi M, Foà R, Brunetti E, Grignani F, Testa U, Peschle C. A three-step pathway comprising PLZF/miR-146a/CXCR4 controls megakaryopoiesis. *Nat Cell Biol* 2008;10(7):788-801.
6. Napolitano M, Ottaiano A, Mauro F, Ieranò C, Satriano R, Pacelli R, Franco R, De Angelis V, Castello G, Scala S. CD4(+)/CD45RA(+)/CXCR4 (+) lymphocytes are inversely associated with progression in stages I-III melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2009 Sep 25 (online prima della stampa). prima della stampa).
7. Portella L, Napolitano M, Consales C, D'Alterio C, Polimero M, Cioffi M, Vitale RM, Amodeo P, De Luca S, Monfregola L, Castello G, Scala S. *In vitro* and *in vivo* functional characterization of

new cycle-peptides inhibitors for C-X-C chemokine receptor-4 (CXCR4). In: *SIC 2009 Annual Meeting abstracts - 51° Congresso Nazionale della Società Italiana di Cancerologia - Cancer research in the technological post-industrial era*, November 23-26, Milano. Poster P79.

8. Ricci A, Cecchetti S, Iorio E, Pisanu M, Paris L, Portella L, Scala S, Podo F. Relationship between CXCR4/CXCL12 axis and phosphatidylcholine cycle in a human lymphoblastoid cell line monitored by 1H MRS. In: *ESMRMB 2009 Congress*, October 1-3, Antalya (Turkey). Peer-reviewed abstract n. 652.

Brevetti conseguiti nell'ambito del progetto

In corso di deposito: "Peptidi e peptidomimetici ciclici che legano il recettore CXCR4 e loro uso come agenti diagnostici, terapeutici e mobilizzatori."