

IDENTIFICAZIONE DI MARCATORI PER LA PREDIZIONE DELLA RISPOSTA A NUOVI FARMACI ANTITUMORALI (INIBITORI DI HDAC, TIROSINO CHINASI E POMPE IONICHE)

Pier Giuseppe Pelicci

Dipartimento di Oncologia Sperimentale, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

Base di partenza e razionale

L'obiettivo della nuova medicina molecolare è la definizione degli specifici difetti genetico-molecolari di un determinato tumore per il disegno di farmaci appropriati ed esempi sono già ampiamente disponibili nella pratica clinica così come l'identificazione di profili di espressione genica capaci di costituire *signature* di sensibilità/resistenza ai diversi trattamenti. Alcuni nuovi farmaci antitumorali mostrano particolare interesse per le prospettive di identificazione di marcatori per la predizione delle risposte in pazienti incologici:

– *Inibitori delle tirosino-chinasi*

In base alla considerazione che enzimi tirosin chinasi sono coinvolti in *pathway* di proliferazione e sopravvivenza cellulare e che varie protein chinasi hanno un ruolo regolatorio in tali processi, l'inibizione di queste attività enzimatiche, attivate in modo aberrante in diversi tipi di tumore, rappresenta un nuovo ed estremamente promettente approccio con differenti opportunità terapeutiche con il quali interferire a diversi livelli sulla patofisiologia della cellula tumorale. Tra i recettori ad attività tirosin-chinasica quelli più studiati, definibili come *upstream target*, appartengono alla famiglia EGFR (EGFR, HER-2/neu, HER-3), VEGFR (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), PDGFR (KIT, PDGFRA, PDGFRB), mentre altri possibili bersagli terapeutici sono costituiti dalle molecole effettrici di tali recettori (*downstream targets* perché a valle della cascata indotta dall'interazione tra fattore di crescita e recettore), tra cui Ras/Raf-MEK/Erk, BRAF, PI3K/Akt, PTEN, Ret. Proprio in relazione al loro ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale mitogenico e quindi nei processi di proliferazione e differenziamento cellulare così come nell'attivazione dell'angiogenesi, i recettori ad attività tirosin-chinasica sono stati oggetto di un'intensa ricerca, finalizzata all'identificazione di molecole in grado di interferire sulla loro attività in modo specifico. A tutt'oggi diversi sono gli inibitori tirosin-chinasici, sia recettoriali che citoplasmatici, utilizzati in clinica nel trattamento di neoplasie solide e sistemiche. Generalmente si tratta di anticorpi monoclonali che legano la porzione extracellulare del recettore inibendone l'interazione col ligando (gefitinib nel caso di EGFR, trastuzumab nel caso di HER-2, IMC-1C11 nel caso di VEGFR) o impedendone la dimerizzazione (come nel caso di pertuzumab per HER-2) e di piccole molecole capaci di inibire l'attività enzimatica delle tirosin-chinasi (come nel caso dell'imatinib per la proteina di fusione ad attività tirosin-chinasica BCR/ABL nella leucemia mieloide cronica).

– *Inibitori delle istone-deacetilasi*

Le deacetilasi (HDAC) e le acetil-transferasi (HAT) istoniche influenzano la struttura della cromatina e modulano l'attività di diverse proteine non istoniche implicate nella

regolazione di differenti funzioni cellulari. Ad oggi nell'uomo sono state identificate 18 HDAC, che sono state raggruppate in tre classi. La classe I, a cui appartengono HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8, è ubiquitaria ed è implicata nella patogenesi di numerosi tumori. La sperimentazione clinica di inibitori delle HDAC ha condotto recentemente il primo inibitore di HDAC (il SAHA) alla registrazione per l'utilizzo nella terapia di alcuni linfomi a cellule T. Gli attuali inibitori delle deacetilasi istoniche in sperimentazione clinica (incluso il SAHA) mostrano tutti una certa tossicità e una bassa selettività per i diversi isoenzimi HDAC. Uno di questi inibitori (l'acido valproico o VPA) è da diversi decenni in uso come farmaco antiepilettico, a dosi che nei pazienti neurologici non sono però sufficienti ad inibire HDAC. Il VPA è un inibitore specifico per la classe I di HDAC, e potrebbe quindi rappresentare un farmaco selettivo per la sottofamiglia di HDAC maggiormente coinvolta nella tumorigenesi.

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

L'obiettivo di questo programma di ricerca è l'identificazione di marcatori biologici e molecolari di predizione della risposta clinica ad alcuni dei farmaci molecolari disponibili: inibitori di istone-deacetilasi, HDACi (VPA e SAHA); inibitori delle tirosino chinasi, TKi (herceptin e imatinib); inibitori delle pompe ioniche (*Proton Pump Inhibitors*, PPI) in selezionati tipi di tumore (tumori della mammella, melanomi, leucemie mieloidi e glioblastomi). I tumori che verranno inseriti nello studio verranno caratterizzati per l'espressione del bersaglio e, ove appropriato, per il suo stato di attivazione o per la presenza di alterazioni genetiche. La sensibilità ai farmaci molecolari selezionati verrà analizzata sia sul *bulk* delle cellule tumorali che su colture di cellule staminali dello stesso tumore.

Lo studio verrà eseguito utilizzando modelli pre-clinici di neoplasia: i) modelli animali, comprendenti topi transgenici (leucemie mieloidi acute ottenute mediante transgenizzazione delle proteine di fusione PML-RAR e AML1-ETO; leucemia mieloide cronica esprimente bcr-abl; tumore mammario esprimente erbB2; melanomi sovraesprimenti B-Raf) e xenotrapianti dei corrispondenti tumori umani in topi immunodeficienti; ii) Campioni umani, comprendenti colture primarie di tumore (es. cellule epiteliali mammarie e di melanoma), colture di cellule tumorali staminali (mammosfere, neurosfere, melanosfere e LTC-IC) e campioni biotipici dagli stessi tumori.

L'attività sperimentale sarà articolata in tre fasi:

- *Fase 1*: Valutazione della attività biologica (crescita cellulare, apoptosi, senescenza, ciclo cellulare), biochimica (effetto sulle vie di segnalazione downstream allo specifico bersaglio molecolare: HDAC, TK, pompe ioniche) e molecolare (profili di espressione) di ciascun farmaco nelle varie colture primarie di tumore e nei modelli murini transgenici disponibili. Tali studi condurranno all'identificazione di bersagli critici della risposta e/o potenziali marcatori.
- *Fase 2*: Valutazione dell'espressione dei marcatori di risposta nelle biopsie dei tumori, mediante ibridazione in situ e immunistochimica.
- *Fase 3*: Validazione dell'efficacia predittiva dei marcatori selezionati mediante studi correlativi su xenotrapianti di tumori umani. Se questo programma di ricerca condurrà all'identificazione di marcatori di risposta ai farmaci molecolari studiati, programmiamo l'esecuzione di uno studio clinico pilota (carcinomi metastatici della mammella trattati con VPA). Infine, verranno condotti studi preliminari per la caratterizzazione del bersaglio molecolare di nuovi farmaci (ET-43) potenzialmente attivi nei confronti di liposarcomi esprimenti la proteina di fusione FUS-CHOP.

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

L'obiettivo di questo programma di ricerca è l'identificazione di marcatori biologici e molecolari di predizione della risposta clinica ad alcuni dei farmaci molecolari disponibili: inibitori di istone-deacetilasi, HDACi (VPA e SAHA); inibitori delle tirosino chinasi, TKi (herceptin e imatinib); inibitori delle pompe ioniche (PPI) in selezionati tipi di tumore (tumori della mammella, melanomi, leucemie mieloidi e glioblastomi). Il nostro approccio coinvolge, per vari tipi di tumore, la caratterizzazione del bersaglio terapeutico (espressione, stato di attivazione e presenza di alterazioni genetiche) e la loro sensibilità ai Farmaci Molecolari selezionati. La sensibilità viene valutata sia *in vivo*, utilizzando modelli animali (topi transgenici e xenotrapianti in topi immunodeficienti), che *in vitro*, utilizzando sia il *bulk* delle cellule tumorali che colture di cellule staminali dello stesso tumore. Nella prima fase di questo studio abbiamo condotto i seguenti esperimenti:

1. HDACi e Nutline in tumori mammari e melanomi

Abbiamo riscontrato una correlazione tra stato di acetilazione degli istoni e sensibilità al trattamento con HDACi *in vitro* e stiamo effettuando profili di espressione per identificare signature predittive di risposta. In parallelo, stiamo mettendo a punto protocolli per il silenziamento selettivo delle varie HDAC. Per quello che concerne la valutazione di HDACi su modelli animali, stiamo lavorando con topi transgenici MMTV-ErbB2/neu e mettendo a punto i vari saggi sperimentali. Esperimenti *in vitro* (mammosfere) e *in vivo* (trapianto) con cellule staminali tumorali (BCSCs) provenienti da tumori MMTV-ErbB2/neu hanno evidenziato un arricchimento delle cellule staminali rispetto al tessuto mammario sano, un fenotipo dipendente dall'inattivazione di p53. Tramite l'utilizzo di Nutlin3, un composto chimico che determina un accumulo di p53, siamo stati in grado di revertire la cinetica di divisione tra BSC normali e tumorali. Useremo questo modello sperimentale per studiare anche HDACi. Stiamo infine mettendo a punto modelli sperimentali per testare l'attività di HDACi nel melanoma. Abbiamo generato e caratterizzato 20 colture primarie di melanoma. Dallo stesso campione bioptico abbiamo analizzato la capacità di alcune cellule di crescere in sospensione formando sferoidi (cellule staminali e progenitori non differenziati). Sedici campioni hanno formato sferoidi, mentre 4 sono stati in grado di formare solo colture di cellule aderenti.

2. Trabectedin nei liposarcomi mixoidi

Trabectedin è un nuovo farmaco attivo nei liposarcomi mixoidi, caratterizzati dal trascritto di fusione FUS-CHOP. Per validare l'ipotesi che il Trabectedin agisca bloccando la capacità transattivante del trascritto FUS-CHOP stiamo studiando due linee cellulari di liposarcoma e sei linee umane stabilizzate come xenograft in animali immunodeficienti.

3. Regolazione farmacologica della famiglia p53/p63/p73

Abbiamo caratterizzato la regolazione dell'espressione dei componenti della famiglia di p53 (p63 e p73), la regolazione della ligasi Itch, coinvolta nella loro degradazione e alcuni composti chimici che possono inibire l'attività di quest'ultima. Abbiamo dimostrato che Itch è una proteina stabile, e che la via degradativa proteasoma-dipendente non è implicata nella regolazione dei suoi stessi livelli endogeni.

4. *Recettori ad attività tirosin-chinasica in sarcomi alveolari, tumori maligni delle guaine nervose periferiche, mesoteliomi e cordomi*

Abbiamo stabilizzato una linea cellulare di mesotelioma in grado di crescere *in vitro* e di generare tumori nel topo nudo che utilizzeremo per la caratterizzazione dei *pathway* rilevanti ai fini terapeutici (analisi mutazionale dei geni EGFR, PDGFRA, PDGFRB, PI3K, PTEN, RAS e RAF, del loro livello di espressione e stato di attivazione). Negli adenocarcinomi polmonari, abbiamo dimostrato la attivazione costitutiva di recettori del PDGF, non dovuta a mutazioni genetiche.

5. *Identificazione di pazienti responsivi a trattamenti con inibitori di tirosin-chinasi*

È stata identificata nei GIST una nuova mutazione attivante il recettore c-KIT (c-KITL576P) associata a mancata risposta ad imatinib. L'analisi biochimica del tumore residuo dopo trattamento ha mostrato l'incapacità di imatinib di inibire la autofosforilazione di c-KIT indotta dalla mutazione.

6. *Indolinoni e RET*

Un inibitore della serie indolinoni RPI-1 inibisce la capacità proliferativa e invasiva delle cellule tumorali attraverso attività multitarget. Nell'ambito di questa classe è stata identificata una nuova serie di inibitori di RET che agiscono attraverso una differente modalità di interazione con il sito di legame dell'ATP della chinasi.

7. *Inibitori di pompa protonica (PPI), melanoma e osteosarcoma*

Sono in corso studi clinici in pazienti con melanoma e osteosarcoma per valutare la capacità chemosensibilizzante dei PPI, ed è in attivazione un protocollo di trattamento su pazienti con carcinoma mammario recidivato.

8. *HDACi e glioblastomi*

Abbiamo confermato su 71 linee primarie di glioblastoma (GBM) l'upregolazione di Enhancer in Zeste 2 (EZH2), un gene del gruppo Polycomb già coinvolto in tumorigenesi. L'analisi dell'espressione viene correntemente eseguita in cellule tumorali che crescono come neuro sfere (NS) o come cellule aderenti (AC) (EZH2 è sempre più espresso nelle NS). In un sottogruppo di GBM in cui era disponibile l'informazione sulla sopravvivenza complessiva (n=44) abbiamo potuto verificare che essa è significativamente inferiore quando il GBM forma NS *in vitro* ($p < 0,01$). Abbiamo inoltre verificato che solo le NS, ma non le AC, esprimono livelli misurabili di CD133, un gene espresso in cellule staminali neurali. Sono iniziati gli esperimenti di trattamento con SAHA, un inibitore delle istone deacetilasi (HDAC), allo scopo di valutare la efficacia del SAHA nel limitare la proliferazione cellulare e il suo effetto su EZH2. Alla concentrazione 2 microM SAHA era capace di impedire la formazione di nuove NS e provocare l'adesione o la morte delle cellule in coltura. A tale concentrazione anche l'espressione di EZH2 è nettamente diminuita.

9. *Rai e glioblastomi*

Abbiamo dimostrato che la proteina Rai è espressa nel 60% dei glioblastomi esaminati. L'espressione di Rai all'interno del tumore è disomogenea: Rai è sempre espresso invece, ad elevati livelli, nelle neurosfere tumorali isolate. Abbiamo dimostrato che Rai regola la capacità migratoria delle neurosfere isolate da glioblastomi umani e il loro potenziale tumorigenico *in vivo*, suggerendo che la ridotta capacità migratoria delle neurosfere tumorali in assenza di Rai possa determinare tumori intracranici con ridotte caratteristiche diffuse e infiltrative.

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione del progetto Identificazione di marcatori per la predizione della risposta a nuovi farmaci antitumorali (inibitori di HDAC, tirosino chinasi e pompe ioniche)

Proponente (Coordinatore del progetto)	UO (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
IEO (Pier Giuseppe Pelicci)	UO1 (IEO: Pier Giuseppe Pelicci)	IEO	Pier Giuseppe Pelicci
		IEO	Saverio Minucci
		IEO	Susanna Chiocca
		IEO	Salvatore Pece
		IEO	Giuseppina Bonizzi
		IEO	Luisa Lanfrancone
	UO2 (INT: Maria Grazia Daidone)	Humanitas	Paola Allavena
		IDI	Alessandro Terrinoni
		INT	Maria Grazia Daidone
		INT	Angela Greco
		INT	Sylvie Ménard
		INT	Gabriella Sozzi
	UO3 (Besta: Gaetano Finocchiaro)	INT	Franco Zunino
		INT	Silvana Pilotti
		ISS	Stefano Fais
		Besta	Gaetano Finocchiaro
		Besta	Maurizio Gelati
		IEO	Giuliana Pelicci

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

- Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, A. Mantovani. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18(1):3-10.
- Cassinelli G, Favini E, Degl'Innocenti D, Salvi A, De Petro G, Pierotti MA, Zunino F, Borrello M.G, Lanzi C. RET/PTC1-driven neoplastic transformation and proinvasive phenotype of human thyrocytes involve Met induction and β -catenin nuclear trans location. *Neoplasia* 2009;11:10-21.
- Cincinelli R, Cassinelli G, Dallavalle S, Lanzi C, Merlini L, Botta M., Tuccinardi T, Martinelli A, Penco S, Zunino F. Synthesis, modeling, and RET protein kinase inhibitory activity of 3- and 4-substituted β -carbolin-1-ones. *J. Med. Chem* 2008; 51:7777-87.
- Stacchiotti S, Tamborini E, Marrari A, Brich S, Arisi Rota S, Orsenigo M, Crippa F, Morosi C, Gronchi A, Pierotti MA, Casali PG, Pilotti S. Response to sunitinib malate in advanced alveolar soft part sarcoma (ASPS). *Clin Cancer Res* (accettato per la pubblicazione).
- Perrone F, Da Riva L, Orsenigo M, Losa M, Jocollè G, Millefanti C, Pastore E, Gronchi A, Pierotti MA, Pilotti S. PDGFRA, PDGFRB, EGFR and downstream signalling activation in malignant peripheral nerve sheath tumour. *Neuro Oncology* (accettato per la pubblicazione)
- Tamborini E, Viridis E, Orsenigo M, Arisi Rota S, Brich S, Conca E, Gronchi A, Stacchiotti S, Manenti G, Casali PG, Pierotti MA, Pilotti S. Analysis of receptor tyrosine kinases (RTK) and downstream pathways in chordomas. (inviato per la pubblicazione).