

## **SVILUPPO DI TERAPIE INNOVATIVE ANTITUMORALI MEDIANTE L'IMPIEGO DI TECNOLOGIE AVANZATE**

Annarica Calcabrini, Stefania Meschini, Annarita Stringaro, Laura Toccaceli, Giuseppe Formisano, Marisa Colone, Maria Condello, Giuseppina Bozzuto, Giuseppe Arancia, Agnese Molinari  
*Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

L'attività svolta in campo oncologico nel Reparto Metodi Ultrastrutturali per Terapie Innovative Antitumorali (MUTIA) del Dipartimento di Tecnologie e salute riguarda diversi filoni di ricerca, propri del gruppo stesso, o provenienti da diverse collaborazioni interne ed esterne all'Istituto, sia nazionali che internazionali.

L'approccio multidisciplinare applicato è di tipo integrato e comparativo e prevede l'impiego di diverse metodologie analitiche, tecniche e strumentali, differenziate in rapporto alla specifica attività sperimentale. Il personale attualmente operante nel Reparto ha ereditato la pregressa esperienza professionale maturata nel settore dell'*imaging* ultrastrutturale dal gruppo storico dell'ex Laboratorio di Ultrastrutture e si avvale, tra l'altro, di diverse tecniche di microscopia elettronica e videomicroscopia implementate, laddove necessario, dal contributo delle professionalità fisiche e ingegneristiche proprie del Dipartimento di appartenenza.

Le attuali attività di ricerca attengono a tre grandi filoni:

- sviluppo di colture cellulari tridimensionali e individuazione di marcatori tumorali come bersaglio di nuove terapie antitumorali;
- sostanze naturali e terapie innovative;
- impiego di nanomateriali nelle terapie antitumorali: contributi al miglioramento del *drug delivery* e dell'efficacia terapeutica.

### **Sviluppo di sistemi 3D e individuazione di marcatori tumorali come bersaglio di nuove terapie antitumorali**

La nostra attività di ricerca è svolta per lo più su modelli cellulari *in vitro* e/o *ex vivo*. L'uso di colture cellulari bidimensionali (2D) permette lo studio di determinati processi biochimici e fisiologici della cellula, ma limita l'analisi di specifiche funzioni tissutali. Infatti, il fenotipo e le funzioni delle singole cellule sono strettamente dipendenti dall'interazione con la matrice extracellulare e le cellule adiacenti. In coltura bidimensionale le cellule possono perdere importanti proprietà, quali differenziazione, polarizzazione, comunicazione intercellulare e contatti con la matrice, mentre possono acquisire altre caratteristiche come l'incremento della loro capacità proliferativa.

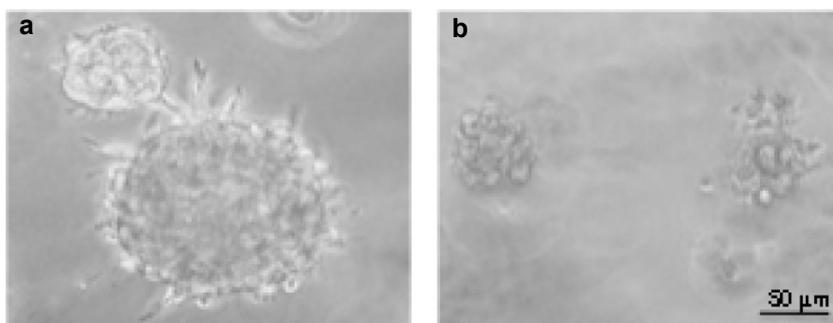
Negli studi di tossicità cellulare di farmaci e composti, i risultati ottenuti *in vitro* impiegando colture 2D non sempre hanno un valore predittivo sulla tossicità *in vivo*, ed è spesso riscontrata un'evidente discrepanza tra risultati ottenuti *in vitro* e in modelli animali. Ad esempio, nelle colture di cellule tumorali in monostrato le sostanze più efficaci sono farmaci chemioterapici che agiscono sulla proliferazione e mitosi, mentre composti che agiscono su altri processi (interazioni intercellulari, differenziazione, transizione epitelio-mesenchimale, presenza di *cancer stem cells*) non possono essere adeguatamente valutati. L'architettura 3D e l'interazione con la matrice esercitano forti effetti sull'efficacia dei trattamenti. Da qui sorge la necessità di

ampliare i saggi di tossicità *in vitro* da modelli 2D a 3D. Quest'ultimi saranno fondamentali per lo svolgimento di indagini approfondite su alcune caratteristiche acquisite dalle cellule tumorali nel corso della progressione neoplastica, quali la perdita di farmacosenibilità, la capacità di infiltrare i tessuti adiacenti e formare metastasi a distanza. Tali caratteristiche costituiscono gli ostacoli maggiormente incontrati nel corso della terapia antitumorale e, frequentemente, causa del suo fallimento. Nasce da ciò l'esigenza di acquisire sempre più conoscenze sui meccanismi regolanti l'insorgenza della farmacoresistenza, i processi di migrazione e invasione delle cellule tumorali e sulle eventuali correlazioni intercorrenti tra i due fenomeni. L'individuazione di nuovi bersagli farmacologici, infatti, rappresenta un prezioso contributo per la messa a punto di strategie terapeutiche intelligenti.

## Stato di sviluppo

Attualmente nel Reparto MUTIA, in collaborazione con il laboratorio diretto dal dott. Martín Pérez dell'Instituto de Investigaciones Biomédicas (Madrid), si stanno mettendo a punto sistemi di crescita tridimensionale in Matrigel di cellule tumorali di carcinoma mammario umano MCF7 e MDA-MB-231. Sono state scelte queste due linee perché rappresentano il tipico fenotipo epiteliale non invasivo (MCF7) e il fenotipo basale, indifferenziato e invasivo (MDA-MB-231) di carcinoma mammario. Le cellule epiteliali in coltura rispondono a proteine della matrice contenute nel Matrigel quali collagene, laminina, entactina e fattori di crescita, simili alla composizione della matrice extracellulare del tessuto di origine.

Osservazioni al microscopio ottico a contrasto di fase dimostrano una differente morfologia delle strutture tridimensionali (Figura 1).



**Figura 1. Colture 3D di cellule MDA-MB-231; (a) controllo, (b) Dasatinib**

In un esperimento pilota abbiamo utilizzato colture 3D di MDA-MB-231 per saggiare un composto, il Dasatinib, noto inibitore dell'attività tirosin-chinasi del proto-oncogene src, la cui espressione è aumentata in molti tipi di carcinoma mammario (1). Dopo circa tre settimane di crescita, la presenza del farmaco nel mezzo di coltura determina un'evidente inibizione della proliferazione e un'alterazione della struttura della sfera rispetto al controllo (Figura 1). Ciò è in accordo con risultati ottenuti in sistemi 2D sulla capacità del Dasatinib di inibire anche la migrazione e invasività cellulare.

Ognuna delle fasi del processo di metastasi del tumore richiede numerose specifiche interazioni molecolari tra le cellule tumorali, la matrice extracellulare circostante e le cellule stromali. Inoltre, ogni fase è controllata da segnali interni ed esterni che attivano complesse cascate di trasduzione del segnale con conseguente rimodellamento del citoscheletro e

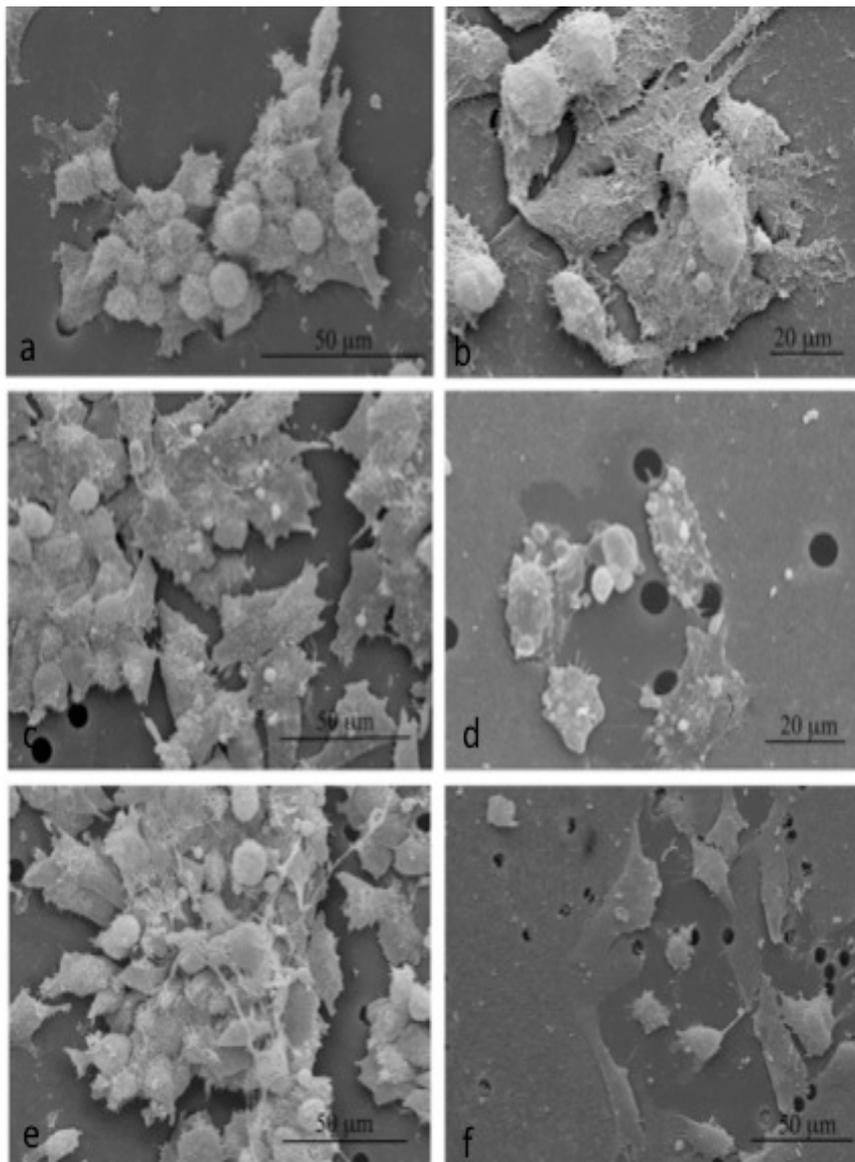
interazioni cellula-cellula e cellula-substrato. È noto dalla letteratura che le cellule tumorali, in modelli di matrice extracellulare 3D, sono in grado di adottare strategie e comportamenti invasivi che riflettono un fenotipo più o meno aggressivo del tumore di provenienza. Un comportamento cosiddetto “individuale-mesenchimale” è associato ad intensa attività proteolitica, ma che non necessariamente conferisce un vantaggio selettivo a favore delle cellule tumorali. Viceversa, un comportamento cosiddetto “collettivo”, caratterizzato da cellule che migrano associandosi in gruppi più o meno “solidali”, può rafforzare il potenziale invasivo delle cellule tumorali, anche in assenza di una intensa attività proteolitica (2). Questo potrebbe spiegare l'assoluta inefficacia degli inibitori delle metalloproteinasi in alcuni tumori.

Lo scopo principale dello studio svolto nel nostro laboratorio è stato quello di chiarire i meccanismi subcellulari e molecolari delle diverse caratteristiche d'invasività delle cellule tumorali e l'individuazione di specifiche proteine coinvolte. Tramite saggi *in vitro* effettuati con il *transwell chamber invasion assay* sono state analizzate le proprietà migratorie e invasive di cellule tumorali di diversa origine istologica al fine di chiarire quali strategie utilizzano le diverse linee cellulari in esame e come queste strategie siano associate ad un comportamento più o meno aggressivo. I risultati ottenuti hanno evidenziato che i diversi tipi di cellule tumorali hanno un diverso potenziale migratorio e invasivo e che la presenza del trasportatore dei farmaci P-glicoproteina (P-gp), noto marcatore di polifarmacoresistenza delle cellule tumorali, aumenta tale potenziale nelle cellule di melanoma umano, di carcinoma mammario e di adenocarcinoma del colon (3). Il comportamento adottato dalle cellule tumorali durante i processi di migrazione e invasione è stato analizzato mediante *imaging* con microscopia confocale a scansione laser e con microscopia elettronica a scansione. Lo studio comparativo effettuato tra le linee tumorali di diversa origine istologica ha permesso di individuare diversi comportamenti associati ai diversi potenziali. In particolare, è stato osservato che la strategia migratoria e invasiva più vantaggiosa per le cellule tumorali appare in genere associata ad un comportamento cosiddetto “ameboide-individuale”, in cui le cellule tendono a muoversi in modo isolato. Le osservazioni morfologiche e ultrastrutturali sono state associate all'analisi dei segnali intracellulari e dell'espressione di specifiche molecole di adesione. Le cellule tumorali con il più alto potenziale sono in grado, sotto lo stimolo migratorio, di attivare contemporaneamente diversi *pathways* molecolari, mentre i diversi comportamenti migratori e invasivi sembrano essere caratterizzati da uno specifico profilo di espressione delle molecole di adesione (2).

Nei processi di metastatizzazione è stato identificato un ruolo dell'asse chemochine-recettori per chemochine. In uno studio condotto nell'ambito del Progetto “Recettori per chemochine come marcatori biologici e molecolari di risposta clinica e target terapeutico”, afferente al Programma Straordinario di Ricerca Oncologica 2006, Alleanza Contro il Cancro, svolto in collaborazione con la dott.ssa Giulia Carpinelli del Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze e con la dott.ssa Stefania Scala dell'Istituto per la ricerca e la cura dei tumori “Fondazione G. Pascale”, è stato valutato il ruolo dell'asse CXCR4/CXCL12 nei processi di invasione delle cellule di glioblastoma umano U87. In particolare, è stato studiato l'effetto di molecole di natura peptidica, analoghi del ligando endogeno (CXCL12), sul potenziale migratorio e invasivo delle cellule U87. Mediante saggi di stimolazione effettuati in microambiente condizionato con CXCL12, con il suo analogo il peptide Ciclo-Phe-7Inv e con l'inibitore del CXCR4 l'AMD3100, è stato verificato come in assenza di chemochina, il peptide Ciclo-Phe-7Inv sia in grado di inibire di circa il 54% la migrazione e di circa il 19% l'invasione. In presenza di CXCL12 tali percentuali raggiungono invece i valori del 36% e del 9%, rispettivamente. È interessante osservare che tale inibizione è significativamente maggiore di quella indotta dall'AMD3100.

Inoltre, nell'ambito di un ampio studio condotto in collaborazione con il dott. Michele Caraglia della seconda Università di Napoli, è stato valutato il ruolo del recettore per

l'urotensina (UTR) nella progressione neoplastica del carcinoma della prostata. In particolare, nel nostro laboratorio è stato valutato l'effetto dell'Urotensina-II (UT-II, un potente peptide vasocostrittore ligando naturale dell'UTR) e dell'Urantide (UPG, un antagonista dell'UTR) sul potenziale migratorio e invasivo delle cellule di carcinoma prostatico LNCaP. I risultati hanno dimostrato che l'UPG induce una significativa riduzione dose-dipendente della migrazione e dell'invasione delle cellule, quando comparata all'effetto dell'Urotensina. Le osservazioni condotte mediante microscopia elettronica a scansione (Figura 2) hanno evidenziato, che sia UTII che UPG inducono una modificazione dello stato di aggregazione cellulare, con significativo incremento delle connessioni intercellulari e alterazione del sistema locomotore.



**Figura 2. Transwell chamber invasion assay. Cellule di carcinoma prostatico LNCaP durante il processo di invasione della matrice extracellulare; (a, b) controllo, (c, d) UPG, (e, f) UTII**

Quest'ultimo effetto appare associato a una riduzione dell'autofosforilazione di FAK e all'induzione di espressione di specifiche integrine sulla superficie delle cellule LNCaP. Gli effetti sulla motilità e invasività cellulare appaiono imputabili all'inibizione dell'attività di RhoA (4).

Infine, in uno studio condotto in collaborazione con la dott.ssa Simona Gaudi del Dipartimento del Farmaco è stata valutata l'attività antitumorale dell'Abacavir (ABC) un inibitore nucleosidico della trascrittasi inversa (NRTI), comunemente usato nella terapia contro l'HIV. È stato dimostrato che ABC è in grado di indurre l'arresto del ciclo cellulare in G2 / M, senescenza e morte cellulare nelle cellule di carcinoma prostatico PC3. Tali effetti appaiono associati a significative modifiche del volume nucleare e della struttura nucleolare, come dimostrato dall'analisi morfometrica quantitativa, e a profonde alterazioni della morfologia cellulare. Inoltre, esperimenti condotti mediante *transwell chamber invasion assay* hanno dimostrato che ABC è in grado di ridurre il potenziale migratorio e invasivo delle cellule tumorali. Lo studio in microscopia elettronica a scansione ha evidenziato un drammatico aumento di clusterizzazione delle cellule dopo il trattamento con Abacavir: il rafforzamento delle interazioni cellula-cellula molto probabilmente è responsabile dell'inibizione della migrazione delle cellule attraverso i pori della membrana (5).

## Conclusioni e prospettive future

L'impiego di colture tridimensionali per lo studio *in vitro* degli effetti di sostanze (naturali e non) con possibile attività antitumorale permette di ottenere un quadro più preciso dei possibili effetti *in vivo*. Molto spesso le cellule rispondono in maniera differente agli agenti tossici in condizioni di crescita tridimensionale: dosi di un composto, efficaci nell'inibire la proliferazione o bloccare un certo processo in colture bidimensionali, perdono il loro effetto in colture 3D.

Verranno quindi allestite colture tridimensionali di linee di carcinoma mammario, prostatico e di glioblastoma, che attualmente si stanno utilizzando nel Reparto MUTIA, per lo studio degli effetti di varie sostanze, sia di origine naturale che di sintesi, con potenziale effetto antitumorale. I risultati ottenuti saranno correlati ai dati ottenuti in precedenza utilizzando colture bidimensionali.

Le colture tridimensionali saranno utilizzate anche per valutare le modalità di interazione con sistemi cellulari 3D dei *nanocarriers* (liposomi, nanoparticelle metalliche, micelle) potenzialmente utili per il *drug delivery* nelle cellule tumorali.

Nella pratica clinica i fenomeni della farmacoresistenza e della invasività possono essere strettamente correlati. L'individuazione delle proteine specifiche coinvolte permetteranno la sperimentazione di nuove strategie terapeutiche che prevedono l'impiego di agenti in grado di inibire selettivamente la funzione dei bersagli molecolari individuati. I risultati di questo studio potranno fornire utili suggerimenti per l'ottimizzazione dei protocolli terapeutici.

## Sostanze naturali e terapie innovative

Per quanto riguarda la seconda linea, l'impiego dei prodotti naturali, quale potenziale approccio terapeutico alternativo per il trattamento di alcune patologie cronico-infettive e per lo sviluppo di terapie innovative in oncologia, è una delle più recenti priorità della ricerca biomedica internazionale (6). Questa nuova prospettiva è sorta sotto la spinta pressante di notevoli problemi correlati all'insorgenza della farmacoresistenza sia nella terapia anti-tumorale

che anti-microbica. I due fenomeni in alcuni casi condividono meccanismi biologici e quindi eventuali target farmacologici filogeneticamente conservati.

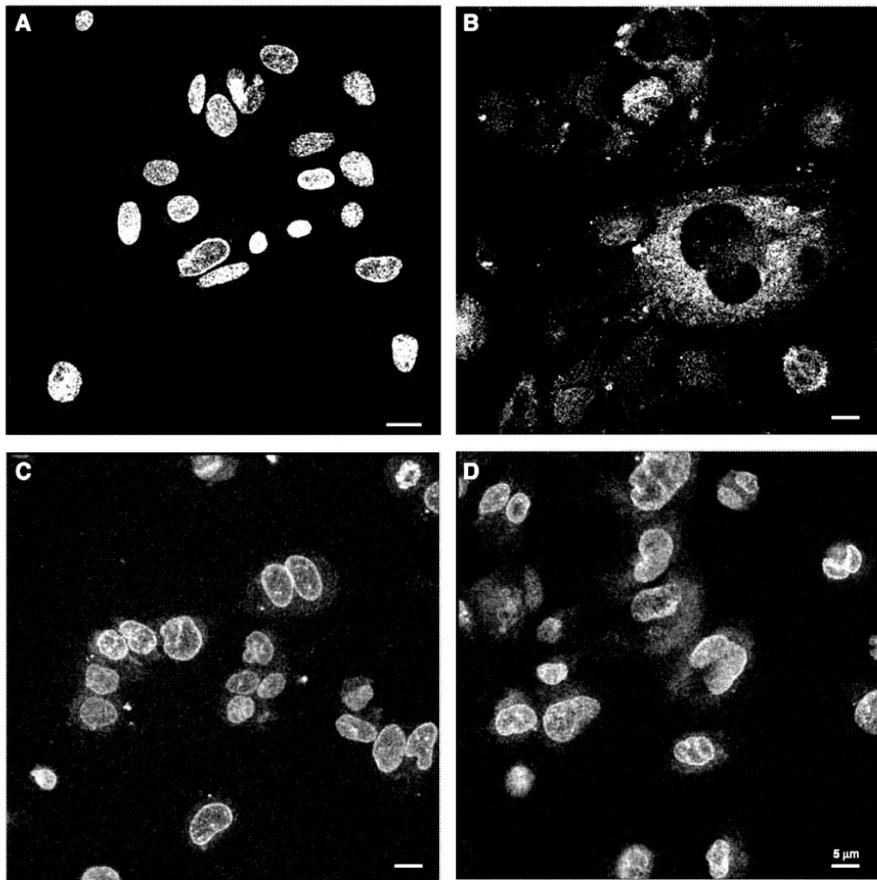
Nell'ambito di tale ricerca è stata valutata la possibile attività citotossica e/o chemiosensibilizzante di sostanze di origine naturale quali il *Tea Tree Oil* (TTO) e la voacamina.

## Stato di sviluppo

Studi condotti nel nostro laboratorio hanno permesso di dimostrare come una sostanza naturale, l'olio essenziale estratto dalla *Melaleuca alternifolia*, il TTO, sia in grado di superare la resistenza all'apoptosi, caspasi-dipendente, P-gp-mediata, delle cellule di melanoma umano farmacosistenti M14 ADR (7). Tale effetto viene mediato dall'interazione del TTO con la membrana plasmatica delle cellule di melanoma, come dimostrato dagli studi biofisici condotti su modelli di membrana (film di Langmuir Blodgett) e da studi ultrastrutturali condotti mediante la tecnica del *freeze-fracturing* (8). È stato quindi valutato, mediante un'analisi morfometrica quantitativa, l'effetto del TTO e del suo componente attivo il terpinen-4-olo anche sul potenziale migratorio e invasivo delle cellule M14 ADR confrontandole con le cellule della linea parentale farmacosensibile M14 WT. I risultati ottenuti hanno dimostrato che sia il TTO sia il terpinen-4-olo sono in grado di ridurre la capacità migratoria e invasiva delle cellule di melanoma umano e in modo più efficiente nelle cellule della linea farmacosistente. Inoltre, le indagini svolte attraverso microscopia elettronica a scansione hanno confermato l'effetto operato dal TTO sulle membrane cellulari. L'analisi dei segnali intracellulari ha dimostrato come quest'effetto risulti nell'inibizione dei segnali intracellulari (ERK1/2 e p38 MAPK) dipendenti dall'attività della la P-glicoproteina (9).

L'osteosarcoma e il sarcoma di Ewing sono i principali tumori maligni dell'osso nell'infanzia e, nonostante la loro rarità, hanno un importante impatto sul sistema sanitario nazionale. Essendo i sarcomi altamente resistenti e metastatizzanti è importante tentare di modificare i regimi terapeutici basati sull'uso di agenti chemioterapici convenzionali con finestre terapeutiche ristrette e tossicità elevata, al fine di aumentare la probabilità di cura del paziente o di prolungarne la sopravvivenza. Il nostro lavoro sperimentale si basa sull'utilizzo di un alcaloide vegetale, la voacamina, estratto dalla corteccia della radice della pianta *Peschiera fuchsiaeifolia*, dimostratosi essere fortemente chemiosensibilizzante nei confronti del chemioterapico doxorubicina, in linee cellulari con fenotipo MDR (*Multidrug Resistance*) di diverso istotipo, e privo di tossicità alle concentrazioni chemiosensibilizzanti usate in linee umane normali (10-12). Tale effetto è dovuto alla sua capacità di inibire, in maniera competitiva, la funzionalità della P-gp aumentando quindi l'accumulo intracellulare dell'agente chemioterapico (Figura 3).

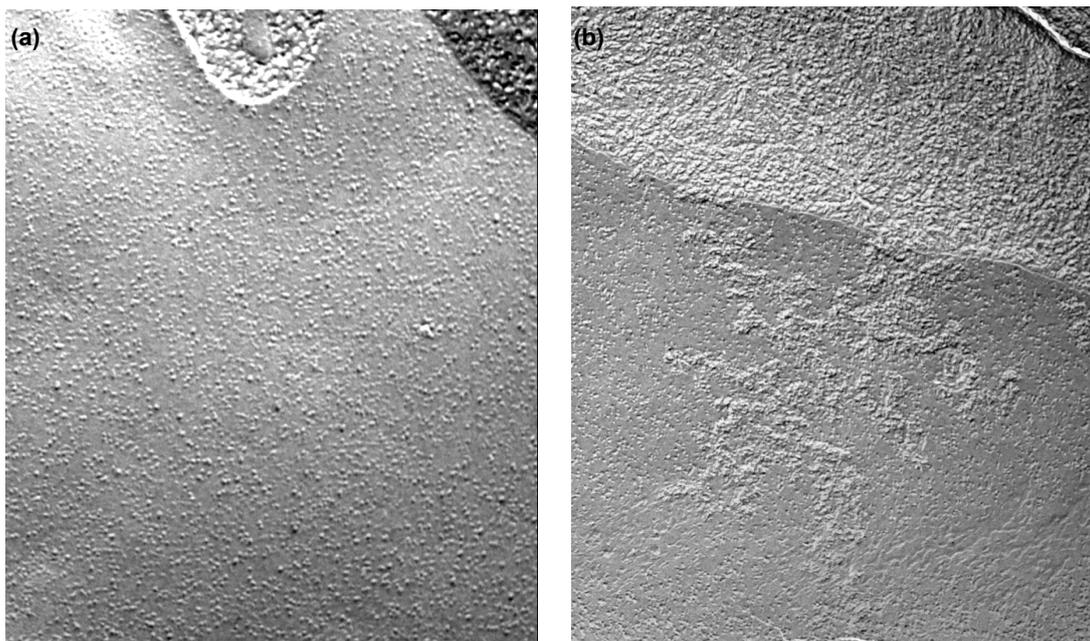
La voacamina induce un meccanismo di morte cellulare per autofagia su cellule di osteosarcoma sensibili e resistenti ai chemioterapici quali la doxorubicina (13). Le ricerche ancora in corso indicano inoltre che un tal effetto non è esclusivo delle cellule di osteosarcoma umano ma è presente anche in altri tipi di cellule tumorali, quali il carcinoma del colon e il glioblastoma. La capacità chemiosensibilizzante della VOA, nonché l'induzione di morte cellulare per autofagia, rende questa sostanza particolarmente interessante per la futura terapia anti-tumorale in cellule resistenti all'apoptosi (14). Il possibile sfruttamento del meccanismo di morte cellulare per autofagia nella terapia oncologica rappresenta un'ulteriore possibilità innovativa, grazie alla peculiare poliedricità del fenomeno.



**Figura 3. Cellule di osteosarcoma sensibili (a, c) e resistenti (b, d), dopo trattamento con doxorubicina (a, b) e doxorubicina + voacamina (c, d)**

La resistenza dei tumori ai chemioterapici è un fenomeno complesso e multifattoriale che coinvolge diversi meccanismi intracellulari. Uno degli obiettivi della ricerca oncologica è l'individuazione di nuove strategie terapeutiche combinate che presentino massima efficacia ed effetti collaterali limitati o nulli. L'elettroporazione è un metodo molto efficiente che utilizza impulsi elettrici per indurre modificazioni dello strato lipidico della membrana plasmatica delle cellule tumorali, come dimostrato da studi ultrastrutturali condotti precedentemente nel nostro laboratorio (Figura 4) (15).

La formazione di canali acquosi (elettropori) favorisce il *delivery* di molecole esogene e farmaci. Il nostro obiettivo è stato quello di valutare l'applicazione di impulsi bifasici con il trattamento con doxorubicina su cellule farmaco-resistenti di adenocarcinoma del colon (LoVo) impiantate su topi *nude*. L'elettrochemioterapia è stata usata, su diversi modelli animali e vari tipi di tumore che presentano scarsa permeabilità di membrana, combinando tale metodo con farmaci chemioterapici quali bleomicina o cisplatino. I risultati sperimentali e l'analisi istopatologica del trattamento combinato elettroporazione-doxorubicina, ha evidenziato la distruzione del tessuto tumorale e la sua sostituzione con tessuto cicatriziale. La ricerca e l'analisi istopatologica del tumore hanno evidenziato un rallentamento della crescita e una severa modificazione del tessuto canceroso, tale da rendere le cellule LoVo resistenti sensibili agli effetti citotossici del chemioterapico doxorubicina.



**Figura 4. Membrana plasmatica di cellule di melanoma cresciuto in topo osservate mediante la tecnica del freeze-fracturing. Controllo. (b) Dopo elettroporazione è possibile visualizzare una alterazione dell'architettura lipidica di membrana.**

Infine, da alcuni anni, in collaborazione con il prof. Enzo Agostinelli del Dipartimento di Scienze Biochimiche dell'Università Sapienza di Roma, si sta portando avanti uno studio per una nuova terapia antitumorale, basata sull'effetto citotossico indotto su cellule tumorali umane in coltura dai prodotti di ossidazione enzimatica della spermina,  $H_2O_2$  e aldeide(i), formati nella reazione di deaminazione ossidativa catalizzata dall'aminossidasi (BSAO), purificata dal siero bovino. I risultati ottenuti con esperimenti di clonogenicità hanno mostrato che i fenotipi MDR sono più sensibili all' $H_2O_2$  e alle aldeidi rispetto a quelli WT. Studi di microscopia elettronica a trasmissione hanno mostrato alterazioni ultrastrutturali a livello mitocondriale.

Il danno cellulare maggiormente rilevato nelle cellule MDR viene attribuito alla presenza dei ROS. L'enzima BSAO, sia in forma libera che inserito in microparticelle, inoculato intraperitonealmente in ratti, ai quali sono state preventivamente impiantate cellule di melanoma (B16-F0), è in grado di indurre una regressione del tumore pari 40% (enzima libero) e superiore al 70% (enzima immobilizzato). Le due forme enzimatiche, reagendo con le poliamine endogene presenti in alta concentrazione nelle cellule tumorali, sono in grado di produrre le specie citotossiche  $H_2O_2$  e aldeide(i) (16-18). Tale ricerca è ora sviluppata nell'ambito del Progetto *Toxic effects induced by polyamine metabolites on melanoma cells: a new therapeutic approach* afferente al Programma Italia - Stati Uniti, in collaborazione con il prof. Gary Ostroff dell'University of Massachusetts Medical School.

## **Conclusioni e prospettive future**

I risultati incoraggianti ottenuti da questi studi suggeriscono di provare l'effetto chemiosensibilizzante della voacamina o del TTO in combinazione con altri farmaci utilizzati in clinica nei sarcomi quali, vincristina, cisplatino, metotrexato, ecc. L'utilizzo di schemi di

trattamenti diversi saranno valutati e analizzati con lo scopo di aumentare l'attività antitumorale del farmaco citotossico e ridurre la dose impiegata *in vivo*. L'utilizzazione del sistema enzimatico BSAO/spermina, a differenza della chemioterapia classica, potrebbe indurre un *killing* selettivo verso la massa tumorale ed essere considerato come nuova strategia terapeutica. I liposomi, oppure le microparticelle di BSAO-PEG, sembrano essere un supporto biocompatibile per veicolare l'enzima attraverso la membrana cellulare con prospettive in terapia antitumorale, soprattutto nei pazienti portatori di neoplasie MDR.

L'elettroporazione è considerato un metodo efficiente anche per il silenziamento di particolari geni, coinvolti nel meccanismo di morte cellulare, mediante l'uso di *RNA interference* specifici. Nell'utilizzo degli RNAi si evidenziano numerosi ostacoli, come il *delivery in vivo*, la soppressione incompleta dei geni target, la farmacoresistenza e l'interferenza con i micro-RNA endogeni. Numerose prove sperimentali e approcci metodologici innovativi sono necessari per trasferire questo modello nella pratica clinica. L'utilizzo della elettroporazione anche in questo ambito potrebbe migliorare l'assorbimento dei nucleotidi utilizzati sia *in vitro* sia *in vivo*. L'obiettivo futuro è quello di riuscire ad aumentare l'efficacia del silenziamento dei principali geni autofagici (ATG), responsabili dell'induzione di questo tipo di morte cellulare, che in alcuni fenotipi tumorali come il carcinoma mammario, è causa di resistenza ai trattamenti farmacologici.

## **Impiego di nanomateriali nelle terapie antitumorali: contributi al miglioramento del *drug delivery* e dell'efficacia terapeutica**

Lo sviluppo delle nanotecnologie per la diagnosi, il trattamento e il monitoraggio delle lesioni tumorali sta acquistando grande interesse sanitario. La scelta di *nanocarrier* quali micelle polimeriche, dendrimeri, nanoparticelle metalliche, liposomi, con alta efficienza funzionale ma con effetti tossici ridotti, rappresenta uno degli importanti obiettivi perseguiti dalla ricerca in campo oncologico. Lo sviluppo di nanoparticelle come carrier di farmaci in medicina terapeutica, preventiva e rigenerativa, richiede uno studio approfondito delle caratteristiche chimico-fisiche e ultrastrutturali, nonché un'analisi dei processi fisiologici attivati dall'interazione della nanoparticella con i sistemi cellulari coinvolti. Tale linea di ricerca trova la sua naturale collocazione nel Dipartimento di Tecnologie e Salute, depositario di competenze scientifiche e tecnologiche multidisciplinari indispensabili per il suo svolgimento.

L'emergere delle nanotecnologie ha offerto l'opportunità di avvicinare la diagnosi alla terapia (teranostica). Il termine teranostica è stato coniato per definire tutti quegli studi in corso allo scopo di sviluppare delle specifiche terapie personalizzate per varie malattie e di combinare insieme le capacità diagnostiche e terapeutiche. La logica è nata dal fatto che le malattie come i tumori sono estremamente eterogenei, e tutti i trattamenti esistenti sono efficaci solo per numero limitato di pazienti in relazione ai diversi stati della malattia. La speranza alla base di queste ricerche è quella di stabilire uno strettissimo legame tra la diagnosi e la terapia in modo da ottenere protocolli terapeutici più specifici per i singoli pazienti in grado di offrire con maggiore probabilità una prognosi migliore.

### **Stato di sviluppo**

Recentemente, grazie alla loro biodegradabilità e biocompatibilità, le micro-nanosfere proteiche stanno ricevendo un crescente interesse nel campo dell'*imaging* con ultrasuoni e nel

settore del trasporto dei farmaci (*drug delivery*). Le microsfele sono considerate un versatile sistema di trasporto dei farmaci.

Nei nostri studi, in collaborazione con il gruppo della dott.ssa Francesca Cavalieri del Dipartimento di Scienze Chimiche e Tecnologiche dell'Università di Tor Vergata e della dott.ssa Gabriella Di Felice del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate del nostro Istituto, abbiamo iniziato a studiare il meccanismo di formazione delle microsfele ottenute da lisozima denaturato che, in base al trattamento agli ultrasuoni ad alta intensità, permette di ottenere microbolle riempite d'aria (MB) o, in presenza di perfluoroesano, microcapsule riempite di olio (MC) (19, 20).

In questo studio, le proprietà strutturali e funzionali delle MB e delle MC sono state valutate utilizzando il dicromismo circolare. La biodegradabilità è stata valutata usando la proteolisi con proteinasi K tramite una nuova tecnica che utilizza l'alta frequenza (355 kHz).

In tali studi, inoltre, è di fondamentale importanza assicurare sia la biocompatibilità sia l'efficienza di assorbimento del dispositivo da parte delle cellule bersaglio tumorali. Gli studi preliminari di biocompatibilità delle MB e delle MC sono stati condotti su una linea di adenocarcinoma mammario (SKBR3). In particolare, è stata valutata *in vitro* utilizzando il test di vitalità cellulare MTT. Questo test ci ha permesso di valutare l'alto grado di biocompatibilità di queste microsfele che non sono risultate tossiche. Sono stati eseguiti anche degli esperimenti per verificare l'internalizzazione delle MB-FITC e delle MC-FITC da parte delle cellule SKBR3, dopo 4 ore di trattamento mediante microscopia a fluorescenza. Le immagini ottenute hanno mostrato che entrambe le microsfele sono in grado di penetrare nelle cellule tumorali. Inoltre, le osservazioni hanno rivelato che le MB subiscono delle significative alterazioni della loro morfologia diversamente dalle MC che conservano intatte sia la forma (sferica) sia le dimensioni. A causa della loro superficie ampia, le MB e le MC potrebbero, una volta iniettate nell'organismo, entrare in contatto con le cellule del sistema immunitario provocando reazioni indesiderate. Attualmente sono in corso degli studi per comprendere gli effetti dell'interazione di queste microsfele con cellule dell'immunità innata. In particolare, si stanno eseguendo dei test per valutare la potenzialità da parte sia delle MB sia delle MC di indurre la maturazione di cellule dendritiche derivate dal midollo osseo murino (MBDC).

Il glioblastoma multiforme (GBM) è il tumore cerebrale più comune. Il trattamento corrente standard del glioblastoma è la chirurgia più la radioterapia: purtroppo la prognosi è infausta con un tasso di sopravvivenza di circa 12 mesi nel 30% dei pazienti e di 3 anni in meno del 3%. La grande evoluzione tecnologica degli strumenti diagnostici e il miglioramento delle tecniche chirurgiche hanno ridotto la mortalità perioperatoria dei pazienti affetti da GBM, ma la prognosi a medio termine rimane infausta. Numerosi dati sperimentali ottenuti *in vitro* e *in vivo*, come studi clinici di fase I/II, hanno evidenziato che le cellule di glioma accumulano preferenzialmente gli agenti fotosensibilizzanti. Questi dati hanno spinto ad utilizzare alcuni agenti fotosensibilizzanti sia per l'individuazione della massa tumorale, altrimenti difficilmente distinguibile (*Photo-Dynamic Detection*), sia nella terapia del glioma maligno (PDT, *Photo-Dynamic Therapy*). Il Temoporfin (Foscan®) è un agente fotosensibilizzante già impiegato per il trattamento fotodinamico delle neoplasie della testa e del collo. Per i tumori cerebrali è stato testato con successo nel ratto, nel coniglio e nell'uomo. L'impiego di nanocarriers, quali i liposomi di 100 nm, come vettori degli agenti fotosensibilizzanti potrebbe migliorarne la farmacocinetica e la farmacodinamica con conseguente aumento dell'indice terapeutico e limitazione del rischio di effetti collaterali.

Nello studio condotto in collaborazione con la dott.ssa Giovanna Mancini dell'Istituto di Metodologie chimiche del CNR di Roma, e il dott. Stefano Mannino dell'Università Cattolica del Sacro Cuore è stata effettuata la sperimentazione *in vitro* e *in vivo*, in cui ci siamo proposti i seguenti obiettivi:

- aumentare la capacità/specificità di *uptake* del Temoporfin (m-THPC) veicolando tale agente fotosensibilizzante in liposomi cationici;
- verificare se l'impiego di tali nanocarriers aumenta l'efficacia terapeutica della PDT;
- valutarne l'eventuale tossicità.

I risultati ottenuti *in vitro* mostrano come i liposomi impiegati sono in grado di trasferire il fotosensibilizzante nelle cellule di glioblastoma più efficacemente della formulazione farmacologica, con conseguente aumento dell'efficienza terapeutica (21, 22).

I dati *in vivo* sembrano confermare la mancanza di tossicità delle formulazioni liposomiali. Inoltre, l'analisi della biodistribuzione non ha evidenziato un accumulo significativo della clorina veicolata dai liposomi a carico degli organi sani. Viceversa si osserva un significativo aumento nel tessuto tumorale quando confrontato con il tessuto cerebrale sano. Tali risultati incoraggianti sembrano individuare nei liposomi impiegati un promettente sistema di *drug delivery* per la PDT del glioblastoma.

## Conclusioni e prospettive future

La somministrazione di farmaci tramite sistemi di rilascio del farmaco (*drug delivery*) permette di ottenere vantaggi rispetto alle terapie farmacologiche convenzionali. L'intero quantitativo di farmaco necessario per un certo periodo viene somministrato in una volta e viene rilasciato in modo controllato. Un altro vantaggio è la possibilità di indirizzare il rilascio del farmaco solamente in una specifica zona evitando il contatto potenzialmente nocivo tra il farmaco e organi non interessati. Alcuni polimeri controllano la velocità di rilascio del farmaco che avviene per diffusione rimanendo intatti; in altri casi oltre al meccanismo diffusivo il rilascio avviene per contemporanea disgregazione della matrice. Variando la composizione della matrice è possibile modificare anche la cinetica di rilascio adattandola alle differenti esigenze.

Tenendo conto di queste considerazioni stiamo programmando la nostra attività sperimentale futura con lo scopo di validare l'impiego delle MB e MC nella medicina teranostica. Allo scopo di modificare e migliorare le interazioni delle microsfele con le cellule tumorali sia dal punto di vista dell'adesione che della capacità di internalizzazione (*uptake*) verranno utilizzati diversi rivestimenti quali: lattosmina, destrano e doxorubicina. Le microsfele ingegnerizzate verranno impiegate per incapsulare farmaci di sintesi già impiegati in terapia che potrebbero essere veicolati verso la sede tumorale.

I risultati ottenuti *in vitro* nella terapia fotodinamica del glioblastoma mostrano come i liposomi impiegati trasferiscono il fotosensibilizzante più efficacemente della formulazione farmacologica, con conseguente aumento dell'efficienza terapeutica.

I dati preliminari *in vivo* sembrano confermare la mancanza di tossicità delle formulazioni liposomiali. Inoltre, l'analisi della biodistribuzione non ha evidenziato un accumulo significativo della clorina veicolata dai liposomi a carico degli organi sani. Viceversa si osserva un significativo aumento nel tessuto tumorale quando confrontato con il tessuto cerebrale sano. Tali risultati incoraggianti sembrano individuare nei liposomi impiegati in questo studio un promettente sistema di *drug delivery* per la PDT del glioblastoma.

## Bibliografia

1. García-Martínez Jm, Calcabrini A, González L, Martín-Forero E, Agulló-Ortuño Mt, Simon V, Watkin H, Anderson Sm, Roche S, Martín-Pérez J. A non-catalytic function of the Src family tyrosine kinases controls prolactin-induced Jak2 signaling. *Cell Signal* 2010;22:415-26.

2. Bozzuto G, Ruggieri P, Molinari A. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Ann Ist Super Sanita* 2010;46:66-80.
3. Colone M, Calcabrini A, Toccaceli L, Bozzuto G, Stringaro A, Gentile M, Cianfriglia M, Ciervo A, Caraglia M, Budillon A, Meo G, Arancia G and Molinari A. The multidrug transporter P-glycoprotein: a mediator of melanoma invasion? *J Invest Dermatol* 2008;128(4):957-71.
4. Grieco P, Franco R, Bozzuto G, Toccaceli L, Sgambato A, Marra M, Zappavigna S, Migaldi M, Rossi G, Striano S, Marra L, Gallo L, Cittadini A, Botti G, Novellino E, Molinari A, Budillon A, Caraglia M. Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. *J Cell Biochem* 2010;9999:1-13.
5. Carlini F, Ridolfi B, Molinari A, Parisi C, Bozzuto G, Toccaceli L, Formisano G, De Orsi D, Paradisi S, Grober Om, Ravo M, Weisz A, Arcieri R, Vella S, Gaudi S. The reverse transcription inhibitor abacavir shows anticancer activity in prostate cancer cell lines. *PLoS One* 2010;5:e14221.
6. Geraci A, Mondello F, Stringaro A. Sostanze naturali sotto la lente dell'Istituto Superiore di Sanità: attualità e prospettive. *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* 2009;22:11-5.
7. Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, Salvatore G, Mondello F, Arancia G, Molinari A. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the *in vitro* growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2004;122(2):349-60.
8. Giordani C, Molinari A, Toccaceli L, Calcabrini A, Stringaro A, Chistolini P, Arancia G, Diociaiuti M. Interaction of tea tree oil with model and cellular membranes. *J Med Chem* 2006;49(15):4581-8.
9. Bozzuto G, Colone M, Toccaceli L, Stringaro A, Molinari A. Tea tree oil might combat melanoma. *Planta Med* 2011;77:54-6.
10. Meschini S, Marra M, Calcabrini A, Federici E, Galeffi C and Arancia G. Voacamine, a bisindolic alkaloid from *Peschiera fuchsiaefolia*, enhances the cytotoxic effect of doxorubicin on multidrug-resistant tumor cells. *Int J Oncol* 2003;23:1505-13.
11. Meschini S, Marra M, Condello M, Calcabrini A, Federici E, Dupuis ML, Cianfriglia M and Arancia G. Voacamine, an alkaloid extracted from *Peschiera fuchsiaefolia*, inhibits P-glycoprotein action in multidrug-resistant tumor cells. *Int J Oncol* 2005;27:1597-03.
12. Meschini S, Condello M, Marra M, Formisano G, Federici E, Arancia G. Autophagy-mediated chemosensitizing effect of the plant alkaloid voacamine on multidrug resistant cells. *Toxicol In vitro* 2007;21:197-03.
13. Meschini S, Condello M, Calcabrini A, Marra M, Formisano G, Lista P, De Milito A, Federici E, Arancia G. The plant alkaloid voacamine induces apoptosis-independent autophagic cell death on both sensitive and multidrug resistant human osteosarcoma cells. *Autophagy* 2008;4:1020-33.
14. Meschini S, Condello M, Lista P, Arancia G. Regulators of autophagy as targets for novel strategies in anticancer therapies. *Curr Cancer Drug Targets* 2011;11:357-79.
15. Molinari A, Arancia G, Spugnini EP. Ultrastructural modifications induced by electroporation In: Enrico P. Spugnini and Alfonso Baldi (Ed.). *Electroporation in laboratory and clinical investigations*. Hauppauge NY, Nova Science Publishers, Inc.; 2010..
16. Agostinelli E, Belli F, Molinari A, Condello M, Palmigiani P, Vedova Ld, Marra M, Seiler N, Arancia G. Toxicity of enzymatic oxidation products of spermine to human melanoma cells (M14): sensitization by heat and MDL 72527. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:1040-50.
17. Agostinelli E, Tempera G, Molinari A, Salvi M, Battaglia V, Toninello A, Arancia G. The physiological role of biogenic amines redox reactions in mitochondria. New perspectives in cancer therapy. *Amino Acids* 2007;33(2):175-87.

18. Agostinelli E, Condello M, Molinari M, Tempera G, Viceconte N, Arancia G. Cytotoxicity of spermine oxidation products to multidrug resistant melanoma M14 ADR2 cells: sensitisation by the MDL 72527 lysosomotropic compound. *Int J Oncol* 2009;35:485-98.
19. Cavalieri F, Ashokkumar M, Grieser F, Caruso F Ultrasonic synthesis of stable, functional lysozyme microbubbles. *Langmuir* 2008;24(18):10078-83.
20. Zhou M, Leong TS, Melino S, Cavalieri F, Kentish S, Ashokkumar M. Sonochemical synthesis of liquid-encapsulated lysozyme microspheres. *Ultrason Sonochem* 2010;17(2):333-7.
21. Molinari A, Bombelli C, Mannino S, Stringaro A, Toccaceli L, Calcabrini A, Colone M, Mangiola A, Maira G, Luciani P, Mancini G, Arancia G. m-THPC-mediated photodynamic therapy of malignant gliomas: assessment of a new transfection strategy. *Int J Cancer* 2007;121:1149-55.
22. Bombelli C, Stringaro A, Borocci S, Bozzuto G, Colone M, Giansanti L, Sgambato R, Toccaceli L, Mancini G, Molinari A. Efficiency of Liposomes in the Delivery of a Photosensitizer Controlled by the Stereochemistry of a Gemini Surfactant Component. *Mol Pharmac* 2010;7:130-7.