

stato prelevato, diviso longitudinalmente e ½ congelato in azoto, ½ fissato in formalina.

I campioni ottenuti sono stati analizzati per evidenziare la comparsa del tumore, che è risultato presente in tutti gli animali osservati a partire da 2 settimane dalla sospensione del trattamento.

Nelle sezioni istologiche si è evidenziato che la progressione del tumore iniziava come focolaio tumorale nella sottomucosa fino a raggiungere una maggiore infiltrazione del tessuti mucoso, con zone di iperplasia associate al tumore o a formazioni polipoidi, a seconda della zona osservata.

La colorazione immunoistochimica eseguita utilizzando un anticorpo policlonale che in nostri precedenti studi si era dimostrato specifico per questo tumore, ha evidenziato una netta positività delle cellule tumorali, in tutti gli stadi di differenziamento.

Gli stessi campioni di materiale, mantenuto congelato, sono al momento allo studio per mettere a punto, mediante tecnica di microdissezione laser con impiego di un BioRobot, un sistema automatico per la purificazione degli acidi nucleici da estrarre dalle lesioni tumorali.

2. Dimostrare che il controllo della risposta flogistica rallenta la comparsa di metastasi epatiche in un modello animale di adenocarcinoma coloretale del colon.

Cellule della linea DHD/K12, originariamente ottenute da adenocarcinoma di colon indotto in ratto singenico del ceppo BDIX, mediante trattamento con 1,2 dimetilidrazina-2HCl sono state inoculate nella vena splenica di ratti maschi del ceppo BDIX di 6-7 settimane.

Gli animali sono stati suddivisi in gruppi riceventi quantitativi di cellule diversi (da 2 a 12×10^6 cellule). Al momento dell'inoculazione la milza è stata rimossa per evitare l'attecchimento del tumore nella sede di inoculo.

Tutti gli animali inoculati con il maggiore quantitativo di cellule (12×10^6) hanno sviluppato metastasi epatiche a partire da 14 gg dall'inoculo. Gli animali degli altri gruppi hanno egualmente sviluppato metastasi, ma in tempi successivi.

Lo studio preliminare di induzione della comparsa delle metastasi epatiche, in funzione della quantità delle cellule inoculate, ci ha permesso di individuare un protocollo sperimentale da utilizzare per lo studio di molecole, dotate di meccanismi di azione diversi, sempre rivolti ad inibire la risposta infiammatoria correlata alla progressione neoplastica.

Al momento sono in corso prove preliminari per stabilire la migliore via di somministrazione delle molecole Cyanidin-3-O- β -glucopyranoside (C-3-G) e CR3294 ai ratti del ceppo BD-IX.

Sottoprogetto V

U.O. 13: Regolazione del turnover di Bcl-2 RNA mediante RNA antisenso

Responsabile Scientifico: A. Nicolin

Lo studio si è sviluppato in 3 attività principali.

Attività 1: Espressione di RNA antisenso complementare a bcl-2 mRNA

1.1) Analisi in silico

Gli studi computazionali sono stati completati. In particolare, il software AntiHunter si è dimostrato uno strumento efficace per l'identificazione *in silico* di trascritti antisenso. Dopo estesa analisi del database delle EST sono state identificate, nell'ambito del gene *bcl-2*, alcune sequenze che rappresentano potenziali trascritti in orientamento antisenso. I dati acquisiti sono a disposizione e costituiscono la base per successive ricerche.

1.2) Modified strand-specific RT-PCR (Tag-PCR).

Sono stati utilizzati due diversi approcci allo scopo di realizzare una RT-PCR filamento-specifica. Il primo si basa sull'utilizzo di una retrotrascrittasi termostabile che, permettendo un *priming* ad alta temperatura durante la sintesi del cDNA consentirebbe di evitare o comunque ridurre gli appaiamenti aspecifici. Il secondo approccio che in parallelo abbiamo sviluppato si basa sull'uso di un primer contenente in 5' una sequenza Tag (20-mer) durante la sintesi del cDNA (tagged RT-PCR). Sono finora stati condotti gli esperimenti preliminari su trascritti sintetici di sequenza ed orientamento noto per determinare la specificità e la sensibilità delle due diverse metodologie

1.3) Quantitative Real Time PCR of the *bcl-2* and *IgH* loci

L'espressione di RNA in antisenso nel tumour follicolare B è iniziata con la messa a punto del dosaggio di RNA di *bcl2* con lo strumento Taqman. I risultati ottenuti hanno dimostrato l'affidabilità del metodo in termini di sensibilità e riproducibilità.

Attività 2) Meccanismi molecolari del turnover di *bcl-2* RNA

2.1) Ruolo della proteina BCL2

Lo studio è iniziato analizzando la specificità di regolazione da parte della proteina BCL2. E' stato dimostrato che la proteina è in grado di interagire esclusivamente con le sequenze regolatorie ARE del gene rilevante.

2.2) Studio di ARE-BP

E' stato precedentemente dimostrato che la regione 3'UTR del mRNA di *bcl-2* interagisce con diverse ARE binding proteins (AUBPs). Utilizzando il sistema dei tre ibridi è stata individuata una nuova proteina umana che interagisce con l'ARE di *bcl-2* denominata TINO (Donnini et al., 2004). Dati preliminari evidenziano che il legame di TINO all'ARE di *bcl-2* svolge un'azione regolatoria negativa sui livelli post-trascrizionali di *bcl-2*. Esperimenti in corso sono volti a mettere a punto le condizioni sperimentali idonee per l'analisi mediante elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa di altre proteine regolatorie in grado di interagire con l'ARE di *bcl-2*.

2.3) Knock-down di proteine regolatorie

Sono stati disegnati siRNA compatibili per agire su mRNA di Tino, la proteina identificata recentemente dal ns gruppo. Son anche in corso studi per valutare le migliori condizioni di veicolazione degli siRNA.

Attività 3) Regolazione del turnover di *bcl2*-RNA con mezzi esogeni

3.1) Oligoribonucleotidi antisenso

Sono stati disegnati e preparati 3 oligoribonucleotidi complementari (α ORN) ad ARE di *bcl2*, modificati in 2'orto-metil, per renderli stabili alla degradazione biologica. Sono stati utilizzati in un modello in vitro di degradazione di RNA. In questo sistema gli α ORN hanno rivelato una capacità

di stabilizzare l'RNA di bcl2. Non sono ancora stati caratterizzati alcuni parametri, come la curva dose-risposta, la specificità su sequenze ARE.

3.2) *Oligoribonucleotidi senso*

Sono stati disegnati e preparati 3 oligoribonucleotidi in orientamento senso (sORN) rispetto alla regione ARE dell'RNA di bcl2, modificati in 2'orto-metil, per renderli stabili alla degradazione biologica. Sono stati condotti i primi saggi in vitro. Gli sORN hanno dimostrato attività stabilizzante.

3.3) *Terapie combinate*

Gli studi di attività antitumorale in combinazione con farmaci citotossici sarà svolta nella parte terminale del progetto.

Pubblicazioni:

1. Donnini M, Lapucci A, Papucci L, Witort E, Jacquier A, Brewer G, Nicolin A, Capaccioli S, Schiamone N. Identification of TINO: a new evolutionarily conserved BCL-2 AU-rich element RNA-binding protein. *J Biol Chem* 2:20154-20166, 2004.
2. Asnaghi L, Calastretti A, Bevilacqua A, D'Agnano I, Gatti G, Canti G, Delia D, Capaccioli S, Nicolin A. Bcl-2 phosphorylation and apoptosis activated by damaged microtubules require mTOR and are regulated by Akt. *Oncogene*. 2004 Jul 29;23(34):5781-91.
3. Schiavone N, Donnini M, Nicolin A, Capaccioli S. Antisense oligonucleotide drug design. *Curr Pharm Des*. 2004;10(7):769-84.

Sottoprogetto VI

U.O. 14: Sviluppo di nuove terapie antitumorali basate sui farmaci anti-retrovirali inibitori della proteasi di HIV e inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa, da soli o combinati: studi preclinici in vitro ed in vivo

Responsabile Scientifico: Barbara Ensoli

I nostri studi indicano che gli HIV-PI bloccano l'angiogenesi e lo sviluppo di tumori in modelli preclinici, quali lesioni angiogeniche, KS ed altri tipi di tumori promossi in topi nudi rispettivamente dall'inoculo di fattori angiogenici, cellule KS umane primarie o linee di tumori umani. Questi effetti si osservano a concentrazioni di HIV-PI paragonabili a quelle presenti nel plasma di pazienti trattati, e sono dovuti alla capacità di questi farmaci di inibire l'attivazione proteolitica della metalloproteasi-2, un enzima chiave nell'angiogenesi e nella crescita ed invasione tumorale (Sgadari C et al, 2002; Sgadari C et al, 2003, Toschi E et al, 2002; Monini P et al, 2003; e dati non pubblicati). Gli NNTRI antagonizzano la genesi e la progressione tumorale sia *in vitro* che *in vivo* attraverso tre vie: a) riducendo la proliferazione; b) promuovendo il differenziamento e c) riprogrammando l'espressione genica (Mangiacasale R et al, 2003; Sciamanna et al, Submitted).

Poiché l'angiogenesi, così come la proliferazione e l'invasione delle cellule tumorali, l'attività proteolitica delle MMP, l'alterazione dell'espressione genica sono eventi chiave per lo sviluppo di tutti i tumori, l'obiettivo del presente progetto è di identificare e meglio chiarire i meccanismi di azione

antiangiogenici e/o antitumorali degli HIV-PI e degli NNRTI e valutare se hanno un effetto sinergico sia in studi in vivo che in vitro.

Questa U.O. si è quindi occupata della validazione degli effetti anti-angiogenici ed anti-tumorali degli HIV-PI in modelli animali, con risultati sinora assai incoraggianti.

U.O. 15: Sviluppo di nuove terapie antitumorali basate sui farmaci anti-retrovirali inibitori della proteasi di HIV e inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa, da soli o combinati: studi preclinici in vitro ed in vivo

Responsabile Scientifico: Paola Sinibaldi-Vallebona

Obiettivo 1: Valutazione degli effetti degli HIV-PI e/o NNRTI, da soli od in associazione, sulla proliferazione, citotossicità, differenziamento ed espressione genica in vitro di linee tumorali di vario tipo (topo e ratto).

Nella prima fase dello studio è stato testato *in vitro* l'effetto di efavirenz (a dosi comprese tra 5 e 15 μ M) e di indinavir (tra 0.1 e 10 μ M) sulla crescita di cellule di carcinoma polmonare di Lewis (3LL) e di adenocarcinoma coloretale di ratto (DHD/K12).

Le cellule della linea 3LL sono state seminate alla concentrazione di 50.000/ml in piastre da 6 wells (2ml/well) al giorno 0, in duplicato. Il giorno 1 sono stati effettuati i trattamenti con i farmaci in un volume di 20 μ l/wells. I controlli ricevevano pari volume di terreno di coltura (CC) oppure pari volume di diluente del farmaco (C-DMSO). Le conte cellulari venivano eseguite al microscopio quotidianamente a partire dal giorno 2 fino al giorno 4, usando la colorazione vitale con trypan blue.

I risultati preliminari hanno evidenziato che:

Efavirenz (trattamento singolo) inibisce significativamente la crescita cellulare in modo dose-dipendente. L'effetto di inibizione non è associato a fenomeni di morte o ridotta vitalità cellulare e si mantiene anche a tre giorni dalla sospensione del trattamento.

Efavirenz (1 tratt./die per 3 giorni consecutivi) inibisce marcatamente la crescita cellulare in modo dose-dipendente. L'effetto di inibizione è maggiore di quello osservato nel trattamento singolo, ma ugualmente non risulta associato a fenomeni di morte o ridotta vitalità.

A seguito del trattamento con efavirenz non si assiste a modificazioni della morfologia cellulare apprezzabili al microscopio, se non ad un lieve aumento delle dimensioni di una sottopopolazione cellulare; si evidenzia tuttavia una tendenza da parte di queste cellule, che di regola pur formando un monostrato abbastanza regolare tendono a formare clumps isolati, a fare meno clumps. Questi effetti meritano di essere meglio indagati (studio del ciclo cellulare e di eventuali fenomeni di apoptosi).

Indinavir (trattamento singolo) mostra, 24h dopo il trattamento, un lieve effetto di inibizione della crescita alla massima dose usata. L'effetto viene perso nei giorni successivi, ove si assiste alla normale ripresa della crescita cellulare.

Indinavir (1 tratt./die per 3 giorni consecutivi) Non si osserva miglioramento rispetto a quanto riferito per il trattamento singolo, anzi alcune dosi sembrano favorire, a tempi tardivi, un lieve aumento di proliferazione cellulare, che tuttavia non è statisticamente significativo.

Nessuna osservazione riguardo alla morfologia cellulare.

Studi di combinazione dei due farmaci sono al momento in corso

Relativamente alla linea DHD/K12 le cellule sono state seminate alla concentrazione di 25.000/ml in piastre da 24 wells (1ml/well) al giorno 0, in duplicato. Il giorno 1 sono stati effettuati i trattamenti con i farmaci in un volume di 20 µl/wells. I controlli sono stati aggiunti di un pari volume di terreno di coltura (CC) oppure di un pari volume di diluente del farmaco (C-DMSO). Le conte cellulari sono state eseguite al microscopio ottico quotidianamente a partire dal giorno 2 fino al giorno 4, usando la colorazione vitale con trypan blue.

I risultati preliminari indicano che:

Efavirenz (1 tratt./die per 3 giorni consecutivi) inibisce marcatamente la crescita cellulare in modo dose e tempo-dipendente. L'effetto di inibizione risulta maggiore in corrispondenza della minore densità cellulare e comunque correlato alle sottopopolazioni cellulari costituenti la linea. Ulteriori studi sono in corso per meglio definire queste osservazioni preliminari.

A seguito del trattamento con efavirenz non si evidenzia alcuna modificazione della morfologia cellulare, se non un lieve aumento delle dimensioni delle singole cellule ed un diverso contatto cellula-cellula (al momento ancora in fase di osservazione).

Indinavir (1 tratt./die per 3 giorni consecutivi) non induce alcun effetto di inibizione della crescita cellulare a nessuna delle dosi testate ed anzi, in corrispondenza dei tempi di più lunga esposizione, determina un incremento non significativo della proliferazione.

Il trattamento con indinavir non sembra indurre alcuna modificazione morfologica delle cellule.

Obiettivo 2: Valutazione degli effetti antitumorali in vivo degli HIV-PI ed NNRTI, usati da soli o in associazione, in un modello di tumore sperimentale indotto nel topo dall'inoculazione di linee tumorali murine di carcinoma polmonare di Lewis.

Sulla base dei risultati ottenuti *in vitro*, relativamente alla linea cellulare 3LL, abbiamo intrapreso uno studio per stabilire se gli inibitori della RT (efavirenz) e gli inibitori delle proteasi (indinavir), usati da soli o in combinazione, siano in grado di esercitare una azione anti-tumorale significativa, se somministrati a topi già portatori di tumore.

A tal fine abbiamo effettuato il seguente esperimento pilota:

Topi maschi C57Bl/6 di 18-20 g (Charles River, Calco, Como) sono stati inoculati s.c. nella regione del fianco dx con 250.000 cellule di carcinoma polmonare di Lewis (LLC) in un volume di 0.1ml di soluzione fisiologica al giorno 0.

Al giorno 7 gli animali sono stati esaminati, mediante palpazione nella zona di inoculo, per verificare la crescita del tumore. Sono stati quindi selezionati

soltanto gli animali che presentavano tumori con diametro simile (2-3 mm). Questi (N° 28) venivano quindi divisi in 4 gruppi sperimentali di 7 animali ciascuno: 1) Gruppo di controllo; 2) Trattati con Efavirenz (0,2 mg/die/topo); 3) Trattati con Indinavir (1,36 mg/die/topo); 4) Trattati con Efavirenz ed Indinavir.

I farmaci ed il diluente di controllo venivano preparati secondo lo schema seguente e somministrati agli animali, mediante gavage intragastrico, quotidianamente a partire dal giorno 7.

Efavirenz (Bristol-Myers Squibb)

La dose giornaliera somministrata per gavage intragastrico era di 0,2 mg/die/topo (pari a 10 mg/kg/die), in 0.2 ml di H₂O (la dose giornaliera utilizzata nei pazienti HIV+ è di 600 mg/die ovvero 8,5 mg/Kg/die)

0,2 mg di efavirenz corrispondono a 0,5 mg di polvere Sustiva presa dalla capsula (il più sterilmente possibile), che messi in 0.2 ml di H₂O corrispondono ad una soluzione 2,5 mg/ml.

Peso della capsula= 500 mg per 200 mg di efavirenz
 $500 \text{ mg EFV capsula} / 200 \text{ mg EFV} = x \text{ mg capsula} / 0,2 \text{ mg EFV}$
 $x = 500 \times 0,2 / 200 = 0,5 \text{ mg capsula EFV/topo/die}$

La sospensione è sempre stata preparata al momento dell'uso in condizioni di sterilità.

Poiché l'efavirenz è insolubile in soluzione acquosa (quella che si ottiene è una sospensione) deve sempre essere accuratamente miscelato prima di ogni somministrazione.

Indinavir (Crixivan-Merck)

La dose giornaliera somministrata per gavage intragastrico è di 1.36 mg/die/topo (70 mg/kg/die), in 0.4 ml di soluzione salina, corrispondente al doppio della dose giornaliera utilizzata nei pazienti HIV+ (2400 mg/die).

1.36 mg di indinavir corrispondono a 2.26 mg di polvere presa dalla capsula (il più sterilmente possibile), che messi in 0.4 ml di salina corrispondono ad una soluzione 5.65 mg/ml.

Peso della capsula = 657 mg per 400 mg di indinavir
 $657 \text{ mg IND capsula} / 400 \text{ mg IND} = x \text{ mg capsula} / 1.36 \text{ mg IND}$
 $x = 657 \times 1.36 / 400 = 2.23 \text{ mg capsula IND/topo/die}$

In genere viene preparata la soluzione che ci serve per un'intera settimana in tubo falcon sterile, conservandola al buio a 4°C; al termine della settimana l'avanzo viene scartato e la soluzione ripreparata.

Negli animali compresi nello studio sono stati registrati i seguenti parametri: crescita tumorale, peso corporeo e sopravvivenza.

L'esperimento è ancora in corso ed i risultati definitivi non ancora disponibili.

U.O. 16: Sviluppo di nuove terapie antitumorali basate sui farmaci anti-retrovirali inibitori della proteasi di HIV e inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa, da soli o combinati: studi preclinici in vitro ed in vivo

Responsabile Scientifico: Corrado Spadafora

Obiettivi di questa UO

- Chiarire il meccanismo di azione degli NNRT e caratterizzare il (i) substrato (i) RT bersaglio
- Definire il ruolo dell'RT endogena nei processi di proliferazione e differenziamento cellulare e nella genesi e progressione tumorale
- Identificare e meglio chiarire i meccanismi di azione antitumorali degli HIV-PI e degli NNRTI e valutare se hanno un effetto sinergico sia in studi in vivo che in vitro.

Primo obiettivo

Il nostro primo obiettivo è la caratterizzazione del ruolo della trascrittasi inversa endogena (RT) nella genesi e progressione tumorale e gli effetti della sua inibizione sulla crescita tumorale *in vitro* ed *in vivo*. Per questo studio abbiamo utilizzato come modelli sperimentali linee cellulari umane di melanoma (A-375) e carcinoma prostatico (PC3). L'esposizione di queste cellule ad inibitori farmacologici dell'RT (nevirapina ed efavirenz), causa un drastico rallentamento della proliferazione e l'induzione di un processo differenziativo caratterizzato da cambiamenti morfologici e dalla comparsa di specifici marcatori. In concomitanza, viene indotta un'ampia riprogrammazione dell'espressione genica. Queste caratteristiche sono stabilmente mantenute finché le cellule sono sotto l'azione dei farmaci; la rimozione degli inibitori di RT determina il ritorno delle cellule alle loro condizioni originali, ossia quelle pre-trattamento. La caratteristica della reversibilità suggerisce la natura epigenetica del fenomeno.

Lo studio *in vivo* è stato effettuato inoculando cellule tumorali umane in topi nudi e quindi trattando i topi con efavirenz. Le linee tumorali utilizzate come modello sono: H69 (microcitoma), A-375 (melanoma), HT29 (colon carcinoma) e PC3 (carcinoma prostatico).

Come osservato *in vitro*, anche *in vivo* il trattamento degli animali con efavirenz rallenta, o blocca del tutto, la crescita dei quattro tumori quando paragonati ad animali di controllo inoculati ma non trattati con l'inibitore di RT.

Questi risultati suggeriscono che l'RT endogeno è un nuovo potenziale target nella terapia antitumorale. Un manoscritto che è attualmente sotto revisione da una rivista internazionale con peer review (1):

1) Ilaria Sciamanna, Matteo Landriscina, Carmine Pittoggi, Michela Quirino, Cristina Mearelli, Rosanna Beraldi, Elisabetta Mattei, Annalucia Serafino, Alessandra Cassano, Paola Sinibaldi-Vallebona, Enrico Garaci, Carlo Barone and Corrado Spadafora. "Inhibition of Endogenous Reverse Transcriptase Antagonizes Human Tumor Growth" Submitted, 2004

Secondo obiettivo

In collaborazione col gruppo di Barbara Ensoli, abbiamo intrapreso uno studio per stabilire se gli inibitori della RT (efavirenz, nevirapina) e gli inibitori delle proteasi (indinavir) possano esercitare una sinergica e potenziata azione antitumorale se adoperati in combinazione. La sperimentazione è prevista sia *in vitro*, su linee cellulari A-375 e PC3, che *in vivo* su modelli animali.

I risultati ottenuti fino ad ora suggeriscono che:

1. L'indinavir da solo ha una scarsa, o nulla, capacità antiproliferativa, testata in un range di concentrazioni che va da 0.1 a 20 micromolare.

2. Indinavir (10 micromolare) in combinazione con efavirenz (15 micromolare) hanno una riproducibile azione sinergica riducendo la proliferazione delle A-375 dal 60% (solo efavirenz) a circa 70% (indinavir+efavirenz) e delle PC3 dal 40% (solo efavirenz) al 55% (indinavir + efavirenz). In tutte le combinazioni testate non si apprezza aumento di morte cellulare né per apoptosi né per necrosi.

3. Nessun effetto sinergico sulla proliferazione è al momento riscontrato nella combinazione indinavir+nevirapina: la nevirapina da sola riduce il rate di proliferazione di circa il 70% che rimane sostanzialmente invariato quando le cellule sono esposte alla combinazione dei due farmaci.

Gli studi finalizzati a valutare la motilità ed invasività delle linee tumorali esposte alle combinazioni degli inibitori sono attualmente in corso ed i risultati non sono ancora disponibili. Si prevede che gli studi *in vivo* inizieranno verso la fine del corrente mese di novembre.