

Ai miei genitori

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

A Fully Human Anti-tumor ImmunoRNase Selective for ErbB2-positive Carcinomas.

De Lorenzo C., Arciello A., Cozzolino R., Palmer D.P., Laccetti P., Piccoli R., and D'Alessio G.

Cancer Research 64, 4870-4874, 2004.

A human, compact, fully functional anti-ErbB2 antibody as a novel antitumor agent.

De Lorenzo C., Tedesco A., Terrazzano G., Cozzolino R., Laccetti P., Piccoli R., and D'Alessio G.

British Journal of Cancer 91, 1200-1204, 2004.

Influence of conformational flexibility on biological activity in cyclic astin analogues.

Saviano G., Benedetti E., Cozzolino R., De Capua A., Laccetti P., Palladino P., Zanotti G., Amodeo P., Tancredi T., Rossi F.

Biopolymers 76(6), 477-484, 2004.

Antineoplastic cyclic astin analogues kill tumor cells via caspase-mediated induction of apoptosis.

Cozzolino R., Palladino P., Rossi F., Cali G., Benedetti E., Laccetti P.

Carcinogenesis. 26(4), 733-739, 2005.

Experimental Study On In Vivo Optical And Radionuclide Imaging In Small Animals.

Autiero M., Celentano L., Cozzolino R., Laccetti P., Marotta M., Mettivier G., M.C. Montesi M.C., Riccio P., Roberti G., Russo P.

IEEE Trans. Nucl. Sc. 52, 205-209, 2005.

Biological properties of a human compact anti-ErbB2 antibody.

De Lorenzo C., Cozzolino R., Carpentieri A., Pucci P., Laccetti P., D'Alessio G.

Carcinogenesis 26 (11):1890-1895, 2005.

ABBREVIAZIONI

ADCC	Citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente
AEA	Anandamide
AFC	7-amino-4-trifluoromethyl-coumarin
BSA	Albumina di siero bovino
CB1	Cannabinoid receptor type 1
CCD	Charged coupled device
CDC	Citotossicità dipendente dal complemento
CDK	ciclina dipendenti chinasi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfossido
DTT	Ditiotreitolo
EDN	Eosinophil-derived neurotoxin
EDTA	Acido etildiamminotetracetico
ELISA	Enzyme linked immuno adsorbent assay
ErbhcAb	Erbicin-derived human compact antibody
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluorescentisothiocyanate
FBS	Fetal bovine serum
GFP	Green fluorescent protein
HAMA	Human anti-mouse antibody response
HOECHST	2'(4Hydroxyphenil) 5-(4-methyl-1-piperazynil)-2,5'- bi (1H-benzimidazol)-6-(1- methyl-4-piperazynil)- benzimidazole trihydrochloride
MDR	Multi drug resistance

Met-F-AEA	2-Metil-arachidonil-2'-Fluoro-etilamide
MTT	(3-[4,5-dimethyliazol-z-yl] 2,5-diphenyltetrazolium bromide (tiazolyl blue))
PBS	Phosphate buffer saline
PI	Propidium iodide
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
scFv	single chain variable fragment
SDS	Sodiododecilsolfato
SDS-page	Elettroforesi su gel di poliacrilammide
SR141716A	N-(piperidino-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-pyrazole-3-carboxamide)
TCA	Acido tricloroacetico
THC	Tetraidrocannabinolo
Z-DEVD-FMK	Z-Asp-(OMe)-Glu-(OMe)-Val-Asp(OMe)-fluoromethylketone
Z-IETD-FMK	Z-Ile-Glu-Thr-Asp(OMe)-fluoromethylketone
Z-LEHD-FMK	Z-Leu-Glu-(OMe)-Asp(OMe)-fluoromethylketone
Z-VAD-FMK	Z-Val-Asp(OMe)-fluoromethylketone

SUMMARY

The development and the progression of the malignant tumours have been the centre of intense interest and research for several decades. The studies are focused on the increased cellular proliferation. In the recent years, an object of interest is the cellular programmed death. The pathways that determine the cellular death of the cells are distinguished and very recognizable. The aspects and the mechanisms of regulation of so-called "cellular programmed death" or apoptosis can be distinguished from a more expressed event, the necrosis. It is well documented that the main scope of the antitumoural chemotherapy is to block the cellular proliferation, also promoting the accelerated apoptosis. From some years always greater attention is focused on the development of antitumoural drugs that act through the activation of the apoptosis. In fact, the the neoplastic cells die as a result of the activation of a series of signals that then induce the apoptotic pathway. It also reported that the defects of the activation of this phenomenon are been involved in the neoplastic proliferation. In the last decade, the basic research of base has produced detailed informations on the patogenetic, biochemical, molecular mechanisms of the proliferation, the differentiation and DNA's repair of cells. It has been observed that alterations of these mechanisms, to several levels, are responsible of rebelling and the progression of the malignant tumours.

The scope of my research work has been focused on the determination of the molecular mechanisms of new potential chemiotherapeutic compounds by using *in vitro* and *in vivo* systems.

My attention has been focused on:

- The study of a new class of cyclic peptide that is an analogue of the natural astins
- The characterization *in vitro* of the effects of 2-metil-arachidonil-2'fluoro-etilamide (Met-F-AEA), a metabolically stable that is an analogue of anandammide
- Anti-ErbB2 immunoagents
- The study of an optical and radioisotopic system of imaging to determine a premature detection of tumours and of the metastases on animal model.

SOMMARIO

L'insorgenza e la progressione dei tumori maligni è oggetto di studio da molti anni, inizialmente la maggior parte degli studi ha posto l'attenzione sull'aumentata proliferazione cellulare. Successivamente, si è iniziato ad approfondire il rapporto esistente fra proliferazione e morte cellulare. Le vie che determinano la morte delle cellule sono distinte e ben riconoscibili; in particolare si possono distinguere gli aspetti e i meccanismi di regolazione della cosiddetta "morte cellulare programmata" o apoptosi da quelli che caratterizzano un evento più rapido, la necrosi. Com'è noto, il principale scopo della chemioterapia antitumorale è quello di bloccare selettivamente la proliferazione cellulare anche promuovendo l'accelerata apoptosi.

Da alcuni anni quindi sempre maggiore attenzione è stata posta allo sviluppo di farmaci antitumorali che agiscano attraverso l'attivazione del fenomeno apoptotico, infatti, la maggior parte delle cellule neoplastiche muoiono in seguito all'attivazione di una serie di segnali che attivano la via apoptotica e che difetti dell'attivazione di tale fenomeno sono coinvolti nella proliferazione neoplastica. La ricerca scientifica di base ha fornito, nell'ultimo decennio, dettagliate informazioni sui meccanismi patogenetici, molecolari e biochimici responsabili della proliferazione, del differenziamento e dei processi di riparazione del DNA delle cellule ed è stato osservato che, alterazioni di tali meccanismi, a vari livelli, sono responsabili dell'insorgere e della progressione dei tumori maligni.

Lo scopo del mio lavoro di tesi ha avuto come obiettivo la determinazione dei meccanismi d'azione di nuove sostanze ad attività antitumorale, che presentano diversa origine, attraverso l'utilizzo di sistemi *in vitro* ed *in vivo*.

In particolare la ricerca ha riguardato:

- Lo studio di una nuova classe di peptidi ciclici analoghi delle astine naturali
- La caratterizzazione *in vitro* degli effetti della 2-metil-arachidonil-2'-fluoroetilamide (Met-F-AEA), un analogo metabolicamente stabile dell'anandamide
- Immunoagenti diretti contro il recettore tirosin-chinasico ErbB2
- La messa a punto di un sistema di imaging ottico e radioisotopico per la rivelazione precoce di tumori e delle metastasi *in vivo*.

SEZIONE I

Astine: una nuova classe di farmaci antitumorali

INTRODUZIONE

Alcuni anni fa il gruppo diretto dal Prof. Morita mise in evidenza l'azione antitumorale *in vitro* ed *in vivo* di una nuova classe di sostanze denominate astine. Le astine, membri di una famiglia di ciclopeptidi isolati dalle radici della pianta medicinale *Aster Tataricus* (Compositae), sono caratterizzate da un anello a 16 componenti contenenti residui amminoacidici non codificati ed un unico residuo di prolina β,γ -diclorurato [Pro(Cl₂)] (1). I membri naturali della famiglia delle astine attualmente conosciuti sono indicati con le lettere dell'alfabeto da A a J. Una caratteristica comune per tutte le strutture delle astine è la presenza di un legame peptidico *in cis* tra Abu⁵ e Pro¹ (1).

L'attività antineoplastica delle varie astine d'origine naturale è stata analizzata dal Prof. Morita e collaboratori, utilizzando *in vitro* una linea cellulare derivata da un carcinoma nasofaringeo ed *in vivo* inoculando in topi da laboratorio le cellule derivanti dal sarcoma 180A e dalla leucemia P338. E' riportato che le astine cicliche naturali A e B presentavano un'attività antitumorale 100 volte maggiore rispetto alle altre astine, mentre le astine lineari e prive del residuo [Pro(Cl₂)] non mostravano alcuna attività antitumorale (2). Tali osservazioni hanno indotto a pensare che la struttura ciclica delle astine giochi un ruolo fondamentale nella loro attività antitumorale e principalmente che il residuo di prolina diclorurata potesse essere la causa dell'azione antineoplastica delle astine (3).

Partendo da tali studi, il gruppo dei Prof. Benedetti e Rossi ha pensato di sintetizzare, per poter evidenziare quale struttura potesse svolgere meglio un'attività antineoplastica, dei ciclopeptidi simili alle astine naturali ma che differissero da questi per la presenza di amminoacidi non proteinogenici che avessero un legame peptidico "surrogato", costituito dal residuo SO₂-NH piuttosto che dal gruppo CO₂-

NH. Lo scopo era anche quello di verificare se ci fosse una correlazione tra attività biologica e flessibilità conformazionale di tali peptidi. Inizialmente sono state sintetizzate astine che teoricamente dovessero presentare una migliore flessibilità conformazionale e che avevano queste caratteristiche:

astina 1: c[-Pro-Thr-Aib- β^2 -Phe-Abu],

astina 2: c[-Pro-Thr-Aib- β^3 Hphe-Abu],

astina 3: c[-Pro-Abu-Ser- β^3 -Hphe ψ (CH₂-SO₂-NH)-Abu],

astina 4: c[- Pro-Thr-Aib- β^3 -Hphe ψ (CH₂-SO₂-NH)-Abu] (4)

I peptici 3 e 4, nei quali il carbonile del legame peptidico-Hphe-Abu è stato sostituito con un gruppo SO₂, mostrano un notevole incremento nella flessibilità dello scheletro e danno luogo a due famiglie d'isomeri caratterizzati da un gruppo 60:40 *cis-trans* nel legame peptidico tra Abu⁵ e Pro¹ (4). La figura 1 mostra la struttura dell'astina naturale B e dell'astina neosintetizzata 3.

Per valutare se i presupposti teorici avessero un riscontro reale, si è pensato di analizzare l'effetto antitumorale dei nuovi composti ciclici sintetizzati paragonandoli a quello delle astine naturali. Sono state utilizzate linee cellulari ottenute da tumori umani aventi differente origine e diverso grado di malignità. I dati ottenuti indicanti l'azione citotossica di alcune delle astine neosintetizzate ci hanno indotto, quindi, a cominciare a studiare, per la prima volta, il loro meccanismo d'azione.

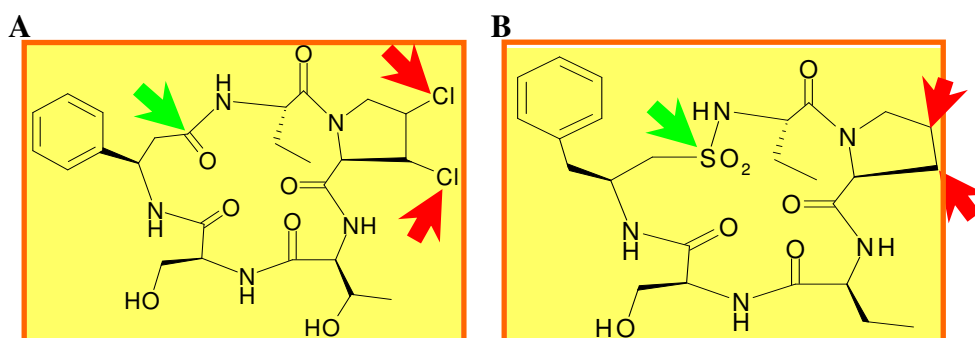


Figura 2: Comparazione tra la struttura della Astina B e Astina 3.

Nel pannello A è rappresentata la struttura della Astina ciclica naturale B caratterizzata dalla presenza del legame peptidico (indicato dalla freccia verde) e dai due atomi di cloro sul residuo di prolina (indicati dalla freccia rossa). Nel pannello B è rappresentata la struttura della Astina ciclica sintetica 3 caratterizzata dalla presenza del legame peptidico “surrogato” (indicato dalla freccia verde) e dai due atomi di idrogeno sul residuo di prolina (indicati dalla freccia rossa).

MATERIALI E METODI

1. Reagenti

I terreni di coltura RPMI e DMEM, gli antibiotici (penicillina, streptomina) e gli aminoacidi (L-glutamina) sono stati forniti dalla Life Technologies (Ponsley, UK). L'FBS è stato acquistato dalla Hyclone Lab (Logan, UT). Il Trypan blue è stato fornito dalla Flow Laboratories (Irvine, Scotland). L'MTT, l'Hoechst 33342 e l'etoposide sono stati acquistati dalla Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). I kits per il saggio delle caspasi 3 e 8 sono stati forniti dalla Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Il kit per il saggio della caspasi 9, il controllo negativo FMK e gli inibitori Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK, Z-DEVD-FMK sono stati acquistati dalla Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Il Death Detection Elisa Kit Plus è stato fornito dalla Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

2. Linee cellulari umane

- La linea cellulare A-431: ottenuta da un carcinoma epidermoide (5)
- La linea cellulare ARO: ottenuta da un carcinoma anaplastico della tiroide (6)
- La linea cellulare NPA: ottenuta da un carcinoma papillifero, poco differenziato della tiroide (6)
- La linea cellulare SKBR3: ottenuta da un tumore della mammella (5)
- La linea cellulare SK-OV: ottenuta da un carcinoma ovarico (5)

3. Colture cellulari

Per crescere le cellule NPA, ARO e SK-OV-3 il terreno di coltura è costituito da: DMEM con 10% di FBS, 1% di glutamina (50 Unità/ml) e 1% di streptomina e penicillina (50 Unità/ml). Per crescere le cellule SKBR3 e le cellule A-431 il terreno di coltura è costituito da: RPMI con: 1% di glutamina (50 Unità/ml), 1% di streptomina e penicillina (50 Unità/ml) e 10% di FBS scomplementato (posto a 57° per 30 minuti). Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37 °C in atmosfera umidificata di 95% aria e 5% di CO₂.

4. Saggio di vitalità cellulare: Trypan Blue

La vitalità cellulare è stata determinata mediante il Trypan blue che colora di blu le cellule morte. Abbiamo piastrato 5×10^3 cellule NPA per pozzetto, su una multiwell da

96. Poi, abbiamo aggiunto l'astina 3 (1mM) per 24, 48 e 72 ore. Alla fine di ogni incubazione abbiamo staccato e contato le cellule con la camera di Burker al microscopio ottico. Per la conta cellulare abbiamo prelevato 10 μ l di cellule sospese nel terreno ed aggiunto 10 μ l di Trypan blue.

5. Saggio MTT

Per eseguire tale saggio abbiamo eseguito la stessa procedura di trattamento delle cellule descritta precedentemente. Il saggio è basato, nelle cellule vive, sulla riduzione dei sali di tetrazolio, con la formazione di cristalli insolubili purpurei di formazano (7), solubilizzati dall'aggiunzione di un detergente, il DMSO. Si sciolgono 5mg di MTT in 1ml di H₂O bidistillata. Tale soluzione viene diluita 1:5 con il terreno di coltura, 100 μ l vengono poi aggiunti nei pozzetti della multiwell da 96 e lasciati incubare per 4 ore a 37°C. Eliminato il surnatante, si aggiungono 100 μ l di DMSO e si legge a 492nm. La sopravvivenza cellulare si determina con tale formula: $\text{assorbanza controllo} : 100\% \text{ di sopravvivenza} = \text{assorbanza delle cellule trattate} : x$; ("x" rappresenta la % delle cellule sopravvissute al trattamento).

6. Valutazione dell'apoptosi mediante analisi al citofluorimetro

L'analisi si basa sulla colorazione delle cellule sia con ioduro di propidio, che si intercala nel DNA colorando le cellule necrotiche, sia con l'annessina, che si lega alla fosfatidilserina esposta sulla membrana delle cellule in apoptosi. Sono state piastrate nella multiwell da 6 pozzetti 10⁶ cellule NPA ed è stata aggiunta l'astina 3 (1mM) e l'etoposide (50 μ M) per 24 ore. Le cellule sono state quindi lavate con una soluzione contenente: 140mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10mM HEPES, il tutto a pH 7.4. Dopo il lavaggio, le cellule adese sono state risospese in 1ml dello stesso tampone ed incubate in ghiaccio per 30 minuti con 2 μ l di Annessina V-FITC. Infine, sono stati aggiunti 5 μ l di Ioduro di Propidio ed i campioni sono stati analizzati al citofluorimetro.

7. Determinazione della frammentazione del DNA

Cellule NPA (1x10³/100 μ l) sono state piastrate, in una multiwell da 96 pozzetti. Dopo 24 ore è stata aggiunta l'astina 3, l'etoposide e la combinazione dell'astina 3 o dell'etoposide con Z-VAD-FMK. I campioni sono stati incubati per 24 e 48 ore. La determinazione è stata eseguita utilizzando il kit Death Detection Elisa plus. Si aggiunge al campione l'anticorpo anti-istone in modo tale che l'anticorpo si leghi

all'istone dei nucleosomi (mono e oligo nucleotidi), derivati dalla frammentazione del DNA delle cellule apoptotiche. Si forma un complesso che si lega alla streptavidina già stratificata sui pozzetti della multiwell a cui si aggiunge il substrato fluorescente ABTS che permette di quantizzare i nucleosomi. La quantità di nucleosomi si determina spettrofotometricamente a 405nm.

8. Analisi dei corpi apoptotici mediante microscopia a fluorescenza

10^4 cellule NPA sono state piastrate in triplicato su vetrini posti in una multiwell da 24. Poi, sono stati aggiunti l'astina 3 (1mM), l'astina 4 (1mM) e l'etoposide (50 μ M) per 24 e 48 ore. Il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule sono state fissate per 20 minuti con una soluzione di formaldeide al 4%, lavate con PBS e permeabilizzate per 5 minuti con Triton X-100 allo 0.1%. Le cellule sono state lavate con PBS e tenute al buio a temperatura ambiente, con il colorante nucleare Hoecht 33258 alla concentrazione di 0.5mg/ml, per 30 minuti. I nuclei così colorati sono stati osservati al microscopio Zeiss Axiophot e fotografati.

9. Determinazione dell'attività delle caspasi

L'attività delle caspasi 3, 8 e 9 è stata determinata mediante l'uso di kits fluorimetrici d'analisi, per i quali sono state eseguite le indicazioni della casa produttrice. 1×10^6 cellule NPA, piastrate, in una multiwell da 6 pozzetti, sono state trattate con l'astina 3 per vari tempi. Trascorso il tempo di incubazione, le cellule sono state lavate e raccolte per centrifugazione. Il pellet cellulare è stato risospeso in un opportuno buffer di lisi ed incubato per 1 ora a 37°C con un substrato fluorescente: DEVD-AFC per la caspasi 3, IETD-AFC per la caspasi 8 e LEHD-AFC per la caspasi 9. La fluorescenza emessa derivante dal rilascio della sequenza AFC è stata determinata con uno spettrofluorimetro ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 400nm e una lunghezza d'onda di emissione da 505nm.

10. Determinazione dell'inibizione dell'attività delle caspasi

Abbiamo utilizzato gli inibitori specifici per ciascun caspasi: Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK, Z-DEVD-FMK; rispettivamente per le caspasi 8, 9 e 3. Tale saggio è simile a quello descritto nel paragrafo precedente la differenza sta nel fatto che insieme all'astina 3 sono stati aggiunti gli specifici inibitori di ciascuna caspasi.

RISULTATI

➤ **Effetto citotossico dell'astina ciclica sintetica 3 su diverse linee cellulari**

Fra i diversi peptidi neosintetizzati aventi differente struttura, abbiamo riscontrato la maggiore attività antitumorale nell'astina 3. Per verificare che l'azione antineoplastica dell'astina 3 non fosse specifica di una sola linea cellulare utilizzata abbiamo saggiato il suo effetto su varie linee cellulari neoplastiche umane aventi differenti origini (A-431, ARO, NPA, SKBR-3, SK-OV-3) e diverso grado di malignità. La figura 2 mostra l'effetto citotossico, valutato mediante saggio MTT, come riportato nei Materiali e Metodi SEZIONE I, svolta dall'astina 3 sulle varie linee cellulari prese in considerazione, ed il suo effetto antitumorale varia dal 48 al 79% in rapporto alla linea cellulare tumorale analizzata. Nella figura 2 si può osservare che le cellule derivate da un carcinoma papillifero poco differenziato della tiroide (NPA), in seguito al trattamento con l'astina ciclica 3, raggiungono solo il 21% di sopravvivenza cellulare rappresentando la linea cellulare più responsiva all'azione del peptide in esame.

Per meglio definire l'effetto antitumorale sulle cellule NPA del nostro peptide (astina 3) abbiamo analizzato la sua vitalità cellulare, confrontandola con l'astina naturale B e con un'astina lineare 4 che per la sua conformazione non avrebbe dovuto mostrare alcuna azione antitumorale. Le cellule NPA sono state trattate per 72 ore con concentrazioni crescenti delle varie astine 3, 4 e B. Alla fine del trattamento è stato eseguito il saggio di vitalità cellulare utilizzando come colorante il Trypan blue; in questo modo, si sono potute discriminare le cellule vive da quelle morte, come riportato nei Materiali e Metodi SEZIONE I. La figura 3 mostra il diverso effetto indotto sulle cellule NPA dai differenti peptidi. E' evidente che l'astina lineare sintetica 4 non inibisce la sopravvivenza cellulare e si può perciò affermare che tale peptide non ha alcun effetto citotossico sulle cellule bersaglio. Diversamente, le cellule trattate sia con l'astina ciclica sintetica 3 che con l'astina naturale B evidenziano una diminuzione della sopravvivenza cellulare che risulta essere strettamente correlata con la concentrazione utilizzata. L'azione antitumorale delle astine è quindi dose-dipendenti con una $IC_{50} = 100\mu M$.

Tali dati confermano precedenti risultati in cui si era stato osservato che l'effetto antitumorale delle astine naturali era dovuto alla loro natura ciclica.

➤ **L'astina ciclica sintetica 3 induce apoptosi e un inibitore generale delle caspasi protegge le cellule NPA dalla morte cellulare**

I dati della letteratura suggeriscono che l'azione antitumorale dei chemioterapici avviene principalmente per attivazione della via apoptotica, quindi, per poter identificare quale fosse il meccanismo con cui le astine svolgono la loro azione antitumorale abbiamo cominciato ad analizzare l'eventuale attivazione del processo apoptotico; utilizzando l'etoposide, noto induttore di apoptosi, come controllo positivo (8). Per poter discriminare le cellule apoptotiche da quelle necrotiche abbiamo eseguito il saggio che prevede l'utilizzo dell'Annessina V e lo Ioduro di propidio. L'Annessina V, infatti, lega la fosfatidilserina, una molecola esposta precocemente sulla membrana delle cellule apoptotiche. La figura 4 mostra che la percentuale delle cellule positive all'Annessina V, espressa dopo un trattamento di 24 ore con l'astina 3 e con l'astina B, è comparabile con quella delle cellule trattate con l'etoposide, nostro controllo positivo. Il trattamento, invece, con l'astina 4 mostra un valore di cellule apoptotiche pressoché uguale a quello delle cellule non trattate con alcun peptide. Tali dati indicano che l'astina ciclica sintetica 3 si comporta come l'astina naturale B e che tali peptidi agiscono indirizzando la cellula verso la morte programmata. Per confermare che la morte cellulare fosse recentemente indotta dall'attivazione del processo apoptotico, abbiamo trattato le cellule NPA con l'astina 3, con l'astina 4 e con l'etoposide. Dopo il trattamento, le cellule sono state esaminate per determinare l'eventuale presenza dei corpi apoptotici utilizzando un microscopio a fluorescenza ed aggiungendo alle cellule come colorante nucleare l'Hoechst 33258. La figura 5 mostra un'evidente induzione dell'apoptosi nelle cellule NPA in seguito al trattamento per 24 e 48 ore con l'astina ciclica sintetica 3 ed è possibile osservare la presenza nel nucleo di un notevole numero di corpi apoptotici (pannelli B-C). Un simile livello di cellule apoptotiche è stato osservato nelle cellule NPA trattate con l'etoposide, nostro controllo positivo (pannelli D-E). Al contrario nessun segno d'attivazione di apoptosi è rilevabile nelle cellule non trattate (pannello A), utilizzate

come controllo negativo, o nelle cellule NPA trattate con l'astina lineare sintetica 4 (dati non mostrati).

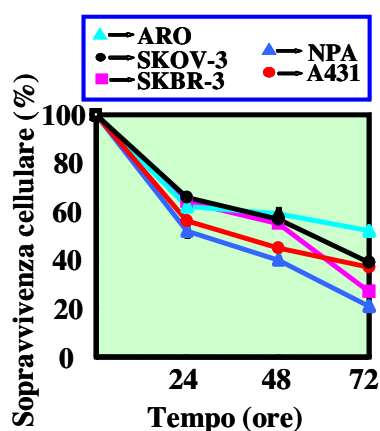


Figura 2: Effetto citotossico dell'Astina ciclica sintetica 3.

Le linee cellulari sono state incubate con l'Astina 3 per 24-48-72 ore. Cellule non trattate hanno rappresentato il nostro controllo negativo. I dati mostrati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

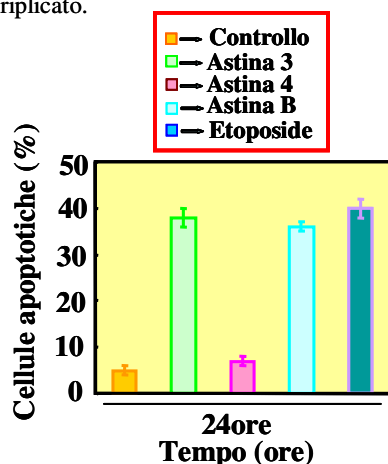


Figura 4: Analisi citofluorimetrica dell'apoptosi indotta dall'Astina 3.

Cellule NPA sono state incubate per 24 ore con l'Astina 3, con l'Astina 4, con l'Astina B e con l'Etoposide. La percentuale (%) di cellule apoptotiche è stata determinata mediante analisi al citofluorimetro come descritto nei materiali e metodi. I dati mostrati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

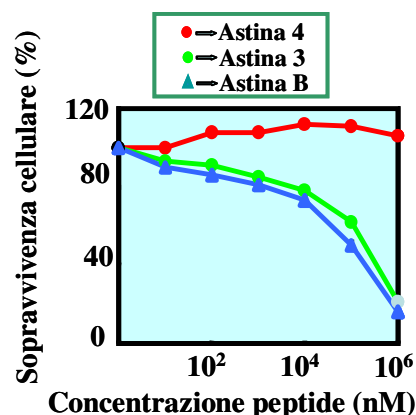


Figura 3: Effetto delle Astine cicliche e lineari.

Cellule NPA, sono state trattate per 72 ore con l'Astina 3, con l'Astina 4 e con l'Astina B alle diverse concentrazioni riportate. I dati mostrati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

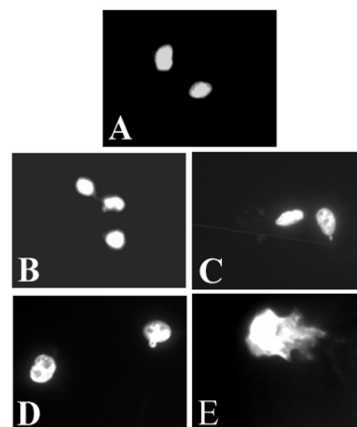


Figura 5: Formazione di corpi apoptotici in cellule NPA.

Cellule NPA, dopo trattamento, sono state fissate e colorate con l'Hoechst 33258. La normale morfologia delle cellule non trattate è stata usata come controllo negativo (pannello A). I dati mostrano corpi apoptotici in cellule NPA trattate per 24 e 48ore con l'Astina 3 (pannelli B e C) e con l'etoposide (pannelli D ed E).

Per poter quantizzare il grado di apoptosi abbiamo valutato la frammentazione del DNA determinando il valore dei nucleosomi, evento che caratterizza una cellula

apoptotica. Le cellule NPA sono state trattate a diversi tempi (24-48-72 ore) con l'astina 3 o con l'etoposide, utilizzato come controllo positivo. Come si osserva nella figura 6, le cellule trattate con l'etoposide e quelle trattate con l'astina 3 evidenziano un valore maggiore d'assorbanza dopo 48 ore dal trattamento; tale valore è direttamente proporzionale al numero di nucleosomi formatesi. Questo dato conferma l'ipotesi che l'astina 3 induce la morte cellulare attivando il processo apoptotico. Per confermare che l'effetto osservato fosse specifico abbiamo trattato le cellule con l'inibitore generale delle caspasi (Z-VAD-FMK). Abbiamo osservato che co-trattando le cellule NPA con l'astina 3 e con l'inibitore generale delle caspasi si otteneva una completa inibizione della formazione dei nucleosomi apoptotici e quindi della morte cellulare per apoptosi. Come controllo abbiamo co-trattato le cellule NPA con l'etoposide e con l'inibitore Z-VAD-FMK ottenendo un risultato analogo.

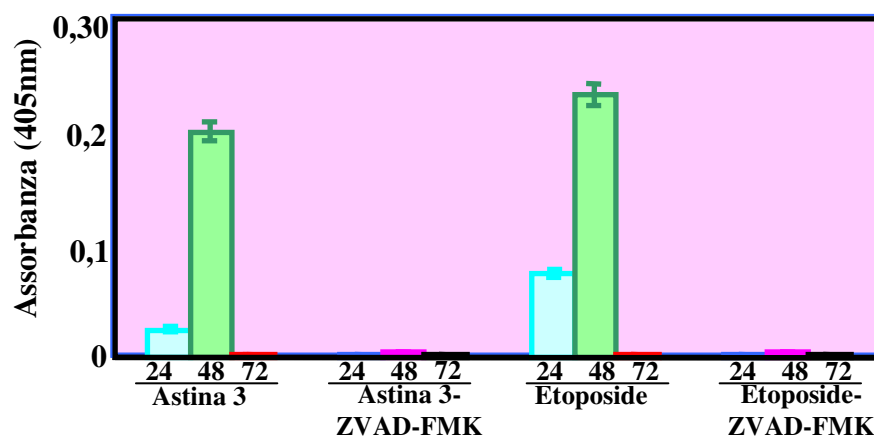


Figura 6: Frammentazione del DNA in cellule NPA.

Cellule NPA sono state trattate o meno con l'astina 3 per i tempi indicati con o senza Z-VAD-FMK. Alla fine di ogni trattamento, la frammentazione del DNA è stata misurata con il Cell Death Detection Elisa kit. Cellule non trattate sono state usate come controllo negativo e cellule trattate con l'etoposide come controllo positivo. I dati mostrati in figura rappresentano la media (\pm SD) di 3 esperimenti eseguiti indipendentemente ed in triplicato.

➤ **L'Astina 3 induce l'attivazione della cascata delle caspasi in cellule NPA**

Dopo aver determinato che l'astina 3 svolge la sua azione antitumorale attivando il processo apoptotico, siamo andati a studiare quale fosse il meccanismo molecolare attivato. E' ormai accertato che una serie di enzimi, le caspasi, sono coinvolti nel meccanismo della morte cellulare per apoptosi. Esse sono proteasi cisteiniche espresse come pro-enzimi inattivi e che devono essere attivate per poter svolgere la loro azione; si distinguono inoltre caspasi "iniziatrici" o "effettrici" (9). Poiché è

riportato che gli agenti chemioterapici inducono l'induzione del processo apoptotico che si esplica attraverso l'attivazione delle caspasi iniziatrici e delle caspasi effettrici (9), siamo andati a valutare se nel nostro sistema ci fosse attivazione di tali proteasi cisteiniche. Abbiamo quindi analizzato le cinetiche d'attivazione delle caspasi iniziatrici 8, 9, e della caspasi effettrice 3. Nel saggio eseguito, la determinazione spettrofotometrica dei livelli del fluoroforo AFC, staccato dallo specifico substrato sintetico, rappresentava una misura dell'attività delle caspasi. L'attività della caspasi 8, valutata mediante un saggio enzimatico consistente nell'idrolisi di uno specifico substrato fluorescente: IETD-AFC, figura 7 pannello A, ha evidenziato un incremento dell'attività enzimatica che cominciava a 6 ore, aveva un picco a 24 ore e successivamente diminuiva progressivamente fino a raggiungere l'attività basale a 48-72 ore. I valori basali erano considerati quelli espressi dalle cellule non trattate o trattate con l'astina lineare. L'attività della caspasi 9, effettuata utilizzando come specifico substrato fluorescente LEHD-AFC, vedi figura 7 pannello B, ha evidenziato un incremento che cominciava a 6 ore e mostrava la massima attività a 36 ore per poi decrescere gradatamente. L'attività della caspasi 3, determinata con lo specifico substrato fluorescente DEVD-AFC, vedi figura 7 pannello C, ha mostrato un incremento a partire dalle 12 ore ed un picco a 48 ore, per poi decrescere drasticamente a 72 ore. Attivazione della caspasi non è stata osservata in cellule non trattate (controllo negativo). I dati ottenuti correlano ed ulteriormente corroborano l'ipotesi che l'astina 3, induce il fenomeno di apoptosi e che quest'ultimo risulta essere dipendente dall'attivazione delle caspasi. Infatti, abbiamo osservato l'attivazione temporale sequenziale delle caspasi 8, 9 e 3. Per essere sicuri che le attivazioni di ciascuna caspasi fosse dovuta al trattamento delle cellule NPA con l'astina 3, abbiamo utilizzato degli inibitori specifici delle singole caspasi 8, 9, e 3. Nella figura 8 si osserva che gli inibitori specifici bloccano l'attività di ciascuna caspasi, dimostrando perciò che tale fenomeno è indotto proprio dall'azione dell'astina 3. Per valutare il corretto meccanismo apoptotico innescato dall'azione dell'astina 3, abbiamo bloccato l'attivazione della caspasi 8 con il suo specifico inibitore, Z-IETD-FMK, ed abbiamo valutato se ci fosse ancora l'attivazione delle caspasi 9 e 3. Come rappresentato nella figura 9, l'inibizione dell'attivazione della

caspasi 8 blocca l'attivazione delle caspasi 9 (pannello A) e 3 (pannello B). Inibendo, invece, la caspasi 9 con il suo specifico inibitore, Z-LEHD-FMK, abbiamo osservato che continua ad essere attiva la caspasi 8 (figura 10 pannello A), mentre è completamente bloccata l'attivazione della caspasi 3 (figura 10 pannello B). Quindi possiamo affermare che la caspasi 8 è a monte nell'attivazione delle caspasi e la caspasi 9 è responsabile, a sua volta, dell'attivazione della caspasi 3.

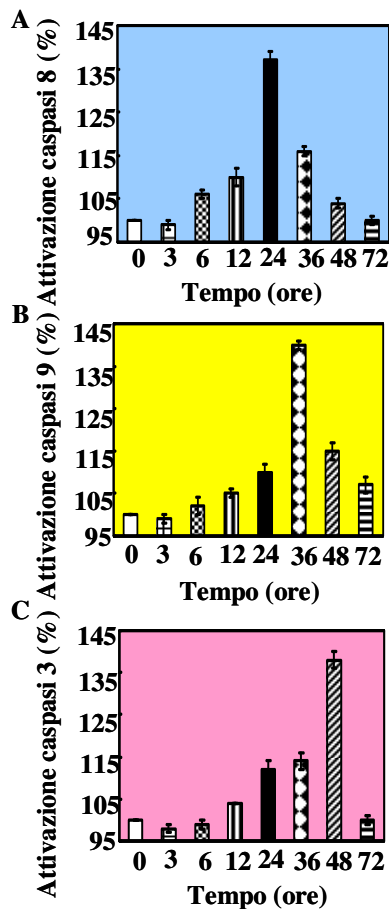


Figura 7: Attivazione caspasi 8, 9 e 3.

Cellule NPA sono state trattate per 3-6-12-24-36-48-72 ore con l'Astina 3. Le attività enzimatiche delle caspasi 8 (pannello A), 9 (pannello B) e 3 (pannello C) sono state determinate utilizzando uno specifico substrato fluorescente; rispettivamente IETD-AFC, LEHD-AFC e DEVD-AFC, come descritto nei materiali e metodi. I dati mostrati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

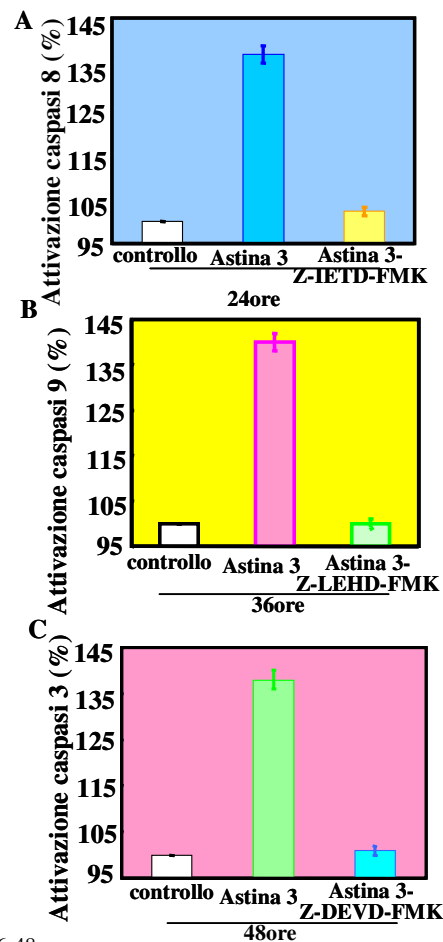


Figura 8: Azione degli inibitori delle caspasi 8, -9, -3.

L'attività delle caspasi è stata misurata in presenza dell'inibitore per la caspasi 8 (Z-IETD-FMK), l'inibitore per la caspasi 9 (Z-LEHD-AFC), o l'inibitore per la caspasi 3 (Z-DEVD-AFC). Cellule non trattate sono state usate come controllo negativo. I dati mostrati rappresentano la media (\pm SD) di 3 indipendenti esperimenti eseguiti in triplicato.

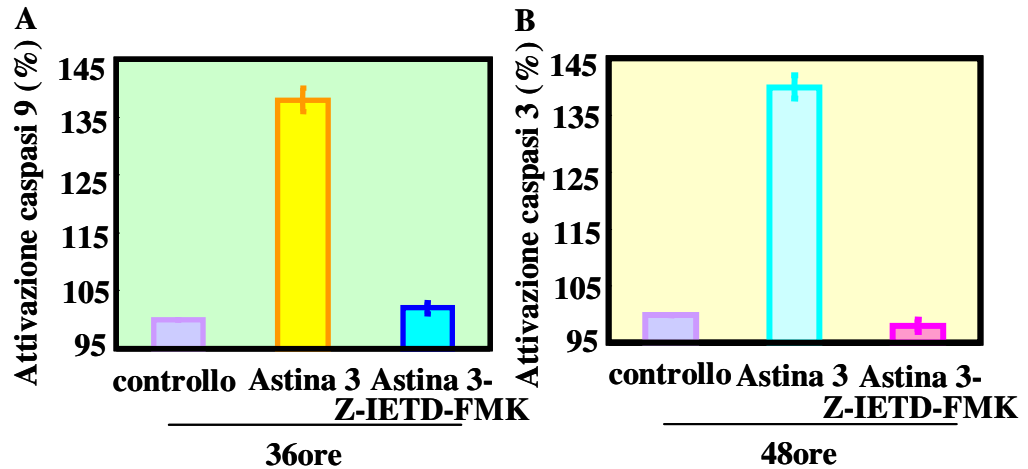


Figura 9: Inibizione caspasi 8.

L'attività delle caspasi 9 e 3 (pannelli A e B) è stata misurata in presenza dell'inibitore per la caspasi 8 (Z-IETD-FMK) a 36 e 48ore. I dati mostrati in figura rappresentano la media (\pm SD) di 3 esperimenti eseguiti indipendentemente ed in triplicato.

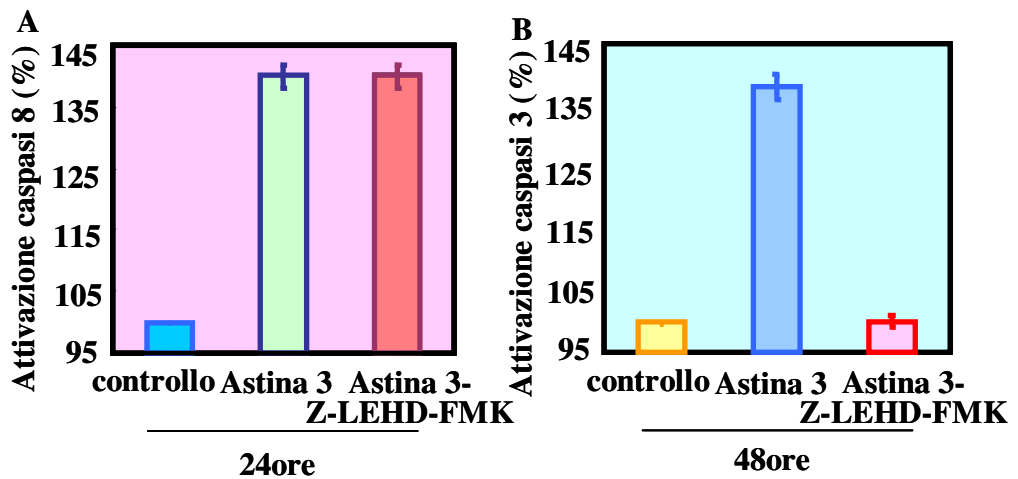


Figura 10: Inibizione caspasi 9.

L'attività delle caspasi 8 e 3 (pannelli A e B) è stata misurata in presenza dell'inibitore per la caspasi 9 (Z-LEHD-FMK) a 24 e 48ore. I dati mostrati in figura rappresentano la media (\pm SD) di 3 esperimenti eseguiti indipendentemente ed in triplicato.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La possibilità di utilizzare peptidi naturali o sintetici quali specifici agenti antitumorali è stato ed è tuttora un campo di indagine molto fertile. Si sa che molti farmaci antitumorali esplicano la loro azione inducendo l'apoptosi e che talvolta la loro inefficacia dipende da difetti di attivazione di tale processo (10). L'apoptosi è stata inizialmente descritta per le sue caratteristiche morfologiche che comprendono fra l'altro la condensazione della cromatina, la frammentazione del DNA e l'esposizione sulla membrana cellulare della fosfatidilserina (11). Attualmente si pensa che il processo apoptotico è regolato da geni che influenzano la sopravvivenza, la proliferazione e il differenziamento per cui l'apoptosi è considerata un meccanismo che tende a limitare il danno (12).

Abbiamo osservato che le astine cicliche di nuova sintesi svolgono un'azione antitumorale il cui effetto risulta essere differente a seconda della linea cellulare tumorale umana considerata e si esplica attraverso l'attivazione del processo apoptotico. La specificità dell'azione delle astine è dovuta infatti alla loro struttura ciclica perché le astine sintetiche lineari non determinano, sulle stesse linee cellulari analizzate, alcun cambiamento della normale morfologia e nel numero di cellule. Una stima quantitativa della percentuale di cellule apoptotiche indotte dal trattamento con l'astina ciclica sintetica 3 e l'astina naturale B, risultava essere pressoché uguale a quello delle stesse cellule trattate con l'etoposide, sostanza utilizzata normalmente come controllo positivo di apoptosi, confermandoci l'alto potenziale citotossico delle astine. Per confermare che l'azione dell'astina 3 determinasse apoptosi, abbiamo valutato i livelli di nucleosomi apoptotici presenti nelle cellule trattate ed abbiamo evidenziato che quelli riscontrati, dal trattamento con l'astina 3, sono sovrapponibili a quelli riscontrati con il controllo positivo.

Poiché l'attivazione del processo apoptotico è mediato dall'attivazione delle caspasi abbiamo studiato quali caspasi fossero attivate dal trattamento con le astine. Per essere sicuri che tale attivazione fosse specifica abbiamo utilizzato gli inibitori specifici per le singole caspasi ed abbiamo osservato che l'attività delle caspasi era completamente inibita quando le cellule erano co-trattate con gli inibitori

proteggendo quindi le cellule dall'apoptosi. I dati ottenuti hanno evidenziato che le caspasi 8, 9 e 3 sono specificamente e sequenzialmente attivate (13).

E' importante notare che, nel nostro sistema, l'azione delle astine avviene attivando prima la caspasi recettoriale 8 che precedentemente alle nostre osservazioni si pensava non dovesse essere attivata dall'azione dei chemioterapici. Finora si pensava che i peptidi attivassero direttamente la via apoptotica mitocondriale mentre i risultati da noi ottenuti così come quelli riportati, con un altro sistema, in un lavoro pubblicato contemporaneamente al nostro (14), inducono ad ipotizzare la possibilità di un "cross-talk" fra la via apoptotica recettoriale e quella mitocondriale. In conclusione i dati finora riportati in questa tesi, dimostrano per la prima volta, che l'azione antitumorale svolta dalle astine, avviene attraverso l'attivazione specifica del processo apoptotico, utilizzando peraltro una nuova sequenza di coinvolgimento delle caspasi.

Pertanto, sebbene siano necessari ulteriori studi per meglio definire le interazioni fra le astine cicliche e le cellule tumorali si può cominciare ad ipotizzare che le astine possano essere considerate un nuovo potenziale farmaco antitumorale. Inoltre, diversi sono i vantaggi derivanti dall'utilizzo di sostanze di sintesi rispetto a quelle estratte naturalmente, essenzialmente in termini sia di resa che di disponibilità e di riproducibilità del prodotto.

SEZIONE II

Effetto citotossico di un analogo metabolicamente stabile dell'anandamide, Met-F-AEA, su cellule derivanti da un carcinoma tiroideo umano

INTRODUZIONE

La canapa indiana o *Cannabis Sativa* è una delle piante psicoattive più conosciute e le sue potenzialità sono state riconosciute fin dall'antichità (15). Attualmente è coltivata in molti paesi sia per la fibra sia per la produzione di sostanza stupefacente, il cui principio attivo è il Δ^9 tetraidrocannabinolo (THC). Quest'ultimo è stato isolato nel 1960 da Mechoulam e collaboratori (16). I recettori specifici per il Δ^9 THC sono CB1 e CB2 (17, 18). Il recettore CB1 è noto come recettore "centrale" dei cannabinoidi poiché prevalentemente espresso nel sistema nervoso centrale (SNC), ma è stato riscontrato anche nella prostata, nell'utero, nei testicoli, nella milza, nell'intestino e nei linfociti (19). Il recettore CB2 è noto, invece, come recettore periferico dei cannabinoidi ed è espresso soprattutto nelle cellule immunitarie, ciò spiega le note azioni immunosoppressive dei cannabinoidi (20).

La scoperta nei Mammiferi di recettori altamente selettivi e specifici per il THC ha suggerito l'ipotesi dell'esistenza di molecole endogene, capaci di riconoscere ed attivare tali proteine, gli endocannabinoidi. Questi sono una classe di mediatori lipidici che comprende esteri ed eteri di acidi grassi poliinsaturi a lunga catena, in grado di legarsi selettivamente ai recettori CB1 e CB2 (21). Nel 1992 fu isolato e caratterizzato il primo metabolita endogeno in grado di legarsi selettivamente ai recettori CB1: l'anandamide (AEA) (22). Tale sostanza, pur essendo diversa chimicamente dal Δ^9 THC, interagisce, nel nostro organismo, con gli stessi recettori di

quest'ultimo (23). A livello del sistema nervoso centrale, esercita azioni inibitorie sull'apprendimento e sulla memoria (24), modula il controllo extrapiramidale motorio (25) e protegge i neuroni dal danno cellulare (26). A livello del sistema nervoso periferico, invece, regola il battito cardiaco, la pressione ematica vascolare (27, 28) ed ha effetti vasodilatatori. La maggior parte di queste azioni sembrano, per lo più, mediate dai recettori CB1, mentre i recettori CB2 risultano maggiormente coinvolti negli effetti immunoregolatori dell'AEA (21). E' riportato, inoltre, che il sistema endocannabinoidale induce su cellule di carcinoma mammario umano un effetto anti-proliferativo mediato dal recettore CB1. Tale recettore agisce inibendo l'azione della prolattina endogena utilizzata come fattore di crescita autocrino. In queste cellule, infatti, l'AEA inibisce sia l'espressione dei recettori per la prolattina che gli agenti attivanti il recettore CB1, attraverso lo stesso meccanismo (29).

Ulteriori studi hanno dimostrato il coinvolgimento dei recettori degli endocannabinoidi nel regolare cellule provenienti dai gliomi; tuttavia il ruolo di CB1 in questi studi resta ancora non del tutto chiarito (30). Più recentemente è stato dimostrato che l'attivazione selettiva dei recettori CB2 porta ad una notevole inibizione della crescita del gliomi *in vivo* e che l'espressione di tale recettore è correlata con il grado di malignità degli astrociti (31).

Sono stati compiuti anche studi utilizzando un analogo metabolicamente stabile dell'AEA, la Met-F-AEA (2-metil-arachidonil-2'-fluoro-etilamide) per valutare il suo effetto antitumorale. A tal fine è stata utilizzata una linea cellulare di tiroide di ratto (FTRL-5), trasformata con l'oncogene Ki-vi-ras. E' stato osservato che la Met-F-AEA, inibisce la proliferazione *in vitro* ed *in vivo* induce una drastica riduzione della massa tumorale (32), tale effetto è inibito dall'antagonista del recettore CB1, SR141716A, che agisce bloccando l'azione degli agonisti (33).

Poiché negli ultimi dieci anni è stata riscontrata un'elevata incidenza dei carcinomi tiroidei umani, la possibilità di elaborare nuovi farmaci, che da soli od in combinazione agiscano specificamente su tali neoplasie potrebbe rivelarsi di estrema importanza (34). Per questi motivi abbiamo cominciato ad analizzare l'effetto della Met-F-AEA, il suo meccanismo d'azione ed il suo coinvolgimento nell'espressione del recettore CB1, nonché l'effetto dell'antagonista di CB1, SR141716A, nella

regolazione della proliferazione di cellule derivanti da carcinomi tiroidei umani aventi diverso grado di malignità.

MATERIALI E METODI

1. Reagenti

L'acrilammide, gli anticorpi secondari, il blu di bromofenolo, il DMSO, il DTT, il Folin, la glicina, gli inibitori di proteasi, l'NaCl, il Nonidet, il milk, l'SDS ed il Tris sono stati acquistati dalla Sigma Chemical Company (Louis, MO). L'SR141716A, la Met-F-AEA e l'anticorpo anti-CB1 sono stati gentilmente forniti dal prof. M. Bifulco. BSA è stata acquistata dalla Pierce. La membrana di PVDF è stata acquistata dalla Millipore. L'ECL è stato acquistato dalla Amersham (Buckinghamshire, UK). Gli anticorpi: anti-actina, anti-actinina, anti-ciclina A, anti-parp1, anti-p21, anti-p27, anti-p53 sono stati acquistati dalla Santa Cruz.

2. Linee cellulari umane

- Le linee cellulari ARO (6), FB1 (35) e FRO (36): ottenute da carcinomi anaplastici della tiroide
- La linea cellulare NPA: ottenuta da un carcinoma papillifero poco differenziato della tiroide (6)

3. Colture cellulari

Le linee cellulari sopra elencate sono state coltivate utilizzando il terreno di coltura DMEM supportato come riportato nei Materiali e Metodi, SEZIONE I.

4. Saggio con Trypan blue

Abbiamo piastrato 3×10^3 cellule NPA, ARO, FB1, FRO per pozzetto, in una multiwell da 96 ed abbiamo aggiunto la Met-F-AEA ($10 \mu\text{M}$) al terreno di coltura per 4 tempi: 24 ore, 48 ore, 72 ore, 96 ore. Terminato il trattamento abbiamo eseguito tale saggio come riportato nei Materiali e Metodi, SEZIONE I.

5. Saggio di proliferazione cellulare: MTT

Abbiamo piastrato 3×10^3 cellule NPA per pozzetto in una multiwell da 96. Dopo 24 ore, abbiamo aggiunto la Met-F-AEA ($5 \mu\text{M}$) o SR141716A ($0,2 \mu\text{M}$) o la combinazione dei due farmaci per 12-24-72 ore. Abbiamo eseguito il saggio MTT come riportato in Materiali e Metodi, SEZIONE I.

6. Analisi dei corpi apoptotici mediante microscopia a fluorescenza

10^4 cellule NPA sono state piastrate su vetrini in differenti pozzetti della multiwell da 24. Sono stati aggiunti la Met-F-AEA ($10 \mu\text{M}$) e l'etoposide ($100 \mu\text{M}$) per due

tempi: 24 e 48 ore. Terminato il trattamento i vetrini sono stati trattati come riportato in Materiali e Metodi, SEZIONE I.

7. Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica è stata determinata mediante il metodo di Lowry (37), utilizzando albumina di siero bovino (BSA) come standard.

8. Analisi elettroforetica delle proteine mediante gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE)

Aliquote pari a 50-100 µg di proteine dell'omogenato cellulare sono state precipitate con TCA 40% (v/v) per 20 minuti in ghiaccio e centrifugate a 4°C per 15 minuti a 3500 rpm. Il TCA residuo è stato allontanato mediante successivi lavaggi con etanolo 100% freddo ed attraverso un ciclo di centrifugazioni a 10000 rpm, 4°C per 5 minuti. I precipitati finali, dopo totale evaporazione dell'etanolo, sono stati risospesi in 15µl di Loading Buffer (50mM Tris HCl pH 6.8, 100mM DTT, 2% SDS, 0,1% blu di bromofenolo, β-mercaptoetanol 14,3M, 10% glicerolo). Infine, i campioni sono stati bolliti per 1 minuto, per ridurre i ponti SH del β-mercaptoetanol, e caricati su gel SDS-page (10-12,5%).

9. Western blotting

I campioni proteici dopo separazione elettroforetica sono stati trasferiti su membrana di PVDF. Terminato il trasferimento il filtro, è stato trattato con una soluzione di latte al 5% sciolta in PBS-Tween per saturare eventuali siti non specifici di legame. L' incubazione con anticorpi primari, opportunamente diluiti in PBS-Tween contenente latte al 3%, è stata effettuata per tutta la notte a 4°C. Il filtro è stato poi portato a temperatura ambiente e lavato 3 volte per 5 minuti con PBS-Tween. Terminati i lavaggi, il filtro è stato incubato per 1ora con l'anticorpo secondario anti-IgG di topo o di coniglio associato alla perossidasi di rafano. Il filtro è stato, infine, sottoposto ad ulteriore ciclo di lavaggi e l'attività perossidasi è stata rivelata con un substrato chemiluminescente, ECL, che legandosi all'anticorpo secondario sviluppa una reazione di luce che si traduce in bande rilevabili attraverso l'utilizzo del phosforimager. L'analisi densitometrica è stata effettuata utilizzando il programma "Quantity One".

RISULTATI

❖ Effetto citotossico della 2-metil-arachidonil-2'-fluoro-etilamide (Met-F-AEA) su diverse linee tumorali umane

Per valutare l'effetto citotossico dell'anandamide abbiamo utilizzato un suo analogo metabolicamente stabile: la Met-F-AEA.

Il suo effetto è stato valutato, *in vitro*, su diverse linee cellulari neoplastiche umane di origine tiroidea quali ARO, FB1, FRO, NPA, aventi diverso grado di malignità. Come si può osservare dal grafico riportato in figura 11, la Met-F-AEA presenta un effetto citotossico graduale, valutato mediante il saggio con Trypan blue, come riportato nei Materiali e Metodi SEZIONE II, che a 96 ore di trattamento varia dal 50% al 97% in relazione alla linea cellulare tumorale analizzata. Abbiamo osservato che le cellule NPA e FRO rappresentano le linee cellulari più responsive all'azione della Met-F-AEA, poiché raggiungono solo il 10% di sopravvivenza cellulare dopo 96 ore dal trattamento. Alla luce di questi risultati le cellule NPA sono state trattate per 12, 24 e 72 ore con 5 μ M di Met-F-AEA, oppure con 0,2 μ M dell'antagonista selettivo del recettore CB1, SR141716A, o con la combinazione dei due farmaci (5 μ M di Met-F-AEA + 0,2 μ M di SR141716A). La figura 12 mostra che l'antagonista SR141716A non ha alcun effetto sulla proliferazione cellulare, mentre la Met-F-AEA induce un effetto citotossico pari a circa il 60% d'inibizione della sopravvivenza cellulare dopo 72 ore dal trattamento. La combinazione dei due farmaci reverte l'effetto indotto dalla sola Met-F-AEA, confermando che l'azione di quest'ultima è mediata dall'azione del recettore CB1. Abbiamo inoltre osservato che tale effetto citotossico è correlato strettamente ad una maggiore espressione del recettore CB1. La figura 13, pannello A riporta il livello di espressione del recettore CB1 nelle diverse linee cellulari analizzate; nel pannello B sono riportati i livelli di espressione dell'actina, una proteina ubiquitaria citoplasmatica usata come controllo della quantità di lisato proteico caricato su gel. E' evidente nelle linee cellulari NPA e FRO, più responsive all'azione della Met-F-AEA, una maggiore espressione del recettore CB1.

Effetto della Met-F-AEA sulla regolazione dei livelli d'espressione del recettore CB1

Allo scopo di valutare il possibile coinvolgimento del recettore CB1 negli effetti inibitori svolti dalla Met-F-AEA sulla proliferazione cellulare, le cellule NPA sono state trattate per 3, 6 e 24 ore con 10 μ M della Met-F-AEA e con la combinazione dei due farmaci (10 μ M di Met-F-AEA + 0,1 μ M di SR141716A). Nel pannello A della figura 14 è possibile osservare un incremento dei livelli di espressione del recettore CB1 a 6, 24 e 48 ore dal trattamento con la Met-F-AEA. Tale effetto è revertito dalla combinazione dei due farmaci. Nel pannello B sono riportati i livelli di espressione dell'actina. Nel pannello C è rappresentato un istogramma con i livelli, in percentuale, dell'espressione del recettore CB1, riportati nel pannello A, dopo aver sottratto il valore dell'actina.

❖ La Met-F-AEA induce l'attivazione del fenomeno apoptotico

Allo scopo di determinare il meccanismo con cui la Met-F-AEA induce un effetto antiproliferativo sulle cellule bersaglio, siamo andati a valutare l'eventuale presenza di corpi apoptotici, in seguito a trattamento con la Met-F-AEA. A tale scopo, le cellule NPA più responsive all'azione della Met-F-AEA, sono state trattate con la Met-F-AEA (10 μ M) e con l'etoposide (100 μ M) per due tempi: 24 e 48 ore e successivamente colorate con il colorante nucleare Hoechst e analizzate al microscopio a fluorescenza. Le cellule più responsive all'azione. E' possibile osservare in figura 15 la presenza di cromatina condensata e la formazione di "bolle apoptotiche" nelle cellule trattate con la Met-F-AEA (10 μ M) (pannelli B-C). Un simile livello di corpi apoptotici è stato osservato nelle cellule NPA trattate con l'etoposide (100 μ M) (pannelli D-E); al contrario, nessun segno di apoptosi è stato osservato nelle cellule non trattate (pannello A).

Per confermare che la morte cellulare indotta dal trattamento con la Met-F-AEA si esplicasse attraverso l'attivazione del processo apoptotico, abbiamo analizzato il coinvolgimento della proteina parp-1, noto "marker" di apoptosi (38). Nella figura 16 sono riportati i livelli di espressione di parp-1 (pannello A) e dell'actina (pannello B). Nel pannello A, si osserva un decremento dei livelli della proteina parp-1 già dopo 24 ore dal trattamento con la Met-F-AEA e tale segnale scompare dopo 48 e 72 ore di

trattamento. In accordo con dati riportati in letteratura, la diminuzione dei livelli di espressione di parp-1 induce ad affermare che il trattamento con la Met-F-AEA, su cellule NPA, attiva il processo apoptotico (39).

❖ **La Met-F-AEA induce l'attivazione della proteina p53**

Per identificare il possibile meccanismo con cui la Met-F-AEA svolge la sua azione citotossica sulle cellule tiroidee umane abbiamo analizzato i livelli di espressione della proteina p53, noto regolatore del ciclo cellulare (40). A tale scopo, abbiamo trattato le cellule più responsive all'azione di tale farmaco, le cellule NPA, con la Met-F-AEA (10 μ M) per 24 e 48 ore e con l'etoposide (100 μ M). Nella figura 17, pannello A, sono riportati i livelli di espressione dell'actinina. Nel pannello B, si osserva un incremento della proteina p53, dopo 24 ore dal trattamento con la Met-F-AEA. L'aumento dei livelli di p53 indicano la presenza di danno cellulare. Dopo 48 ore l'espressione della p53 ritorna ai valori basali, mentre le cellule trattate con l'etoposide, sostanza normalmente utilizzata come controllo positivo di apoptosi, mostrano a 24 ore l'attivazione della proteina p53 (41).

❖ **L'analisi delle principali proteine coinvolte nel ciclo cellulare**

E' noto che la progressione del ciclo cellulare è un meccanismo complesso, regolata dalle cicline, dalle chinasi cicline dipendenti (CDK) e da famiglie di proteine inibitorie delle CDK (42).

Per analizzare ulteriormente l'effetto della Met-F-AEA sul ciclo cellulare siamo andati a valutare i livelli d'espressione degli inibitori del ciclo cellulare p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} e della ciclina A. Le cellule NPA sono state trattate con la Met-F-AEA (10 μ M) ai seguenti tempi: 3, 6 e 24 ore. Il pannello A della figura 18 riporta i livelli d'espressione dell'actina. Il pannello B, invece, riporta i valori osservati per l'espressione della proteina p21^{CIP1/WAF1}. E' possibile osservare che i livelli d'espressione della proteina p21^{CIP1/WAF1} aumentano già a 3 ore dopo il trattamento con la Met-F-AEA (10 μ M), e restano più alti rispetto al controllo non trattato fino a 6 ore di trattamento, per poi decrescere fino a raggiungere i livelli iniziali. Il pannello C riporta i livelli d'espressione della proteina p27^{KIP1}. Si osserva un incremento dei livelli della proteina p27^{KIP1} dopo 3 ore dal trattamento con la Met-F-AEA (10 μ M); tali livelli raggiungono un valore massimo dopo 24 ore dal trattamento. Il pannello D

riporta i livelli d'espressione della ciclina A. Si osserva un forte decremento dei livelli della ciclina A dopo 3 ore, tale valore pur aumentando a 6 ore rimane sempre inferiore al controllo, mentre a 24 ore dal trattamento con la Met-F-AEA (10 μ M) si osserva un notevole aumento.

I dati presentati finora, che mostrano l'incremento dei livelli delle proteine p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} e il contemporaneo decremento della ciclina A, ci inducono a pensare che vi sia un blocco del ciclo cellulare dovuto all'attivazione degli inibitori p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}, con conseguente inattivazione dei complessi ciclina-CDK, necessari per il passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare (43, 44).

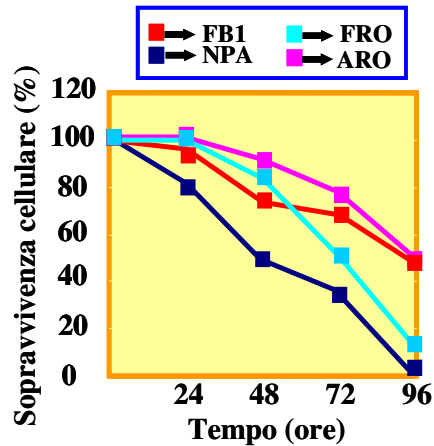


Figura 11: Effetto citotossico della Met-F-AEA.

Le linee cellulari NPA, ARO, FRO, FB1 sono state incubate con la Met-F-AEA per 24-48-72-96 ore. Cellule non trattate hanno rappresentato il nostro controllo negativo. I dati mostrati in figura rappresentano la media (\pm SD) di 3 esperimenti eseguiti indipendentemente ed in triplicato.

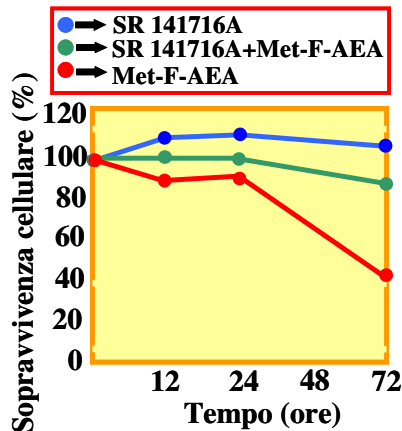


Figura 12: Effetto dell'antagonista selettivo del recettore CB1, SR141716A.

Le cellule NPA sono state trattate per 12, 24, 72 ore con il solo SR141716A (0,2 μ M), con la sola Met-F-AEA (5 μ M) e con la combinazione dei due farmaci: SR141716A (0,2 μ M)+ Met-F-AEA (5 μ M). I dati mostrati in figura rappresentano la media (\pm SD) di 3 esperimenti eseguiti indipendentemente ed in triplicato.

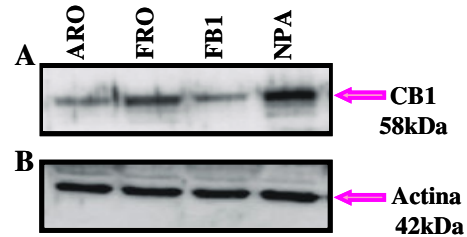


Figura 13: Livello di espressione del recettore CB1 mediante western-blot.

Pannello A: E' indicato il livello di espressione del recettore CB1.

Pannello B: Analisi dei livelli di espressione dell'actina

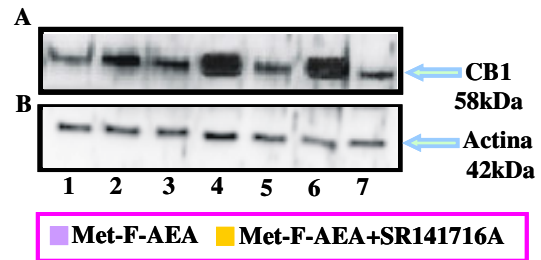


Figura 14: Regolazione dei livelli di CB1.

100 μ g di lisato proteico sono stati caricati su SDS-PAGE al 12% e poi trattati con gli anticorpi anti-CB1 (pannello A) e anti-actina (pannello B). Sono rappresentate cellule non trattate (canale 1), trattate per 6-24-48ore con Met-F-AEA (10 μ M) (canali 2, 4, 6) e con la combinazione delle due sostanze: Met-F-AEA (10 μ M) ed SR141716A (0,1 μ M) (canali 3, 5, 7). Il pannello C mostra i valori in % dei livelli di espressione del recettore CB1 calcolati rispetto al controllo non trattato ed utilizzando l'actina per la normalizzazione.

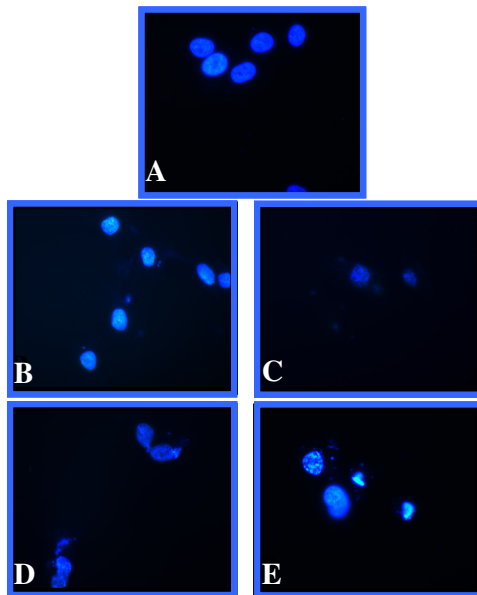


Figura 15: Formazione di corpi apoptotici in cellule NPA.

La normale morfologia delle cellule non trattate è stata usata come controllo negativo (pannello A). I dati mostrano corpi apoptotici in cellule NPA trattate con la Met-F-AEA (10μM) (pannelli B e C) e con l'etoposide (pannelli D ed E) per 24 e 48 ore.

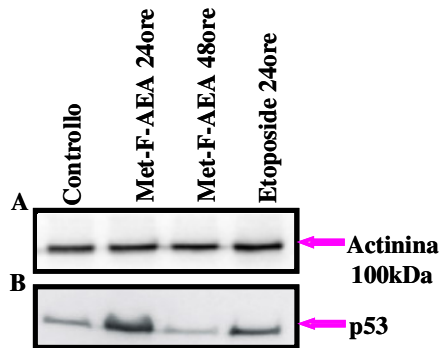


Figura 17: Analisi della proteina p53 in cellule NPA trattate con la Met-F-AEA.

Cellule NPA sono state trattate per 24-48ore con la Met-F-AEA e 100μg di lisato proteico sono stati caricati su un SDS-PAGE al 12% e poi trattati con gli anticorpi anti-actinina (pannello A) e anti-p53 (pannello B).

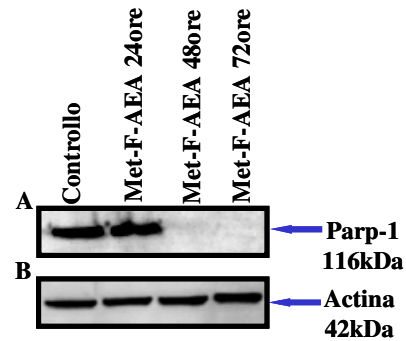


Figura 16: Analisi della proteina parp-1.

Cellule NPA sono state trattate per 24-48-72ore con la Met-F-AEA, 100μg di lisato proteico sono stati caricati su un SDS-PAGE al 10% e poi trattati con gli anticorpi anti-parp-1 (116kDa) (pannello A) e anti-actina (pannello B).

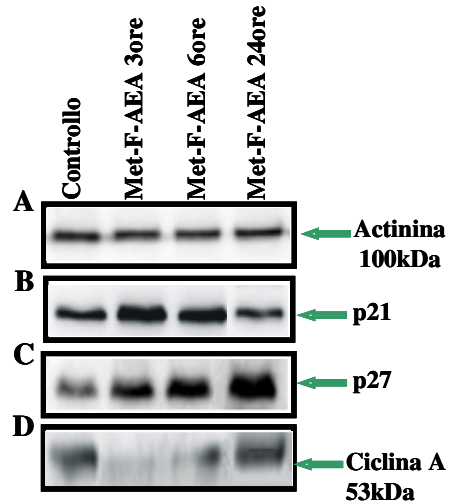


Figura 18: Analisi delle proteine p21, p27, ciclina A.

Cellule NPA sono state trattate, per i tempi indicati, con la Met-F-AEA e 100μg di lisato proteico sono stati caricati su un SDS-PAGE al 12,5% e poi trattati con gli anticorpi anti-actinina (pannello A), anti-p21 (pannello B), anti-p27KIP1 (pannello C), anti-ciclina A (pannello D).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'elevata incidenza, negli ultimi decenni, dei carcinomi umani ha reso necessario lo sviluppo di nuovi farmaci capaci di interferire con la crescita di tali neoplasie. Fino ad oggi però, nonostante i notevoli progressi ottenuti nella terapia antineoplastica, per i tumori poco differenziati della tiroide, né la radioterapia, né la chemioterapia risultano efficaci. Recentemente l'utilizzo di farmaci derivanti dalle piante sta avendo sempre maggiore rilevanza nella chemioterapia antineoplastica.

Parte del mio lavoro di tesi è stato quindi quello di caratterizzare in linee cellulari derivati da carcinomi tiroidei umani a diverso grado di malignità, gli effetti antineoplastici della Met-F-AEA, un analogo metabolicamente stabile dell'anandamide, e di un antagonista del recettore CB1, l'SR141716A, per poter valutare il loro effetto regolatorio sulla proliferazione cellulare e quindi sulla crescita tumorale.

Abbiamo osservato che la Met-F-AEA è citotossica e tale effetto varia dal 50% al 97% in rapporto alla linea cellulare tumorale analizzata. In particolare, è stato possibile osservare che l'effetto inibitorio della Met-F-AEA era correlato con l'espressione endogena del recettore CB1. Le cellule derivanti da un carcinoma papillifero poco differenziato (NPA) e quelle derivanti da un carcinoma anaplastico tiroideo umano (FRO) sono, fra quelle analizzate, le linee cellulari che presentano un maggiore livello di espressione del recettore CB1, e sono anche le più responsive all'azione della Met-F-AEA.

Abbiamo osservato che il trattamento con la Met-F-AEA incrementa i livelli di espressione del recettore CB1; mentre l'antagonista di CB1, SR141716A, non presenta alcun effetto citotossico sulla proliferazione cellulare e reverte sia l'azione citotossica indotta dalla Met-F-AEA (figura 12) che l'effetto della Met-F-AEA sulla regolazione dell'espressione del recettore CB1 (figura 14).

Accertato l'effetto inibitorio svolto dalla Met-F-AEA abbiamo cercato di identificarne il meccanismo d'azione sulle cellule bersaglio, e abbiamo analizzato l'eventuale attivazione del fenomeno apoptotico ed il coinvolgimento della proteina p53.

Al fine di analizzare il corretto funzionamento del ciclo cellulare abbiamo quindi studiato l'espressione delle cicline A e delle proteine inibitorie delle cicline chinasi dipendenti (CDK) p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}. E' noto che tali inibitori una volta attivati inibiscono i complessi cicline-CDK, essenziali nella progressione nel ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S (43, 44).

La nostra analisi ha evidenziato che i livelli d'espressione della proteina p21^{CIP1/WAF1} incrementano 3 ore dopo il trattamento con la Met-F-AEA (10µM), e restano più alti rispetto al controllo non trattato fino a 6 ore di trattamento, per poi decrescere; mentre i livelli di espressione della proteina p27^{KIP1} aumentano già a 3 ore dopo il trattamento con la Met-F-AEA (10µM) e raggiungono un valore massimo dopo 24 ore dal trattamento. In concomitanza con l'aumento delle proteine p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} si osserva un decremento dei livelli della ciclina A dopo 3 e 6 ore dal trattamento con la Met-F-AEA (10µM).

L'incremento dei livelli delle proteine p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1} e il contemporaneo decremento dei livelli della ciclina A ci conducono a pensare che vi sia un blocco del ciclo cellulare dovuto all'attivazione degli inibitori p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}, che inibiscono i complessi cicline-CDK, non permettendo non solo la fosforilazione di substrati ma anche l'aumento delle cicline.

In conclusione, i risultati ottenuti *in vitro* sull'effetto antiproliferativo della Met-F-AEA, pur non avendo ancora definito completamente il meccanismo d'azione, ci inducono a pensare di poter utilizzare il recettore CB1 come possibile bersaglio terapeutico per la cura dei tumori umani poco differenziati della tiroide.

SEZIONE III

✓ **Immunoagenti diretti contro il recettore tirosin-chinasico ErbB2**

INTRODUZIONE GENERALE

Attualmente, la cura delle neoplasie maligne è ancora basata, nella maggior parte dei casi, sull'impiego di farmaci citotossici, la cui azione mira direttamente a danneggiare il DNA o ad inibire la duplicazione cellulare provocando la morte in maniera aspecifica sia delle cellule tumorali, sia delle cellule normali in fase di replicazione. La mancanza di specificità d'azione dei chemioterapici, è alla base della considerevole tossicità che fa seguito alla loro somministrazione. Questo bagaglio d'effetti indesiderati non è sempre controbilanciato da una soddisfacente remissione della malattia neoplastica, soprattutto nei tumori solidi in fase avanzata. Un altro limite della chemioterapia è il rischio che le cellule diventino resistenti alla cura sviluppando la "multi drug resistance" (MDR) (45).

Per ricercare farmaci selettivi che non presentassero aspecificità, da alcuni anni, si sta sviluppando la possibilità di utilizzare l'immunoterapia nella lotta contro il cancro. Un valido "tumor associated antigen" è il recettore transmembrana tirosin-chinasico ErbB2 (figura 19), omologo del recettore del fattore di crescita epidermica (EGFR) (46). Esso è espresso ad elevati livelli sulla superficie di cellule di carcinoma della mammella, dell'ovaio e del polmone (47), come anche su linee cellulari derivate da tumori gastrici e delle ghiandole salivari (48) ed è implicato nello sviluppo della malignità di questi tumori. La sua iper-espressione, infatti, su cellule tumorali, causata da amplificazione genica, può generare fino a 2×10^6 molecole per cellula, mentre è scarsamente presente su cellule normali (49). Come la maggior parte dei recettori tirosin-chinasici, ErbB2 presenta un dominio extracellulare, connesso, attraverso una regione idrofobica transmembrana, ad un dominio citoplasmatico dove risiede l'attività enzimatica tirosin-chinasica. È stato dimostrato che ErbB2 induce la proliferazione delle cellule tumorali mediante la trasduzione all'interno delle cellule di segnali mitogenici extracellulari. La trasduzione dipende dalla formazione di eterodimeri di ErbB2 con altri recettori della stessa famiglia. A ciò segue una variazione conformazionale del dominio extracellulare di ErbB2, che determina l'attivazione dell'attività chinasica del dominio citoplasmatico e la fosforilazione di

specifici residui di tirosina situati nella porzione intracellulare del recettore. Tali residui di tirosina, una volta fosforilati, diventano siti di legame per proteine intracellulari che trasmettono attraverso reazioni a cascata di fosforilazione i segnali mitogenici al nucleo (50).

L'alta specificità e affinità di legame degli anticorpi per l'antigene hanno fatto ritenere a diversi gruppi di ricerca che essi potessero costituire un ottimo mezzo per ottenere un effetto terapeutico mirato. Da questi presupposti è derivato il recente sviluppo dell'immunoterapia, che si è dimostrata una valida ed efficace strategia per la terapia del cancro. In particolare gli anticorpi, in grado di riconoscere bersagli specifici espressi sulla superficie delle cellule tumorali, possono essere utilizzati come agenti selettivi per le cellule neoplastiche (51, 52). Diversi gruppi di ricerca hanno isolato anticorpi monoclonali da topi o ratti contro il dominio extracellulare di ErbB2, che sono risultati capaci di inibire la crescita tumorale interferendo con la trasduzione del segnale (53). Un possibile meccanismo, con cui tali anticorpi monoclonali sono capaci di inibire la crescita di cellule tumorali, prevede l'induzione dell'omodimerizzazione di ErbB2, l'endocitosi in vescicole rivestite di clatrina e la sua successiva degradazione, ciò che comporta la riduzione della densità del recettore ErbB2 sulla superficie cellulare (54). Al contrario, gli eterodimeri, che si generano in assenza di anticorpi, sfuggono a tale destino e ritornano sulla superficie cellulare (figura 20). A differenza degli altri recettori della stessa famiglia che formano omodimeri in seguito al legame del rispettivo ligando, evento richiesto per la loro successiva degradazione, il recettore ErbB2 è privo di un ligando naturale e pertanto non forma spontaneamente omodimeri. Alcuni anticorpi anti-ErbB2 invece, grazie alla loro natura bivalente, possono legare simultaneamente due molecole di recettore e quindi indurre la formazione di omodimeri (54). In particolare, l'omodimerizzazione comporta la fosforilazione di taluni residui di tirosina di ErbB2 (53), che consentono il reclutamento della proteina ubiquitina-ligasi c-Cbl (figura 21). Il legame di c-Cbl induce la poli-ubiquitinazione di ErbB2 e la sua successiva degradazione (55). La degradazione di ErbB2 indotta dagli anticorpi, non è tuttavia il loro unico possibile meccanismo di inibizione della crescita tumorale. Altri possibili

meccanismi d'azione degli anticorpi antitumorali sono rappresentati dalla loro capacità di indurre la citotossicità dipendente da ADCC e CDC (56, 57).

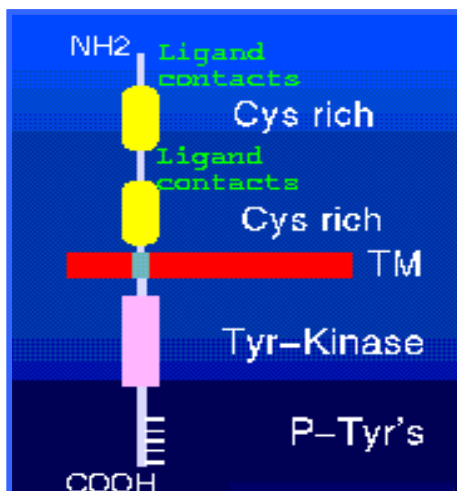


Figura 19: Rappresentazione della struttura del recettore ErbB2.

Nella figura è possibile osservare la porzione extracellulare (in giallo), la porzione transmembrana (in rosso) e quella intracellulare dotata di attività tirosin-chinasica (in rosa).

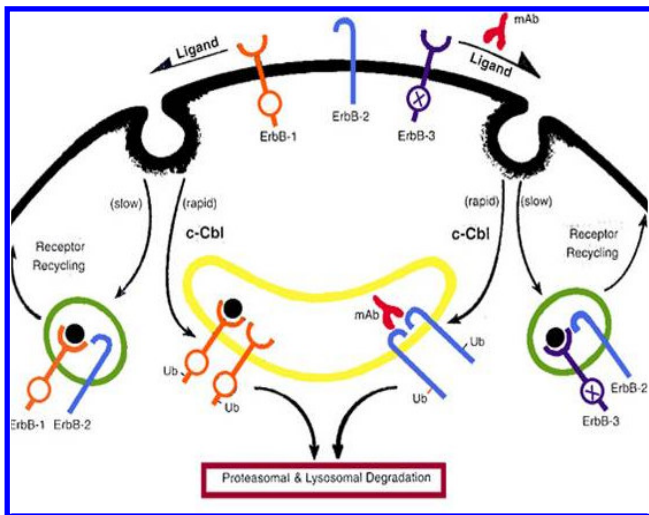


Figura 20: Destino di ErbB2.

Il diverso destino dei recettori ErbB in seguito all'eterodimerizzazione o all'omodimerizzazione.

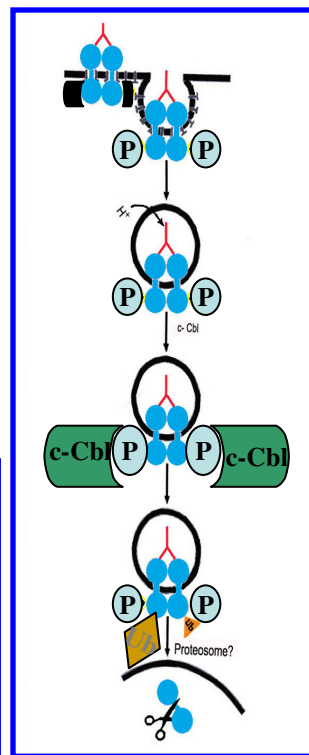


Figura 21: Meccanismo di induzione della degradazione del recettore ErbB2 mediata da anticorpi bivalenti.

SEZIONE III A

✓ **Anticorpo compatto antitumorale umano (Erb-*hc*-Ab)**

INTRODUZIONE

Uno dei principali limiti all'impiego degli anticorpi monoclonali come agenti immunoterapici, consiste nella loro natura non umana, che potrebbe comportare l'insorgenza di una risposta immunitaria (HAMA, human anti-mouse antibody response), in caso di somministrazione nell'uomo. Un progresso in tale campo è derivato dallo sviluppo della tecnologia di "umanizzazione" degli anticorpi (58), che presentano il vantaggio di una ridotta immunogenicità. Un esempio di anticorpo monoclonale così ingegnerizzato, diretto contro anti-ErbB2, è Herceptin, attualmente impiegato per il trattamento del carcinoma mammario (59); il cui limite principale risulta però essere la sua elevata cardiotossicità (60). Esistono altri problemi correlati all'impiego d'anticorpi nella terapia farmacologica, rappresentati da: risposte immunitarie anche contro anticorpi umanizzati (61), bassa efficienza delle funzioni effettrici ed elevate dimensioni molecolari (circa 155kDa) che limitano la loro capacità di penetrare nelle masse tumorali. Un importante contributo innovativo in tal senso è stato apportato dalla tecnologia del "phage display" (62), che ha consentito l'isolamento di scFv umani (63), frammenti anticorpali di ridotte dimensioni, e di interi anticorpi umani (64) diretti contro antigeni tumorali.

I requisiti per la creazione di un efficiente immunoagente antitumorale sono:

1. origine interamente umana;
2. alta affinità per uno specifico antigene tumorale;
3. dimensioni molecolari più adatte per applicazioni terapeutiche;
4. capacità di inibizione della crescita di cellule bersaglio;
5. efficienti funzioni effettrici.

Da tali considerazioni è derivata l'esigenza di produrre nel laboratorio del prof. G. D'Alessio un nuovo anticorpo umano antitumorale (65), ottenuto da un scFv umano specifico per ErbB2 chiamato Erbicina, già di per sé dotato di attività antiproliferativa (6), e da un frammento Fc umano. Tale anticorpo è stato definito compatto in quanto è privo dei domini costanti CH₁ e CL, ed è quindi caratterizzato da ridotte dimensioni molecolari, che possono risultare vantaggiose per un'efficiente diffusione nelle masse

tumorali (figura 22). Il cDNA codificante il prodotto di fusione è stato clonato nel vettore Signal pIgPlus ed espresso in cellule di criceto CHO come dimero di due subunità unite da ponti disolfurici, presenti nella regione “hinge” dell’anticorpo. L’impiego di questo sistema d’espressione in cellule di mammifero è stato scelto per consentire una glicosilazione dell’anticorpo simile a quella di un anticorpo umano. Infatti, la glicosilazione è una modifica post-traduzionale che assicura all’immunoglobulina un’efficiente interazione con le cellule effettrici del sistema immunitario e con il primo componente della cascata del complemento. Da ciò consegue l’importanza che essa risulti quanto più possibile simile a quella degli anticorpi umani, sia per consentire l’instaurarsi di tali interazioni, sia per evitare indesiderate reazioni immunitarie. Questo anticorpo è stato definito Erb-*hcAb* (anti-ErbB2, human, compact, Antibody) e rappresenta il primo anticorpo compatto anti-ErbB2 di natura interamente umana ed è risultato capace: di legare selettivamente e con elevata affinità ($K_d=1nM$) cellule ErbB2-positive; di inibire selettivamente la crescita di cellule tumorali ErbB2-positive; di indurre apoptosi; di indurre efficientemente la lisi mediata dai linfociti delle sole cellule ErbB2-positive; di attivare la cascata del complemento causando la lisi delle cellule ErbB2-positive (proprietà non riscontrata con Herceptin) (65).

Infine, essendo dotato di dimensioni intermedie (100 kDa), l’anticorpo compatto potrebbe superare sia i limiti degli scFv (27 kDa), quali la rapida eliminazione dalla circolazione ematica e la natura monovalente di tali frammenti anticorpali, sia quelli degli anticorpi interi (155 kDa), come la scarsa capacità di diffusione nelle masse tumorali, combinando le caratteristiche più vantaggiose di entrambi, quali: un’efficiente permeazione delle masse tumorali, maggior tempo di ritenzione nelle masse tumorali e prolungato tempo di vita nella circolazione ematica.

Tutte queste caratteristiche presenti in Erb-*hcAb* ci hanno fatto pensare che potesse essere un buon anticorpo per potenziali applicazioni terapeutiche per cui abbiamo cercato di valutare il suo meccanismo d’azione.

MATERIALI E METODI

1. Reagenti

BSA e 3,3',5,5' tetrametilbenzidina sono state acquistate dalla Sigma (Louis, MO). Gli anticorpi: anti-ciclina D1, anti-ErbB2, anti-p16, anti-pRb sono stati acquistati dalla Santa Cruz.

2. Linee cellulari e colture cellulari

Le linee cellulari A-431 ed SKBR3 sono state propagate come riportato in Materiali e Metodi, SEZIONE I. La linea cellulare MDA-MB361: ottenuta da un tumore della mammella (66), fornita gentilmente dal dr. N. Normanno dell'Istituto per lo studio e la cura dei tumori di Napoli "G. Pascale", è stata propagata in RPMI e FBS al 10%. La linea cellulare AG12 o TUBO: ottenuta da tumori sviluppati in topi transgenici per il recettore ErbB2 di ratto è stata stabilizzata in coltura presso il laboratorio del prof. G. Forni dell'Università di Torino, dal quale è stata gentilmente fornita (67). Le cellule TUBO sono state propagate in terreno DMEM e FBS al 20%. La linea cellulare ZR-75: ottenuta da un carcinoma della mammella (68), è stata un gentile omaggio del prof. C. Abbondanza della S.U.N.

3. Saggio di vitalità cellulare: Trypan Blue

Abbiamo piastrato 3×10^3 cellule ZR-75, MDA-MB361, SKBR3 e $1,5 \times 10^3$ cellule A431 per pozzetto, in una multiwell da 96; tale esperimento è stato eseguito in triplicato. Dopo 24 ore dal piastramento, abbiamo aggiunto Erb-*hcAb* ed Herceptin alla concentrazione di 200nM al terreno di coltura; le cellule poi sono state incubate per 72 ore. Terminato il trattamento abbiamo eseguito tale saggio come riportato nei Materiali e Metodi, SEZIONE I.

4. Saggio ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay)

I saggi di legame degli immunoagenti al recettore sono stati effettuati su linee cellulari esprimenti livelli diversi del recettore ErbB2. Le cellule sono state trasferite in piastre da 96 pozzetti a fondo conico, alla densità di 100.000 cellule per pozzetto in PBS contenente BSA al 3%. Le cellule sono state preincubate con o senza Erb-*hcAb* a concentrazioni crescenti (5-10-20 nM) per 1 ora e 30 minuti a 25°C in PBS contenente BSA al 3%. Dopo 3 lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate con l'anticorpo anti-Fc umano, coniugato alla perossidasi di rafano, diluito 1:1000 in PBS

e BSA 3%, per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione. Dopo 3 lavaggi in PBS, sono state incubate le cellule per 5 minuti con il substrato della perossidasi 3,3',5,5' tetrametilbenzidina. La reazione enzimatica è stata arrestata con l'aggiunta di HCl 1N e la lettura è stata effettuata ad un valore di assorbanza pari a 450 nm.

5. Determinazione della concentrazione proteica (Vedi SEZIONE II).

6. Analisi elettroforetica di proteine mediante gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE) (Vedi SEZIONE II).

Per la determinazione di ErbB2 è stato preparato un gel di poliacrilammide SDS-PAGE al 7,5%, per pRb al 10% e per la ciclina D1 al 12%.

7. Western blotting (Vedi SEZIONE II).

8. Induzione dei tumori nei topi e loro trattamento con Erb-hcAb.

Topi femmine di 6 settimane Balb/cAnNCrIBR (Charles River, Calco, Italia). 5×10^5 cellule TUBO sono state risospese in 200 μ l di PBS ed iniettate sotto cute (giorno zero). Dopo 15 giorni, i topi sono stati divisi in 2 gruppi. Al 16° giorno Erb-hcAb, solubilizzato in PBS, è stato somministrato per 7 volte, ad intervalli di 72 ore nell'aria peritumorale in dosi di 2,5 μ g/g di peso corporeo. Il gruppo di topi utilizzato come controllo è stato trattato con ugual volume di PBS sterile.

Topi femmine di 5 settimane Balb/cByJlco-nu/nu. 5×10^5 cellule MDA-MB361 sono state risospese in 200 μ l di PBS ed iniettate sotto cute (giorno zero). Dopo 11 giorni, Erb-hcAb, solubilizzato in PBS, è stata somministrato per 7 volte, ogni 72 ore nell'aria peritumorale in dosi di 1,5mg/Kg di peso corporeo. Dosi equimolari di Herceptin (2,25mg/Kg di peso corporeo) sono state somministrate nell'area peritumorale ad un secondo gruppo di animali. Un altro gruppo è stato utilizzato come controllo e trattato con ugual volume di PBS sterile.

Durante il periodo di trattamento, il volume della massa tumorale (V) è stato misurato e calcolato con la formula dell'ellissoide rotazionale: $V = A \times B^2 / 2$ (dove A è il diametro assiale, B è il diametro rotazionale). Gli esperimenti con gli animali sono stati effettuati nello stabulario del Dipartimento di Patologia Cellulare e Molecolare dell'Università di Napoli in accordo con le leggi italiane per la sperimentazione animale e seguendo gli standard richiesti dall'UKCCCR (69).

RISULTATI

▪ **Analisi dell'affinità di Erb-*hcAb* mediante saggi ELISA**

Come prima cosa abbiamo determinato i livelli di espressione del recettore tirosin-chinasico ErbB2 in diverse linee cellulari (A431, MDA-MB361, SKBR3 e ZR-75); come mostrato in figura 23. Il dato ottenuto mediante la tecnica del western blot mostra una maggiore espressione nelle linee cellulari derivanti dai carcinomi mammari umani SKBR3 ed MDA-MB361. Invece, la linea cellulare ZR-75 presenta un livello endogeno del recettore ErbB2 molto basso e paragonabile a quello espresso dalle A431.

Per eseguire i saggi ELISA, sono state utilizzate cellule SKBR-3 che esprimono il recettore ErbB2 ad alti livelli e cellule A431 che, al contrario, presentano bassissimi livelli e pertanto costituiscono un appropriato controllo negativo (65). Abbiamo quindi valutato l'affinità di Erb-*hcAb* sia su tali linee cellulari che su cellule MDA-MB361 e ZR-75. Tutte le linee cellulari citate sono state preincubate con o senza Erb-*hcAb* a concentrazioni crescenti (5-10-20nM). Quindi abbiamo effettuato un'incubazione con l'anticorpo anti-Fc umano, coniugato alla perossidasi di rafano. Quest'ultima dà luogo ad una reazione colorimetrica che consente di valutare l'entità del legame alle cellule. Come si può osservare nella figura 24, Erb-*hcAb* lega le cellule MDA-MB361 con elevata affinità che risulta simile a quella presente nelle cellule SKBR-3, nostro controllo positivo. Invece, con le cellule ZR-75 l'affinità risulta simile a quella del nostro controllo negativo. Tali risultati sono in accordo con quanto osservato utilizzando la metodica del western blot, infatti il legame di Erb-*hcAb* con le linee cellulari analizzate risulta direttamente proporzionale ai livelli d'espressione del recettore ErbB2.

▪ **Effetto antiproliferativo di Erb-*hcAb* su cellule ErbB2-positive**

Per valutare l'attività anti-proliferativa dell'anticorpo compatto umano Erb-*hcAb* abbiamo compiuto saggi di citotossicità su linee cellulari esprimenti diversi livelli di ErbB2. Come è possibile osservare in figura 25, Erb-*hcAb* (200nM) esercita un effetto anti-proliferativo sia sulle cellule SKBR-3 che MDA-MB361, cioè sulle linee cellulari che iper-esprimono ErbB2 e tale effetto è maggiore se paragonato a quello indotto dal trattamento con Herceptin (200nM). Non si osseva alcun effetto

significativo sulle linee cellulari ErbB2 negative A431 e ZR75. Si può quindi concludere che Erb-*hcAb* è dotato di effetto antiproliferativo su più linee cellulari ErbB2-positive.

▪ **Attività antitumorale *in vivo* di Erb-*hcAb***

Alla luce dei risultati ottenuti *in vitro*, abbiamo pensato di analizzare il potenziale antitumorale di Erb-*hcAb in vivo* su animali di piccola taglia. Gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando topi specifici per ciascuna linea cellulare analizzata. Topi Balb/cAnNCrIBR sono stati inoculati con cellule TUBO, come riportato nei in Materiali e Metodi, SEZIONE III A. Dopo 15 giorni, quando il tumore risultava ben visibile in tutti i topi erano suddivisi in due gruppi omogenei di 5 ciascuno, di cui il primo era utilizzato come controllo per seguire lo sviluppo del tumore ed il secondo impiegato per il trattamento con l'anticorpo compatto. In particolare, si è proceduto alla somministrazione, in un'area distante dalla massa tumorale, di sette dosi a intervalli di 72 ore, di 2,5µg di Erb-*hcAb* per grammo di peso corporeo. Come si può osservare in figura 26, sette somministrazioni di Erb-*hcAb* inibivano efficacemente nei topi trattati lo sviluppo dei tumori, che crescevano invece in modo esponenziale nei topi di controllo non trattati. Durante il periodo di trattamento, gli animali non hanno presentato segni visibili di tossicità. Ulteriori studi *in vivo* sono stati condotti per valutare il potenziale antitumorale di Erb-*hcAb* paragonandolo con quello indotto da Herceptin. Per effettuare tali esperimenti sono stati utilizzati topi Balb/cByJlconu/nu inoculati con cellule MDA-MB361. Dopo 11 giorni, Erb-*hcAb*, solubilizzato in PBS, è stata somministrato per 7 volte ad intervalli di 72 ore nell'aria peritumorale in dosi di 1,5mg/Kg di peso corporeo. Dosi equimolari di Herceptin (2,25mg/Kg di peso corporeo) sono state somministrate nell'area peritumorale ad un altro gruppo di animali. In figura 27 è possibile osservare che l'effetto antitumorale indotto da Erb-*hcAb* era maggiore rispetto a quello causato dalla somministrazione di Herceptin.

Dai risultati ottenuti si può concludere che Erb-*hcAb* esercita un potente effetto antiproliferativo anche *in vivo* e può quindi rappresentare un potenziale agente antitumorale.

▪ **Meccanismo d'azione di Erb-*hcAb***

Dati recenti da noi pubblicati hanno dimostrato che in seguito a trattamento, delle cellule ErbB2-positivo SKBR3, con Erb-*hcAb* si otteneva un blocco del ciclo cellulare in fase G1 (70).

E' noto che la proteina p16 è un inibitore specifico delle chinasi ciclina D-dipendenti in quanto in grado di legarsi direttamente a cdk4 e cdk6 (71). Le cicline D si legano alle cdk4 o cdk6 ed i risultanti complessi agiscono fosforilando un potente inibitore della crescita, la proteina oncosoppressore del retinoblastoma (Rb) (72). Questo processo elimina l'azione frenante di Rb e permette alle cellule di avvicinarsi verso la fase S.

Quindi, per meglio definire l'effetto anti-proliferativo di Erb-*hcAb* su cellule ErbB2-positivo, siamo andati a valutare, attraverso western blot, la regolazione dell'inibitore p16, della ciclina D1 e della proteina fosforilata Rb (pRb), in seguito a trattamento per 48 ore con Erb-*hcAb* (200nM) e con Herceptin (200nM); nostro controllo positivo (73). La figura 28 mostra un decremento, rispetto al controllo non trattato, dei livelli d'espressione della ciclina D1 (pannello B), in seguito a trattamento sia con Erb-*hcAb* che con Herceptin. Parallelamente, è possibile osservare un aumento dell'inibitore del ciclo cellulare p16 (pannello C). Inoltre, nella figura 29, si osserva una riduzione significativa dei livelli di espressione della forma fosforilata della proteina Rb.

Tali risultati integrano ed avvalorano dati precedentemente ottenuti secondo cui Erb-*hcAb* induceva un blocco del ciclo cellulare in fase G1 (70).

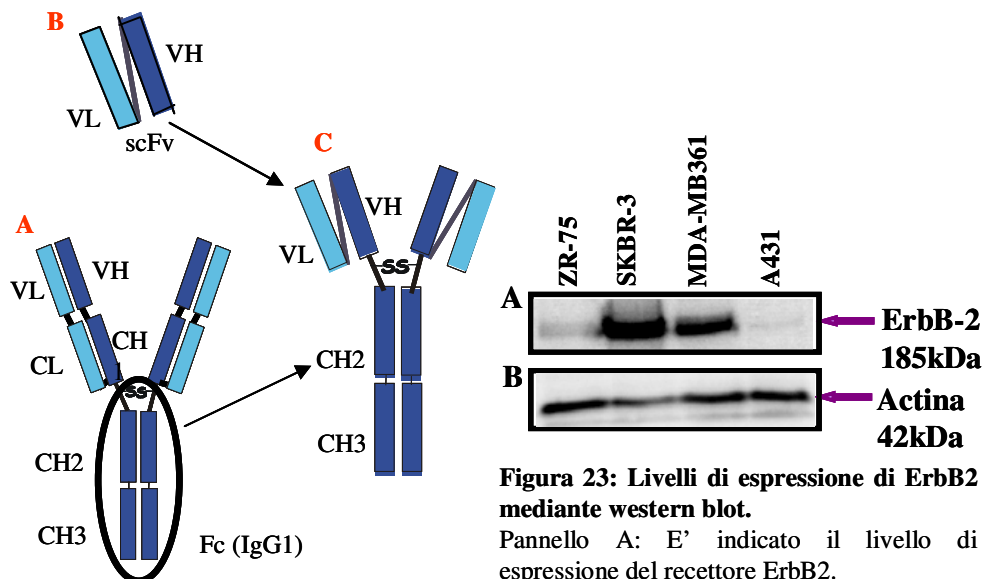


Figura 22: Erb-hcAb.

Costruzione dell'anticorpo compatto umano (pannello C), derivato da Erbicin, l'scFv anti-ErbB2 di origine umana (pannello B) e dalla porzione Fc di una IgG umana (pannello A).

Figura 23: Livelli di espressione di ErbB2 mediante western blot.

Pannello A: E' indicato il livello di espressione del recettore ErbB2.

Pannello B: Analisi dei livelli di espressione dell'actina.

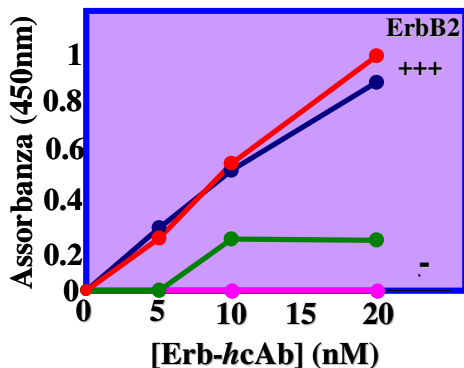


Figura 24: Affinità di legame tra Erb-hcAb su linee cellulari esprimenti diversi livelli di ErbB2.

Le linee cellulari SKBR-3 (●), MDA-MB361 (●), ZR-75 (●) e A431 (●) sono state incubate con concentrazioni crescenti di Erb-hcAb. I livelli di espressione di ErbB2 nelle diverse linee cellulari sono indicati con i seguenti simboli: - (A431 e ZR-75), +++ (MDA-MB361 e SKBR3). I dati mostrati in figura rappresentano la media (±SD) di 3 esperimenti eseguiti indipendentemente ed in triplicato.

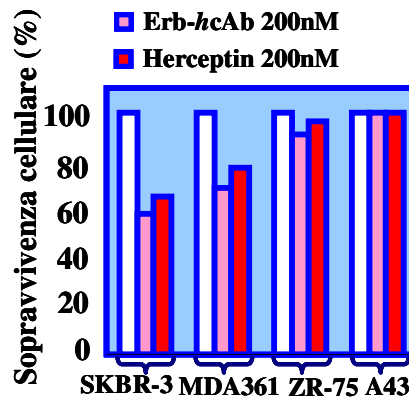


Figura 25: Effetto anti-proliferativo di Erb-hcAb.

Le linee cellulari SKBR-3, MDA-MB361, ZR-75 e A431 sono state incubate con Erb-hcAb ed Herceptin per 72 ore. Celle non trattate hanno rappresentato il nostro controllo negativo.

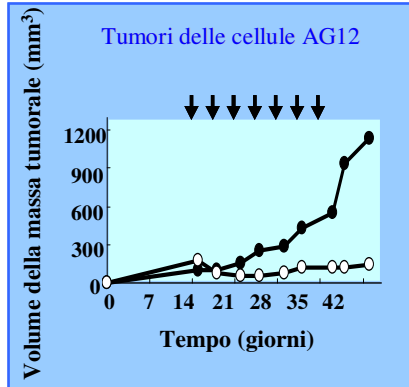


Figura 26: Effetto *in vivo* di Erb-hcAb.
La crescita della massa tumorale è stata monitorata in topi inoculati con 5×10^5 cellule TUBO. Gli animali trattati sono stati inoculati con dosi pari a 2,5mg/Kg di peso corporeo di Erb-hcAb (○). Gli animali di controllo sono stati trattati con una soluzione sterile di PBS (●). Gli inoculi sono stati effettuati per 7 volte, come indicato dalle frecce.

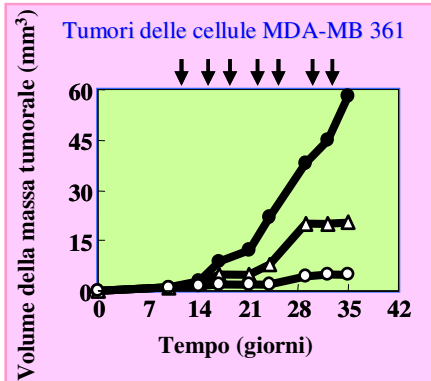


Figura 27: Effetto *in vivo* di Erb-hcAb e di Herceptin.
La crescita della massa tumorale è stata monitorata in topi inoculati con 5×10^5 cellule MDA-MB361. Gli animali trattati sono stati inoculati con dosi pari a 1,5µg/g di peso corporeo di Erb-hcAb (○) e dosi equimolari di Herceptin (△). Gli animali di controllo sono stati trattati con una soluzione sterile di PBS (●). Gli inoculi sono stati effettuati per 7 volte, come indicato dalle frecce.

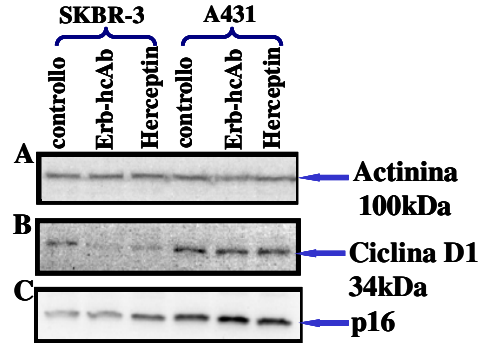


Figura 28: Analisi delle proteine p16, ciclina D1.
Pannello A: Livelli di espressione dell'actinina.
Pannello B: Livelli di espressione della ciclina D1.
Pannello C: Livello di espressione di p16.

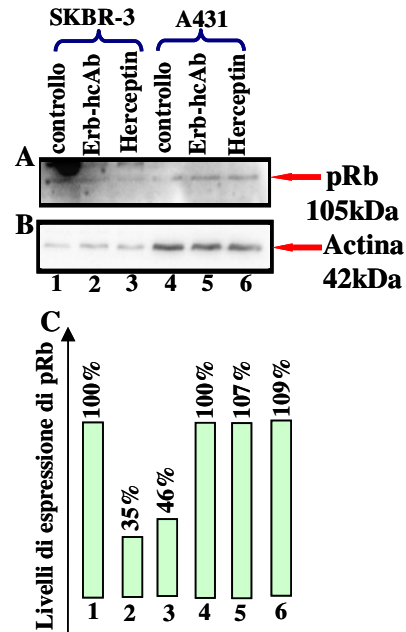


Figura 29: Analisi della proteina pRb.
Pannello A: Livelli di espressione di pRb.
Pannello B: Livelli di espressione dell'actina.
Pannello C: Valori in percentuale dei livelli di espressione di pRb calcolati rispetto al controllo non trattato ed utilizzando l'actina per la normalizzazione.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'anticorpo compatto Erb-*hcAb*, ottenuto nel laboratorio del prof. G. D'Alessio, è stato ottenuto mediante la fusione di un frammento anticorpale umano a catena singola (scFv) con la regione Fc di una immunoglobulina umana IgG1. E' dotato di dimensioni intermedie (100 kDa) tra l'scFv (27 kDa) e l'immunoglobulina intera (155 kDa), tale caratteristica può costituire un vantaggio per applicazioni terapeutiche *in vivo*. Abbiamo valutato il suo effetto antitumorale *in vitro*, il suo potenziale terapeutico *in vivo* ed abbiamo cominciato ad elucidare il suo meccanismo d'azione. Erb-*hcAb* è capace di legare le cellule ErbB2-positive con elevata affinità, inibisce la crescita *in vitro* (figura 25) ed esercita un potente effetto antiproliferativo *in vivo* più efficace di quello indotto da Herceptin (figura 27), attualmente utilizzato nella terapia antineoplastica; dimostrando perciò un notevole potenziale per applicazioni terapeutiche. E' stato dimostrato che Erb-*hcAb* è dotato delle funzioni effettrici ADCC e CDC. Inoltre, è dotato di un profilo di glicosilazione molto simile a quello presente negli anticorpi umani; ciò che può garantire un'efficiente interazione con componenti e con cellule effettrici del sistema immunitario senza provocare indesiderate reazioni immunitarie. E' poi in grado di indurre l'omodimerizzazione e la conseguente degradazione del recettore, riducendo così la traduzione dei segnali mitogenici da esso mediati (dati non mostrati) (73). I risultati ottenuti, andando ad analizzare le principali molecole coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, hanno confermato ed integrato precedenti dati ottenuti dalla Dott.ssa C. De Lorenzo secondo cui Erb-*hcAb* induce un blocco del ciclo in G1. Infatti, abbiamo osservato in seguito a trattamento con Erb-*hcAb* una riduzione dei livelli di ciclina D1, un decremento della proteina Rb fosforilata ed un incremento dell'inibitore del ciclo cellulare p16; simili risultati sono stati ottenuti utilizzando Herceptin (72). Aumentando p16 si ha un blocco della ciclina D1, questa, a sua volta, non riesce a formare il complesso con le specifiche ciclina-dipendenti chinasi e perciò non riesce a fosforilare Rb; ciò si traduce con il blocco del ciclo cellulare in G1.

Tutte le caratteristiche di Erb-*hcAb* fanno di esso un potenziale agente immunocompatibile in terapie antitumorali nell'uomo.

SEZIONE III B

✓ ImmunoRNasi (*hERB-hRnasi*)

INTRODUZIONE

Nel laboratorio del prof. G. D'Alessio, la dott.ssa C. De Lorenzo ha isolato, come descritto precedentemente, un scFv umano specifico per il recettore ErbB2. Per le sue caratteristiche peculiari l'scFv, Erbicina, costituisce anche un veicolo utile per dirigere molecole tossiche all'interno di cellule che iper-esprimono il recettore ErbB2. Inizialmente, come molecole tossiche venivano impiegate le tossine isolate da muffe, batteri o piante. Queste, pur essendo agenti citotossici molto efficaci, durante la fase di sperimentazione clinica nell'uomo hanno dato luogo all'insorgenza di gravi reazioni immunitarie e a tossicità aspecifica. Alcuni gruppi di ricercatori (74, 75) hanno cercato di ovviare a tali inconvenienti sostituendo le citotossine con ribonucleasi da mammifero, proteine normalmente non tossiche e con ridotta immunogenicità ma che, se internalizzate in cellule bersaglio, degradano gli RNA, diventando potenti agenti citotossici.

I costrutti chimerici costituiti da scFv e da ribonucleasi sono stati denominati ImmunoRNasi. Nella tabella 1 sono riportati alcuni esempi d'ImmunoRNasi. Gli studi di Newton e collaboratori (74) hanno portato alla costruzione di un anticorpo diretto contro l'antigene linfocitario CD22, legato all'onconasi, una ribonucleasi estratta da anfibi. Purtroppo, la natura non umana del costrutto può generare risposte di tipo immunitario nell'uomo. Deonarain e Epenetos (75) hanno impiegato come tossina una RNasi da mammifero: la ribonucleasi seminale bovina (BS-RNasi) che è stata legata con diversi peptidi spaziatori al frammento scFv di un anticorpo diretto contro la fosfatasi alcalina da placenta umana, un altro antigene tumorale. Ulteriori studi di Newton e collaboratori (76, 77) hanno portato alla costruzione di tre costrutti la cui porzione anticorpale era costituita dall'scFv di un anticorpo murino specifico per il recettore della transferrina (espresso su molti tipi cellulari ed in particolare sulla barriera ematoencefalica), e quella tossica era costituita da tre diverse ribonucleasi umane: l'angiogenina (76), capace di indurre la proliferazione dei vasi sanguigni, la ribonucleasi umana EDN (eosinophil-derived neurotoxin) (77), o la ribonucleasi pancreatica umana HP-RNasi (78).

Nel 2002, la dott.ssa C. De Lorenzo ha sintetizzato una nuova ImmunoRNasi costituita dalla fusione di un scFv umano, Erbicina, diretto contro ErbB2 e dall'HP-RNasi (figura 30). Abbiamo dimostrato che tale ImmunoRNasi, denominata *h*ERB-*h*RNasi, dotata di attività ribonucleasica e capacità di riconoscere selettivamente le cellule ErbB2-positive era citotossica su cellule tumorali bersaglio in colture *in vitro* (79). I dati *in vitro* ci hanno spinto ad analizzare l'effetto anche su modelli sperimentali *in vivo*. L'origine umana di entrambe le componenti anticorpali e ribonucleasica dovrebbero garantire l'immunocompatibilità dell'ImmunoRNasi per la quale si può ipotizzare un impiego come farmaco selettivo antitumorale.

ImmunoRNasi		
Bersaglio	Ribonucleasi	AUTORI
Recettore della Trasferrina	RNasi A	Newton <i>et al.</i> 2002
Posfatasi alcalina della placenta	Ribonucleasi Seminale Bovina (BS-RNase)	Deonarain and Epenetos 1998
CD 22	Onconasi	Newton and Rybak 2001
Recettore della Trasferrina	Angiogenina	Newton <i>et al.</i> 1996
Recettore della Trasferrina	Eosinophil-derived RNase (EDN)	Zewe <i>et al.</i> 1997
Recettore della Trasferrina	Ribonucleasi Pancreatica (HP-RNase)	Zewe <i>et al.</i> 1997
Recettore ErbB2	Ribonucleasi Pancreatica (HP-RNase)	De Lorenzo <i>et al.</i> 2002

Tabella 1: Schema delle ImmunoRNasi prodotte.
Le ImmunoRNasi umane sono indicate in rosso.

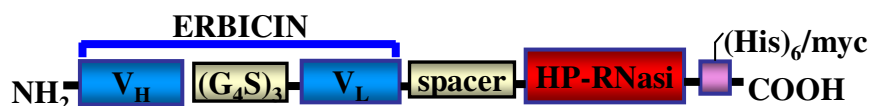


Figura 30: Rappresentazione schematica dell'ImmunoRNasi umana *h*ERB-*h*RNasi. *h*ERB-*h*RNasi è caratterizzata dall'scFv diretto contro ErbB2 (Erbicina) all'N-terminale e dalla ribonucleasi pancreatica umana (HP-RNasi) da cui è separato da un peptide spacer avente tale sequenza: (AAASGGPEGGS). A valle della ribonucleasi, al C-terminale, c'è una coda esaistidinica ed un peptide di 11 residui della proteina myc.

MATERIALI E METODI

1. Linee cellulari e colture cellulari

Le linee cellulari A-431 ed SKBR3 sono state coltivate utilizzando il terreno come riportato nei Materiali e Metodi, SEZIONE I. Le linee cellulari MDA-MB361 e TUBO sono state coltivate utilizzando il terreno come riportato nei Materiali e Metodi, SEZIONE III A. La linea cellulare MDA-MB453: ottenuta da un tumore della mammella (80), fornita dal dott. H.C. Hurst dell'Imperial College di Londra, è stata coltivata utilizzando il terreno DMEM e FBS al 10%.

2. Saggio di vitalità cellulare: Trypan Blue

Abbiamo piastrato $1,5 \times 10^4$ cellule MDA-MB361, MDA-MB453, SKBR3, TUBO e 7×10^3 cellule A431 per pozzetto, in una multiwell da 96; tale esperimento è stato eseguito in triplicato. Abbiamo aggiunto *h*ERB-*h*RNasi a diverse concentrazioni per 72 ore. Terminata l'incubazione, abbiamo contato mediante camera di Burker, sia le cellule a cui non era stata aggiunta *h*ERB-*h*RNasi che quelle trattate per determinare la sopravvivenza cellulare.

3. Induzione dei tumori nei topi e loro trattamento con *h*ERB-*h*RNasi

Abbiamo impiegato topi femmine di 6 settimane Balb/cAnNCrIBR (Charles River, Calco, Italia). 5×10^5 cellule TUBO sono state risospese in 200 μ l di PBS ed iniettate sotto cute (giorno zero). Dopo 10 giorni, i tumori erano visibili (15mm³ di volume) ed i topi sono stati divisi in 5 gruppi omogenei. Dopo 11 giorni, *h*ERB-*h*RNasi, solubilizzata in PBS, è stata somministrata per 5 volte ed ogni 72 ore nell'aria peritumorale o intraperitoneale a 2 gruppi di 5 topi in dosi di 1,5mg/Kg di peso corporeo. Dosi equimolari di HP-RNasi o dell'scFv diretto contro ErbB2 sono state somministrate nell'area peritumorale a 2 gruppi di controllo. Un altro gruppo di 5 topi è stato utilizzato come controllo e trattato con ugual volume di PBS sterile. Dopo 45 giorni abbiamo raccolto i campioni di sangue e valutato i principali valori ematologici. Durante il periodo di trattamento, il volume della massa tumorale (V) è stato determinato come riportato in Materiali e Metodi, SEZIONE III A.

RISULTATI

□ Effetto citotossico di *h*ERB-*h*RNasi su cellule ErbB2-positive

Allo scopo di valutare l'attività anti-proliferativa dell'immunoRNasi sono stati effettuati saggi di citotossicità su cellule ErbB2-positive quali: SKBR3, MDA-MB361, MDA-MB453 e TUBO. Come controllo negativo sono state scelte cellule A431 perché non esprimenti il recettore ErbB2. Tali linee cellulari sono state piastrate in presenza ed in assenza di concentrazioni crescenti di *h*ERB-*h*RNasi e dopo 72 ore di incubazione abbiamo valutato la sopravvivenza cellulare. Come mostrato in figura 31, *h*ERB-*h*RNasi è citotossica su tutte le cellule ErbB2-positive; mentre nessun effetto anti-proliferativo è stato osservato per le cellule A431. Dai dati ottenuti è stato possibile determinare i valori di IC₅₀; cioè la concentrazione della proteina che determina il 50% di morte cellulare. Tali valori sono risultati pari a 12.5, 47, 52 e 60nM per le cellule SKBR3, MDA-MB361, MDA-MB453 e TUBO, rispettivamente. Da questi risultati si evince che *h*ERB-*h*RNasi è selettivamente citotossica su tutte le cellule tumorali ErbB2-positive saggiate e che l'effetto più potente esercitato sulle cellule SKBR3 sia dovuto all'espressione di livelli più elevati del recettore su tali cellule. Perciò esiste una correlazione diretta tra i livelli di espressione espressi sulle cellule tumorali e la loro suscettibilità al suo effetto citotossico.

□ Effetto di *h*ERB-*h*RNasi su tumori sviluppati in topi

Per gli studi *in vivo*, abbiamo inoculato 5×10^5 cellule TUBO in topi Balb/cAnNCrIBR. La scelta della linea cellulare da inoculare nei topi è stata dettata dal fatto che le cellule più responsive al trattamento con *h*ERB-*h*RNasi, SKBR3, non sono tumorigeniche (81). Come mostrato in figura 32, la somministrazione, per 5 volte, nell'area peritumorale di 1.5mg/Kg di *h*ERB-*h*RNasi induceva una drastica riduzione della massa tumorale (86%). Simili risultati sono stati ottenuti quando la proteina è stata somministrata con iniezioni nel peritoneo. Ciò suggerisce che l'immunoRNasi è stabile nel circolo sanguigno ed è capace di penetrare nelle masse tumorali. Contrariamente, l'scFv anti-ErbB2 e l'HP-RNasi, iniettate nell'area peritumorale, non mostrarono alcun effetto sulla crescita esponenziale della massa tumorale al pari del gruppo di topi controllo. Durante il periodo di trattamento, gli animali non hanno mostrato alcun segno di tossicità. Inoltre, i principali valori

ematologici che sono risultati simili a quelli dei topi non trattati. In figura 33 sono mostrate fotografie di un di un topo non trattato (pannello A) e di un topo trattato con *h*ERB-*h*RNasi (pannello B).

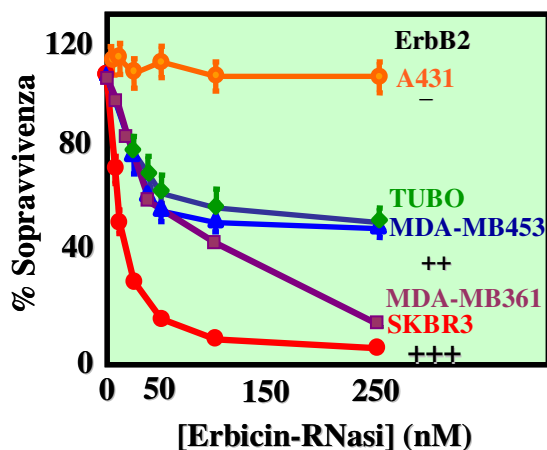


Figura 31: Effetto di *h*ERB-*h*RNasi sulla sopravvivenza cellulare.

In figura è mostrata una curva dose-risposta delle linee cellulari SKBR3, MDA-MB361, MDA-MB453, TUBO e A431 dopo trattamento per 72ore con *h*ERB-*h*RNasi. I livelli di espressione di ErbB2 nelle diverse linee cellulari sono indicati con i seguenti simboli: - (A431), ++ (TUBO e MDA-MB453), +++ (MDA-MB361 e SKBR3). I dati mostrati in figura rappresentano la media (\pm SD) di 3 esperimenti eseguiti indipendentemente ed in triplicato.

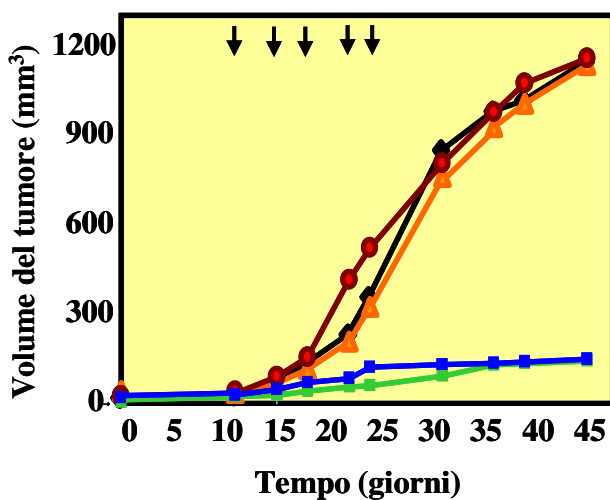


Figura 32: Effetto *in vivo* di *h*ERB-*h*RNasi.

La crescita della massa tumorale è stata monitorata in topi inoculati con 5×10^5 cellule TUBO. Gli animali trattati sono stati inoculati con dosi pari a 1,5mg/Kg di peso corporeo di *h*ERB-*h*RNasi nell'area peritumorale (■) e nel peritoneo (□). Gli animali di controllo sono stati trattati con una soluzione sterile di PBS (◆), con dosi equimolari di scFv (●) o con la ribonucleasi pancreatica umana (▲) nell'area peritumorale. Gli inoculi sono stati effettuati per 5 volte ad intervalli di 72ore, come indicato dalle frecce.

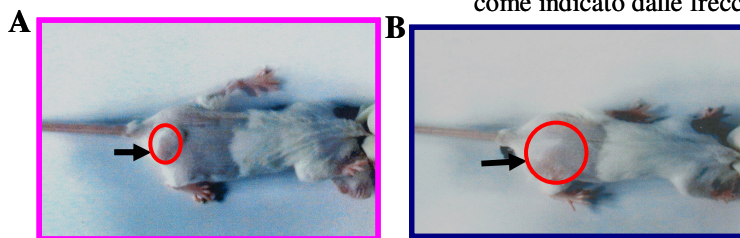


Figura 33: Tumori indotti da cellule TUBO in topi Balb/c.

Pannello A: Topo trattato con *h*ERB-*h*RNasi. Pannello B: Topo di controllo non trattato. Le aree cerchiare in rosso rappresentano il volume della massa tumorale.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

E' stato dimostrato che l'immunoterapia rappresenta un'efficace strategia per la terapia del cancro; in particolare gli anticorpi, in grado di riconoscere bersagli specifici espressi sulla superficie delle cellule tumorali, possono essere utilizzati come agenti selettivi contro le cellule neoplastiche (51, 52). Esistono però dei limiti quali gravi reazioni immunitarie e tossicità aspecifica connessi con l'utilizzo di tossine derivanti da piante e batteri (82). Per risolvere tali problemi, sono stati ingegnerizzati costrutti chimerici costituiti da scFv diretto contro antigeni tumorali e da ribonucleasi; questi sono stati denominati ImmunoRNasi.

*h*ERB-*h*RNasi è costituita da un frammento anticorpale umano (scFv) specifico per l'antigene tumorale ErbB2, denominato Erbicina, e dalla ribonucleasi pancreatica umana (HP-RNasi). Tale ribonucleasi non è un agente citotossico ma lo diventa se internalizzata, in quanto va a degradare gli RNA cellulari. L'utilizzo dell'scFv risulta importante in quanto funge da veicolo per condurre, nel citosol di cellule tumorali, l'RNasi. L'scFv, inoltre, è in grado già da sola di inibire selettivamente la crescita di cellule tumorali ErbB2-positive (SKBR3) con una IC_{50} pari a 200nM (83), *h*ERB-*h*RNasi ha invece un valore di IC_{50} pari a 12,5nM e rappresenta quindi un agente antineoplastico più efficace. L'azione antiproliferativa svolta in vitro da *h*ERB-*h*RNasi è stato riscontrata anche *in vivo* dove poche dosi determinano una drastica riduzione della massa tumorale. Tale risultato può essere perciò attribuito ad un'azione tossica dovuta all'internalizzazione dell'RNasi, visto che la sola RNasi non ha alcun effetto sulla sopravvivenza cellulare. E' stato anche osservato che *h*ERB-*h*RNasi dopo un'incubazione per 48 ore a 37°C nel siero murino risulta ancora dotata di attività ribonucleasica (dati non mostrati). Tale stabilità lascia presupporre che l'immunoRNasi possa essere considerata un promettente farmaco antitumorale anche per la scarsa tossicità riscontrata *in vivo*.

Quindi i vantaggi di questa ImmunoRNasi risiedono oltre che nella potente azione antitumorale, anche nella sua natura interamente umana, che potrebbe favorire un suo impiego come farmaco antitumorale senza rischi di una possibile risposta immunitaria per l'uomo.

SEZIONE IV

Rilevazione precoce di tumori e metastasi *in vivo*

Lo sviluppo di metodi più efficaci per la scoperta precoce delle neoplasie e delle metastasi nonostante i notevoli progressi è ancora necessario per poter intervenire con le specifiche terapie. Nell'ambito del mio lavoro di tesi mi sono anche interessata di cercare di mettere a punto una tecnica che permettesse un'attenta osservazione *in vivo* della crescita tumorale, del processo di distacco ed impianto delle metastasi nei vari organi bersaglio così da garantire una diagnosi precoce che per circa 1/3 dei casi di malati potrebbe significare la guarigione.

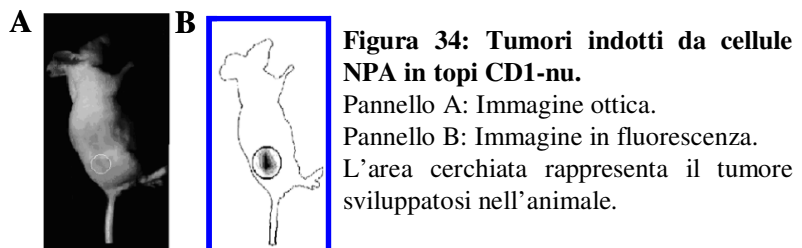
Le tecniche finora utilizzate per tale studio non sono riuscite ancora a garantire una buona osservazione di tali fenomeni. Negli ultimi anni grande sviluppo è stato affidato a tecniche che consentono l'introduzione in topi di enzimi che, agendo su substrati specifici, permettono l'emissione di luce e garantiscono l'individuazione delle cellule tumorali (84).

Un altro modo di utilizzare la fluorescenza delle molecole è quello di introdurre nelle cellule tumorali, attraverso il processo di trasfezione, dei particolari tipi di geni codificanti per prodotti proteici che sono in grado di emettere luce se eccitati. Un gene che, trasfettato, viene espresso in maniera stabile nei tumori e che quindi ne consente non solo l'individuazione, ma anche l'osservazione del processo di crescita e di formazione delle metastasi è quello che codifica per la proteina a fluorescenza verde "Green fluorescent protein" (GFP) (85). Si tratta di una proteina, isolata dalla medusa *Aequorea victoria*, che riesce ad assorbire la luce blu e ad emettere un segnale fluorescente di colore. E' noto che la GFP è utilizzata come "marker" fluorescente per l'espressione genica in diversi organismi (da batteri a piante ed animali), per studiare particolari strutture intracellulari, per osservare la crescita dei tumori e il processo di formazione delle metastasi (86).

In precedenti lavori è stato messo a punto un prototipo di sistema multimediale di "imaging" planare con radiazione ottica di fluorescenza mediata da ematoporfirina e con radiazione γ (87). Abbiamo quindi pensato di valutare l'efficacia di tale sistema per monitorare lo sviluppo dei tumori e l'individuazione precoce delle metastasi

utilizzando topi inoculati con cellule di carcinoma tiroideo anaplastico (ARO) e papillifero (NPA). Sono state effettuate misure di spettroscopia di fluorescenza e di autoradiografia su sezioni istologiche di tessuti normali e tumorali, prelevati dagli animali sacrificati dopo le misure di “imaging” allo scopo di controllare la captazione del fluoroforo e del radionuclide. L’uso delle due tecniche combinate presenta il vantaggio di sfruttare i due diversi meccanismi di captazione del “marker” fluorescente e radioattivo e quindi di avere una capacità diagnostica maggiore rispetto a ciascuna tecnica considerata separatamente (87). Successivamente, abbiamo valutato l’effetto esercitato dal dicloridrato di ematoporfirina (HP) come agente ottico di contrasto nella rivelazione precoce *in vivo* di tumori basata sull’imaging di fluorescenza in riflettanza su piccoli animali sfruttando le proprietà di alta sensibilità e basso rumore di una telecamera digitale a CCD (Charged coupled device).

La captazione selettiva di HP da parte dei tessuti tumorali e l’alta sensibilità della camera CCD consentono “l’imaging” in fluorescenza di tumori che non possono essere rilevabili né visivamente né per palpazione dell’animale. Il dicloridrato di HP, sebbene non specifico, sembra un marcatore tumorale fluorescente adatto alla rivelazione di masse sottocutanee (88). Nella figura 34, pannello B, è possibile osservare chiaramente la massa tumorale nell’immagine in fluorescenza.



Parallelamente, abbiamo trasfettato cellule derivanti da un carcinoma di cervice uterina, HeLa, con il plasmide codificante per la proteina GFP. Abbiamo ottenuto dei cloni esprimenti stabilmente tale proteina fluorescente. Tali cellule sono state inoculate in topi per poter evidenziare l’impianto precoce e lo sviluppo del tumore in modo da confrontare l’efficienza dei due sistemi. Tali esperimenti sono in corso.

BIBLIOGRAFIA

1. Morita H., *et al.*, (1996) *Chem. Pharm. Bull.* **44**(5), 1026-1032.
2. Morita H., *et al.*, (1993) *Chemistry Lett.*, 1877-1888.
3. Morita H., *et al.*, (1994) *et al.*, *Eterocycles*, **38**, 2247-2252.
4. Rossi F., *et al.*, (2004) *J. Pept. Sci.* **10**, 92-102.
5. Fagin J.A, *et al.*, (1993) *J. Clin. Invest.* **91**, 179-184.
6. De Lorenzo C., *et al.*, (2002) *Clin. Cancer Res.* **8**, 1710-1719.
7. Carmichael J., *et al.*, (1987) *Cancer Res.*, **47**, 936-942
8. Catchpoole D.R., *et al.*, (1993) *Cancer Res.*, **53**, 4287-4296.
9. Felix S.W. (2000) *Cell*, **103**, 273-282.
10. Kerr J.F.R. (2002). *Toxicology*, **181-182**, 471-474.
11. Kerr J.F.R., *et al.*, (1994) *Cancer*, **73**, 2013-2026.
12. Pirnia F., *et al.*, (2002) *Cell Death. Differ.*, **9**, 905-914.
13. Cozzolino R., *et al.*, (2005) *Carcinogenesis*, **26**(4), 733-739.
14. Gu Q., *et al.*, (2005) *Carcinogenesis*, **26**(3), 541-546.
15. Mechoulam R., (1986) *Pharmacol. Biochem.*, **9**, 1-20.
16. Ganoi V., *et al.*, (1964) *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1646-1647.
17. Devane W.A., *et al.*, (1998) *Mol. Pharmacol.*, **34** (5), 605-613.
18. Peterwee R. (1993) *Gen. Pharmacol.*, **24** (4), 811-824.
19. Mukhopadyays A.C., (2001) *Eur. Biochem.*, **268** (3), 499-505.
20. Munro S., *et al.*, (1993) *Nature*, **365**, 61-65.
21. Di Marzo V., *et al.*, (1995) *Prostaglan. Leuk. Essent Fatty Acids*, **53**, 1-11.
22. Devane W. A., *et al.*, (1992) *Science*, **258**, 1946-1949.
23. Di Marzo V., *et al.*, (2002) *Prostaglan. Leuk. Essent Fatty Acids*, **66**, 377-91.
24. Mallet P.E., *et al.*, (1996) *Pharmacol.*, **7**, 276-284.
25. Romer J., *et al.*, (1995) *Life Sci.*, **56** (23-24), 2003-2040.
26. Pate D.W.J., (1995) *Sh. Health.*, **65** (10), 438-442.
27. Wagner J.A., *et al.*, (1998) *J. Mol. Med.*, **76**, 824-836.
28. Lake K.D., *et al.*, (1997) *Pharmacol. Exp. Ther.*, **281** (3), 1030-1037.
29. De Petrocellis L., *et al.*, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.*, **95**, 8375-8380.
30. Watson E.S., (1998) *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **11**, 211-222.

31. Sanchez C., *et al.*, (2001) *Cancer Res.*, **61**, 5784-5789.
32. Bifulco M., *et al.*, (2001) *FASEB J.*, **15**, 2745-2747.
33. Pertwee R., (1999) *Curr. Med. Chem.*, **10**, 635-644.
34. Sorrentino R., *et al.*, (2005) *J Clin Endocrinol Metab.*, **90**(2), 928-35.
35. Spalletti-Cernia D., *et al.*, (2004) *Br. J. Cancer*, **90**, 270-277.
36. Portella G., *et al.*, (2003) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **88** (10), 5027-5032.
37. Motti M.L., *et al.*, (2005) *Carcinogenesis*, **26**(6), 1021-24.
38. Stoscheck C.M., (1990) *Methods in Enzymology.*, **182**, 50-69.
39. Scovassi A.I., (2004) *FASEB J.*, **18** (13), 1487-1488.
40. Spalletti-Cernia D., *et al.*, (2003) *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **88** (6), 2900-7.
41. Zhu H., *et al.*, (2005) *Cancer Cell International.*, **5**, 28-40.
42. Karpinich N.O., *et al.*, (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 16547-16552.
43. Sherr C.J.M., (2000) *Cancer Res.*, **60**, 3689-3695.
44. Di Gennaro E., *et al.*, (2003) *J. Cell Physiol.*, **195**(1), 139-50.
45. Endicott J., *et al.*, (1990) *Pharmacol. Rev.*, **42**, 155-199.
46. Yamamoto T., *et al.*, (1986) *Nature*, **319**, 230-234.
47. Slamon D.J., *et al.*, (1989) *Science*, **244**, 707-712.
48. Fukushige S., *et al.*, (1986) *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 955-958.
49. Press M.F., *et al.*, (1990) *Oncogene*, **5**, 953-962.
50. Klapper L.N., *et al.*, (2000) *Cancer Res.*, **77**, 25-29.
51. Trikha M., *et al.*, (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 609-614.
52. Ross J., *et al.*, (2003) *Expert Rev. Anticancer. Ther.*, **3**, 107-121.
53. Lenferink A.E., *et al.*, (1998) *EMBO J.*, **17**, 3385-3397.
54. Klapper L.N., *et al.*, (2000) *Cancer Res.*, **60**, 3384-3388.
55. Stancovski I., *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 8691-8695.
56. Klapper L.N., *et al.*, (1997) *Oncogene*, **14**, 1140-1145.
57. Villamor N., *et al.*, (2003) *Semin. Oncol.*, **30**, 424-433.
58. Carter P., *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 4285-4289.
59. Milenic D.E., (2002) *Curr. Pharm. Des.*, **8**, 1749-1764.
60. Bengala C., *et al.*, (2006) *Br. J. Cancer*, **94**, 1016-1020.
61. Kuus-Reichel K., *et al.*, (1994) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1**, 365-372.

62. Sheets M.D., *et al.*, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 6157-6162.
63. Vitaliti A., *et al.*, (2000) *Cancer Res.*, **60**, 4311-4314.
64. Huls G.A., *et al.*, (2001) *Cancer Immunol. Immunother.*, **50**, 163-171.
65. De Lorenzo C., *et al.*, (2004) *Br. J. Cancer*, **91**(6), 1200-1204.
66. Ueno N.T., *et al.*, (2002) *Cancer Res.*, **62**, 6712-6716.
67. Rovero S., *et al.*, (2000) *J. Immunol.* **165**, 5133-5142.
68. Cicatiello L., *et al.*, (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**(16), 7260-7274.
69. Workman P., *et al.*, (1998) *Br. J. Cancer*, **77**, 1-10.
70. De Lorenzo C., *et al.*, (2005) *Carcinogenesis*, **26**(11), 1890-1895.
71. Serrano M., *et al.*, (1993) *Nature*, **366**, 704-707.
72. Piva R., *et al.*, (1997) *Neurosci. Lett.*, **234**, 127-131.
73. Wu K., *et al.*, (2002) *Mol. Cancer Ther.*, **1**, 695-706.
74. Newton D.L., *et al.*, (2001) *Blood.*, **97**, 528-535.
75. Deonarain M.P., *et al.*, (1998) *Br. J. Cancer*, **77**, 537-546.
76. Newton D.L., *et al.*, (1996) *Biochemistry*, **35**, 545-553.
77. Newton D.L., *et al.*, (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 26739-26745.
78. Zewe M., *et al.*, (1997) *Immunotechnology*, **3**, 127-136.
79. De Lorenzo C., *et al.*, (2004) *Cancer Res.*, **64**, 4870-4874.
80. Colbern G.T., *et al.*, (1999) *J. Inorganic. Biochem.*, **77**, 117-120.
81. Pegram M., *et al.*, (1999) *Oncogene*, **18**, 2241-2251.
82. Schnell R., *et al.*, (2000) *Leukemia*, **14**, 129-135.
83. De Lorenzo C., *et al.*, (2002) *FEBS Lett.*, **516**, 208-212.
84. Yang M., *et al.*, (2000) *PNAS*, **97**, 1206-1211.
85. Wood K.V., *et al.*, (1995) *Curr. Opinion Biotechnol.*, **6**, 50-58.
86. Chishima T., *et al.*, (1997) *Metastasis*, **15**(5), 547-552.
87. Celentano L., *et al.*, (2003) *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, **50**(5), 1693-1701.
88. Autiero M., *et al.*, (2005) *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, **52**(1), 205-209.