Budget

I° anno

Finanziamento totale	€ 80.000

Il budget è stato utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

II° anno

Finanziamento totale	€ 75.000

Il budget verrà utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni (incluse le missioni da e per gli USA) ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

III° anno. Il budget del III° anno verrà eventualmente confermato, dopo valutazione ed approvazione del "Progress Report" sui risultati ottenuti nei due anni precedenti.

(VI) SVILUPPO DI NUOVE TERAPIE ANTITUMORALI BASATE SUI FARMACI ANTI-RETROVIRALI INIBITORI DELLA PROTEASI DI HIV E INIBITORI NON NUCLEOSIDICI DELLA TRASCRITTASI INVERSA, DA SOLI O COMBINATI: STUDI PRECLINICI IN VITRO ED IN VIVO

Responsabili Scientifici: B. Ensoli, Istituto Superiore di Sanità

P. Sinibaldi Vallebona, Università Tor Vergata, Roma

C. Spadafora, Istituto Superiore di Sanità

Background

Nostri studi recenti hanno mostrato che una classe di farmaci antiretroviralivirali, gli inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI), hanno attività antiangiogenica ed antitumorale in modelli sperimentali in vitro ed in vivo.

In particolare abbiamo dimostrato che il trattamento con HIV-PI a dosi paragonabili a quelle utilizzate nell'uomo è in grado di bloccare lo sviluppo di lesioni angioproliferative e l'edema indotti mediante l'inoculazione in topi nudi di cellule primarie derivate da pazienti con sarcoma di Kaposi (KS) o da ibridi somatici tra cellule endoteliali e una linea cellulare da carcinoma del polmone umane. Questo effetto è associato alla formazione di ampie zone di necrosi all'interno delle lesioni con marcata riduzione dell'angiogenesi, dell'edema e dell'infiltrazione di cellule fusate rispetto agli animali di controllo (Sgadari et al. Nature Medicine 2002; Sgadari et al., Lancet Oncology 2003, Toschi et al., Anticancer Drug 2002; Monini et al., J Antimicrobial Therapy 2003). Questi effetti degli HIV-PI sono stati osservati sia in animali trattati prima dell'inoculo delle cellule KS, sia nei topi trattati a partire dal momento dell'inoculo, suggerendo che gli HIV-PI siano in grado di bloccare lo sviluppo e di indurre la regressione delle lesioni. Come indicato dall'osservazione istologica delle lesioni simil-KS dei topi trattati con HIV-PI, abbiamo inoltre dimostrato che questi farmaci sono in grado di inibire l'angiogenesi indotta da fattori angiogenici sia in topi atimici che nella membrana corioallantoidea di pollo, in assenza di effetti tossici e con una efficacia simile a quella del taxolo, un chemioterapico dotato di effetti anti-tumorali e anti-angiogenici (Sgadari et al., Nat Med 2002; Sgadari et al., Lancet Oncology 2003, Toschi et al., Anticancer Drug 2002; Monini et al., J Antimicrobial Therapy 2003; e dati non pubblicati).

I nostri studi hanno inoltre indicato che un altro bersaglio potenzialmente efficace per la terapia dei tumori sono le RT celluari, espressa negli embrioni di topo, in cellule progenitrici e in linee cellulari trasformate (Pittoggi et al., Mol. Reprod. Dev., 2003; Mangiacasale et al., Oncogene, 2003). L'inibizione della RT mediante trattamento con NNRTI, determina una riduzione della crescita di linee indifferenziate e tumorali in vitro ed in vivo, ne promuove il differenziamento cellulare ed induce una riprogrammazione dell'espressione genica, suggerendo che questo enzima abbia un ruolo chiave in processi cellulari fondamentali quali la proliferazione ed il differenziamento cellulare (Mangiacasale et al., Oncogene, 2003).

Questi risultati indicano che gli HIV-PI e gli NNRTI rappresentano potenti molecole dotate di attività antiangiogenica e antitumorale e che agiscono su fasi diverse del processo di crescita tumorale. Pertanto è importante analizzare la possibilità di un loro uso da soli od in combinazione per la terapia dei tumori che insorgono sia in individui HIV^+ che sieronegativi.

Il presente progetto, che viene svolto in collaborazione con altre 2 Unità operative coordinate dalla prof.ssa Paola Sinibaldi Vallebona, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Roma "Tor Vergata", e dal dr. Corrado Spadafora, Servizio Biologico per la Gestione della Sperimentazione Animale, ISS, è articolato nei seguenti obiettivi: 1) gli effetti antitumorali e/o antimetastatici in vivo degli HIV-PI ed NNRTI, usati da soli od in associazione, in modelli di tumori sperimentali indotti nel topo dall'inoculazione di linee tumorali umane e murine; 2) gli effetti antitumorali e/o antimetastatici in vivo degli HIV-PI ed NNRTI, usati da soli od in associazione, in un modello di tumore sperimentale indotto nel ratto da una linea di carcinoma del colon singenica; 3) gli effetti degli HIV-PI e/o NNRTI, da soli od in associazione, sulla proliferazione, invasione, differenziamento ed espressione genica in vitro delle linee tumorali utilizzate negli studi in vivo.

(I) Valutazione degli effetti antiangiogenici ed antitumorali di indinavir ed efavirenz in modelli sperimentali basati su linee tumorali umane

a) Modelli di tumori sperimentali indotti nel topo dall'inoculazione di linee tumorali umane.

Inizialmente. sono stati effettuati esperimenti preliminari per testare la tossicità di indinavir o efavirenz, 2 dei farmaci appartenenti rispettivamente alla classe degli HIV-PI ed NNRTI più usati nella pratica clinica, nei ceppi di topi successivamente utilizzati per i modelli tumorali sperimentali (nu/nu inbred, SCID e C57BL, femmine, 5-6 settiname di età, Harlan) (5/10 animali per gruppo) e a dosi paragonabili a quelle utilizzate in pazienti HIV^+. L'indinavir (Merck Sharp & Dohme, 70 mg/kg/die, ovvero 1.36 mg/topo/die) o l'efavirenz (Bristol Myers Squibb, 10 mg/kg/die, ovvero 0,2 mg/topo/die), diluiti ciascuno in 0.4 ml di soluzione salina, sono stati somministrati giornalmente mediante gavage intragastrico. Topi di controllo sono stati trattati con lo stesso volume di soluzione salina. Dato che alcuni dei modelli tumorali che ci si propone di utilizzare nei topi atimici prevedono un irraggiamento subletale degli animali (400 Rad) per favorire l'attecchimento tumorale, questi esperimenti di tossicità sono stati effettuati anche in topi nudi irradiati. La somministrazione dei farmaci è stata proseguita fino a 10 settimane senza che negli animali trattati, sia irradiati che non, siano stati osservati segni di tossicità d'organo o sistemica, quali perdita di peso o alterazioni comportamentali.

È stata, quindi, valutata l'efficacia di indinavir o efavirenz in topi immunocompetenti C57BL inoculati con cellule di melanoma murino singenico B16, clone F10 (6 animali/gruppo). Gli animali hanno iniziato il trattamento giornaliero con indinavir o efavirenz per os alle dosi sopra indicate e dopo 2 giorni sono stati inoculati sottocute con $1x10^6$ cellule B16-F10. In queste condizioni sperimentali è stata osserva la comparsa di tumori sottocutanei al sito di inoculo dopo circa 5 giorni. Il trattamento è stato proseguito per 12 giorni dopo l'inoculo delle cellule tumorali, fino a che i tumori degli animali di controllo non hanno raggiunto dimensioni tali da interferire con le attività vitali degli animali (2-3 cm^2), che sono stati quindi sacrificati. Sia il trattamento con indinavir che con efavirenz ha inibito fortemente la crescita tumorale in assenza di significativa tossicità sistemica. Per valutare gli effetti del sistema immune sull'attività antitumorale di indinavir ed efavirenz, l'esperimento è stato eseguito anche in topi immunocompromessi. A tale scopo topi SCID sono stati trattati con indinavir o efavirenz per os alle dosi indicate sopra; dopo 2 giorni gli animali sono stati inoculati sottocute con cellule B16-F10. Il tempo di comparsa e la cinetica di crescita dei tumori è stata molto simile. Al sacrificio, i tumori degli animali trattati con inibitori sono risultati di dimensioni molto ridotte rispetto a quelli di controllo.

Avendo con questi esperimenti preliminari verificato che questa linea tumorale è sensibile sia al trattamento con indinavir che con efavirenz sia nel modello singenico immunocompetente che in animali immunocompromessi, stiamo attualmente valutando l'effetto dei 2 farmaci somministrati in combinazione.

Abbiamo, inoltre, valutato l'attività dei 2 farmaci, utilizzati da soli o in combinazione, nell'inibire la crescita di un tumore caratterizzato da un'alta incidenza nella popolazione umana, quale il carcinoma della mammella. A tale scopo gli animali sono stati trattati con indinavir e/o efavirenz, e 2 giorni dopo sono stati inoculati sottocute, previo irraggiamento subletale, con una linea di carcinoma umano della mammella (cellule MDA-MB-231, $1x10^6$ cellule/topo). Il trattamento è stato proseguito per 53 un totale di giorni. Sebbene il trattamento con i 2 farmaci somministrati separatamente ha inibito modestamente la crescita di questo modello tumorale allogenico, la somministrazione combinata di indinavir ed efavirenz ha avuto un effetto anti-tumorale additivo. È in corso la valutazione dell'effetto del trattamento con indinavir e/o efavirenz in un modello di tumore sperimentale del colon (linea SW-480), un altro tumore ad alta incidenza dell'uomo.

L'analisi istologica ed immunoistochimica dei modelli tumorali studiati è attualmente in corso. In particolare stiamo valutando l'entità dell'angiogenesi, della proliferazione e dell'apoptosi tumorale in campioni ottenuti da topi trattati con indinavir e/o efavirenz rispetto ai controlli trattati con salina, mediante analisi immunoistochimica di marker endoteliali (CD31), di proliferazione cellulare (Ki67) e TUNEL test.

b) Valutazione degli effetti sulla proliferazione, invasione, differenziamento ed espressione genica in vitro delle linee tumorali utilizzate negli studi in vivo.

Per verificare gli effetti di indinavir sulla crescita delle cellule da carcinoma del colon (SW-480) e del melanoma murino (B16-F10), sono stati effettuati saggi di proliferazione basale su cellule coltivate in presenza di 0.1, 1 e 10 μM di farmaco per 4-5 giorni. Tali concentrazioni sono paragonabili a quelle osservate nel plasma di pazienti HIV^+ trattati con dosi terapeutiche di invinavir. Questi esperimenti preliminari hanno dimostrato che l'indinavir non inibisce la proliferazione delle linee tumorali a nessuna delle concentrazioni testate. Successivamente sono stati effettuati esperimenti per valutare gli effetti dell'indinavir sulla capacità invasiva di queste linee tumorali. A tale queste linee cellulari sono state coltivate per 5 giorni con indinavir (0.1, 1 e 10 μM) e quindi testate per la loro capacità di invadere una matrice extracellulare ricostituita (Matrigel) in risposta ad un fattore angiogenico (bFGF). Tali saggi sono stati effettuati utilizzando camere di Boyden. I risultati ottenuti hanno mostrato che il trattamento con indinavir è in grado di bloccare in maniera estremamente efficace l'invasione di entrambe le linee tumorali già a partire dalla dose 0.1 μM. Questi risultati suggeriscono che indinavir sia in grado di agire in modo selettivo sull'invasione delle cellule tumorali, uno degli step fondamentali per la crescita e progressione tumorale, così confermando i dati precedentemente ottenuti su cellule provenienti da Sarcoma di Kaposi e cellule endoteliali primarie (Sgadari et al., Nat Med 2002; Sgadari et al., Lancet Oncol 2003). Sono attualmente in corso analoghi esperimenti di proliferazione ed invasione sulla linea di carcinoma della mammella (MDA-MD-231).

Inoltre abbiamo iniziato esperimenti preliminari di dose-finding per studiare gli effetti dell'efavirenz sulla proliferazione ed invasione delle linee tumorali già analizzate con indinavir. In particolare verranno testate concentrazioni di farmaco da 0.1, 1, 10 e 25 □M per identificare le dosi alle quali si ottiene la massima risposta e le dosi subottimali da utilizzare successivamente negli esperimenti di associazione con indinavir.

Pubblicazioni

- Monini P., Sgadari C., Toschi E., Barillari G., and Ensoli B. Antitumor effects of antiretroviral activity. Nat. Rev. Cancer, 4:861-875, 2004.
- Sgadari C., Toschi E., Carlei D., Malavasi L., Bacigalupo I., et al Proteasome-independent block of angiogenesis and tumor cell invasion by HIV protease inhibitors. Submitted.

(II) Valutazione degli effetti antiangiogenici ed antitumorali di indinavir ed efavirenz in modelli sperimentali tumorali di roditori

Primo obiettivo dello studio era quello di valutare gli effetti degli HIV-PI e/o NNRTI, da soli od in associazione, sulla proliferazione, citotossicità, differenziamento ed espressione genica in vitro di linee tumorali di vario tipo (topo e ratto).

In una prima serie di esperimenti abbiamo testato *in vitro* l'effetto di Efavirenz (da 5 a 15 μM) e Indinavir (da 0.1 a 10 μM), sulla crescita di cellule di carcinoma polmonare di Lewis, (LLC) somministrando il farmaco in una dose unica o ripetuta per 3 giorni consecutivi.

Le cellule, seminate alla concentrazione di 50.000/ml in piastre da 6 wells (2ml/well) sono state trattate con i farmaci, contenuti in un volume di 20 μl/well. I controlli sono stati addizionati di pari volume di terreno di coltura (CC) oppure di pari volume di diluente del

farmaco (C-DMSO). Le conte sono state eseguite al microscopio a 24, 48 e 72 ore dall'inizio del trattamento, previa colorazione con trypan blue.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che:

1) Efavirenz (trattamento singolo) inibisce significativamente la crescita cellulare in maniera dose-dipendente. L'effetto di inibizione non è associato a fenomeni di morte o ridotta vitalità cellulare e permane sino a tre giorni dopo la sospensione del trattamento

2) Efavirenz (1 trattamento/die per 3 giorni consecutivi) inibisce marcatamente la crescita cellulare in maniera dose-dipendente. L'effetto di inibizione è maggiore di quello osservato nel trattamento singolo, ma ugualmente non è associato a fenomeni di morte o ridotta vitalità cellulare. Il grado di inibizione della crescita cellulare oscilla dal 50 al 70% rispetto a CC e C-DMSO.

A seguito del trattamento con efavirenz non si osservano modificazioni apprezzabili della morfologia cellulare, evidenziabili al microscopio ottico, se non un lieve aumento delle dimensioni di una sottopopolazione cellulare; si evidenzia, tuttavia, una chiara tendenza delle cellule a formare un minor numero di clumps, rispetto alla loro normale attitudine.

3) Indinavir (trattamento singolo) induce un lieve effetto di inibizione della crescita cellulare a 24 ore di trattamento soltanto alla massima dose testata. Tale effetto viene perso nei giorni successivi, in cui si assiste ad una normale ripresa della crescita cellulare.

4) Indinavir (1 trattamento/die per 3 giorni consecutivi) Non si osserva miglioramento rispetto a quanto riferito per il trattamento singolo, anzi alcune dosi sembrano favorire, a tempi tardivi, un lieve incremento del numero delle cellule anche se non statisticamente significativo.

A seguito di trattamento con Indinavir non si riporta nessuna modificazione della morfologia cellulare.

5) Efavirenz (15μM) ed Indinavir (10, 1 e 0,1μM) in trattamento combinato. Non si evidenzia alcun effetto di inibizione della crescita cellulare mentre risulta che la combinazione dell'indinavir con efavirenz riduce l'effetto inibitorio, evidenziabile nel trattamento con il solo efavirenz Relativamente alla linea DHD/K12 le cellule sono state seminate alla concentrazione di 25.000/ml in piastre da 24 wells (1ml/well) al giorno 0, in duplicato. Il giorno successivo sono stati effettuati i trattamenti con i farmaci contenuti in un volume di 20 μl/wells. I controlli sono stati aggiunti di un pari volume di terreno di coltura (CC) oppure di un pari volume di diluente del farmaco (C-DMSO). Le conte cellulari sono state eseguite al microscopio ottico quotidianamente a partire dal giorno 2 fino al giorno 4, usando la colorazione vitale con trypan blue.

I risultati preliminari indicano che:

1) Efavirenz (1 tratt./die per 3 giorni consecutivi) inibisce marcatamente la crescita cellulare in modo dose e tempo-dipendente. A seguito del trattamento con efavirenz non si evidenzia alcuna modificazione della morfologia cellulare, se non un lieve aumento delle dimensioni delle singole cellule ed un diverso contatto cellula-cellula (ancora in fase di studio).

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

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

3) Efavirenz (15 μM) ed Indinavir (10, 1 e 0,1μM) in trattamento combinato. Nelle prime 48 ore di trattamento non risulta inibizione della crescita ma piuttosto un lieve incremento; solo all'osservazione a 72 ore è evidenziabile una seppur minima riduzione della crescita cellulare.

4) Indinavir (10μM) ed Efavirenz (15, 10 e 1μM) in trattamento combinato. Come negli esperimenti di combinazione precedenti l'effetto di lieve inibizione è evidenziabile solo a 72 ore di trattamento.

E' stato successivamente condotto uno studio per verificare se un inibitore della RT (Efavirenz) ed un inibitore della proteasi di HIV (indinavir), usati da soli o in combinazione, potessero esercitare una azione antitumorale significativa, se somministrati a topi portatori di tumore.

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

Al giorno 7 gli animali sono stati monitorati, mediante palpazione nella zona di inoculo, per verificare la crescita del tumore. Sono stati quindi selezionati 27 animali con tumore di dimensioni simili (2-3 mm) che sono stati divisi in 4 gruppi sperimentali di 7 animali ciascuno ad eccezione del gruppo di controllo che conteneva solo 6 animali : 1) Gruppo di controllo; 2) Trattati con Efavirenz; 3) Trattati con Indinavir; 4) Trattati con Efavirenz ed Indinavir. I farmaci ed il diluente di controllo sono stati preparati secondo lo schema seguente e somministrati agli animali, mediante gavage intragastrico, quotidianamente a partire dal 7° giorno dall'inoculo.

Efavirenz (Bristol-Myers Squibb)

La dose somministrata per gavage intragastrico è stata di 0,2 mg/die/topo (10 mg/kg/die), in 0.2 ml di H_2, preparata al momento dell'uso.

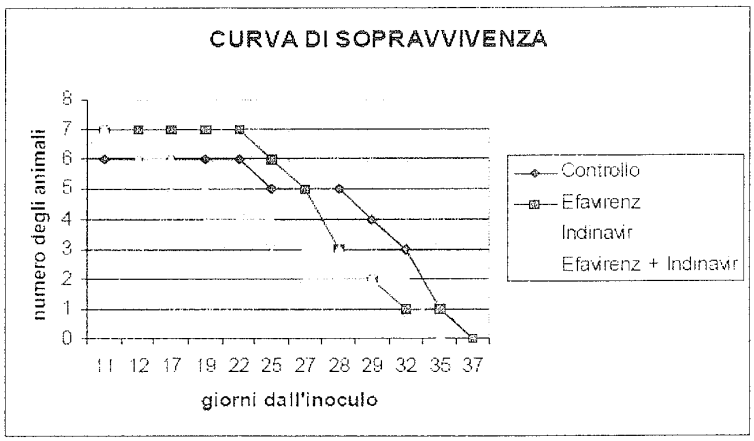
Indinavir (Crixivan-Merck)

La dose giornaliera somministrata per gavage intragastrico è stata di 1.36 mg/die/topo (70 mg/kg/die), in 0.4 ml di soluzione salina preparata una volta a settimana.

Gli animali sono stati monitorati relativamente alla dimensione del tumore, al peso e alla sopravvivenza

Sono qui di seguito riportati i dati relativi alle dimensioni dei tumori (diametro espresso in mm) di un esperimento rappresentativo.

	10gg	13gg	17gg	22gg	27gg
Controllo	3.33	7.50	11.41	15.00	22.00
Efavirenz	2.35	7.36	10.08	12.80	19.30
Indinavir	2.43	7.08	10.41	12.60	20.10
Efavirenz+Indinavir	2.57	7.00	9.90	12.20	23.88



Possiamo quindi concludere che il trattamento in vitro di cellule LLC (carcinoma polmonare di Lewis) e DHD/K12 (adenocarcinoma di colon di ratto) con l'inibitore dell' RT Efavirenz determina una marcata riduzione della crescita cellulare, che risulta essere dipendente dalla concentrazione del farmaco e dal tempo di trattamento. L'inibitore della proteasi di HIV Indinavir non esercita invece alcun effetto antiproliferativa, se non una minima inibizione sulla crescita della linea DHD/K12, ma solo alla concentrazione più elevata e a tempi di trattamento prolungati (72 ore).

La combinazione dei due farmaci non solo non evidenzia alcun effetto sinergico ma piuttosto riduce l'effetto inibitorio dell'Efavirenz. Anche la sperimentazione in vivo fornisce conferma dei dati su esposti.

(III) Valutazione degli effetti antitumorali degli inibitori della trascrittasi inversa nel melanoma, nel carcinoma prostatico enel microcitoma

Primo obiettivo

- Il nostro primo obiettivo è la caratterizzazione del ruolo della trascrittasi inversa endogena (RT) nella genesi e progressione tumorale e gli effetti della sua inibizione sulla crescita tumorale *in vitro* ed *in vivo*. Per questo studio abbiamo utilizzato come modelli sperimentali linee cellulari umane di melanoma (A-375), carcinoma prostatico (PC3) e microcitoma (H69). L'esposizione di queste cellule ad inibitori farmacologici dell'RT (nevirapina ed efavirenz), causa un drastico rallentamento della proliferazione e l'induzione di un processo differenziativo caratterizzato da cambiamenti morfologici e dalla comparsa di specifici marcatori. In concomitanza, viene indotta un'ampia riprogrammazione dell'espressione genica. Queste caratteristiche sono stabilmente mantenute finché le cellule sono sotto l'azione dei farmaci (circa venti giorni); la rimozione degli inibitori di RT determina il ritorno delle cellule alle loro condizioni originali, ossia quelle pre-trattamento. La caratteristica della reversibilità suggerisce la natura epigenetica del fenomeno.
- Abbiamo recentemente iniziato esperimenti di RNAi (RNA interference) utilizzando un costrutto che esprime un oligonucleotide interferente contro il retroposone LINE-1. Questo studio è finalizzato a) identificare la famiglia di retroelementi che codifica l'RT coinvolto nel controllo della proliferazione e differenziamento delle cellule tumorali e b) chiarirne il ruolo ed il meccanismo molecolare. Abbiamo osservato che cellule A-375 dopo pochi giorni dalla trasfezione col costrutto interferente, smettono di proliferare e subiscono un cambiamento morfologico che suggerisce il differenziamento. Entrambe le nuove caratteristiche assunte dalle A-375 trasfettate sono identiche a quelle indotte nella stessa linea cellulare dagli inibitori farmacologici di RT. Questo risultato è fortemente indicativo che LINE-1 è il retroelemento codificante l'RT coinvolto nei processi biologici in esame.
- Lo studio *in vivo* è stato effettuato inoculando cellule tumorali umane in topi nudi e quindi trattando i topi con efavirenz. Le linee tumorali utilizzate come modello sono: H69 (microcitoma), A-375 (melanoma), HT29 (colon carcinoma) e PC3 (carcinoma prostatico).

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

Questi risultati suggeriscono che l'RT endogeno è un nuovo potenziale target nella terapia antitumorale.

Secondo obiettivo

In collaborazione col gruppo di Barbara Ensoli, abbiamo intrapreso uno studio per stabilire se gli inibitori della RT (efavirenz, nevirapina) e gli inibitori delle proteasi (indinavir) possano esercitare una sinergica e potenziata azione antitumorale se adoperati in combinazione. Questo studio si basa su precedenti risultati ottenuti indipendentemente dai due gruppi dai quali emergeva il potenziale antitumorale degli inibitori della RT su svariati

tumori umani (colon, prostata, microcitoma e melanoma) e quelli della proteasi essenzialmente sul Kaposi. La sperimentazione è in corso sia *in vitro*, su linee cellulari A-375 (melanoma), PC3 (prostata) e microcitoma (H69), che *in vivo* su modelli animali.

I risultati ottenuti fino ad ora suggeriscono che:

- In vitro, l'indinavir da solo ha una scarsa, o nulla, capacità antiproliferativa, testata a varie concentrazioni (0.1, 1 e 10 micromolare).
- In vitro, Indinavir (10 micromolare) in combinazione con efavirenz (15 micromolare) dimostrano una scarsa azione sinergica: la proliferazione delle A-375 è ridotta del 60% (solo efavirenz) e del 70% (indinavir+efavirenz) e la proliferazione delle PC3 dal 40% (solo efavirenz) al 50% (indinavir + efavirenz). In entrambi le linee cellulari, l'effetto osservato è riconducibile ad un aumento della morte cellulare indotta principalmente per apoptosi quando si usa la combinazione dei due farmaci. L'aumento dell'apoptosi cellulare è in effetti valutato intorno al 10% il che giustifica la corrispondente riduzione del numero di cellule. Nel complesso, questi dati suggeriscono che l'effetto sinergico si concretizza in un aumento della morte cellulare (10%), piuttosto che in un rallentamento della proliferazione.
- Nessun effetto sinergico sulla proliferazione e/o morte cellulare in vitro è stato al contrario riscontrato nella combinazione indinavir+nevirapina: la nevirapina da sola riduce il rate di proliferazione di circa il 70% che rimane sostanzialmente invariato quando le cellule sono esposte alla combinazione dei due farmaci. Anche il rate di morte cellulare rimane invariato nella combinazione di entrambi i farmaci.
- Studi finalizzati a valutare la motilità ed invasività delle linee tumorali esposte ai farmaci, singolarmente o in combinazione, è attualmente in corso ed i risultati non sono ancora disponibili.
- Gli studi in vivo sono attualmente in corso su modelli murini inoculati con tumori umani e trattati con efavirenz, indinavir e efarirenz + indinavir.. Gli effetti dei farmaci sono stati inizialmente saggiati sulla progressione tumorale di cellule H69 (microcitoma umano) inoculate in topi nudi. I risultati di questa prima serie di esperimenti hanno: a) confermato l'efficacia dell'efavirenz nell'antagonizzare la progressione tumorale, come riportato sopra; b) dimostrato che l'indinavir da solo ha una scarsa o nulla efficacia nel contrastare la crescita tumorale nella fase iniziale. Tuttavia a stadi più avanzati, l'indinavir esercita un'azione di rallentamento della progressione tumorale che deve essere ulteriormente valutata e le cui modalità di azione devono essere approfondite; c) la combinazione efarirenz + indinavir non sembra esercitare un'azione sinergica, maggiore della somma degli effetti esercitati dai due composti individualmente. A vari stadi del trattamento farmacologico, tumori sono prelevati ed analizzati per determinarne le caratteristiche istologiche in paragone a quelli non tratati. Uno studio identico verrà esteso anche alle linee cellulari PC3 (carcinoma prostatico) e A-375 (melanoma).

Attività da svolgere nel II° anno del Progetto

- *Riprogrammazione dell'espressione genica indotta dall'inibizione di RT*: intendiamo chiarire i meccanismi attraverso i quali l'inibizione di RT endogena (sia farmacologica che per RNAi) induce una riprogrammazione reversibile dell'espressione genica cellulare. Ci proponiamo di paragonare i profili di espressione genica di cellule inibite e di controllo ottenuti per microarrays e quindi di esaminare i parametri di controllo epigenetici che vi potrebbero svolgere un ruolo.
- *Inibizione dell'RT endogena per RNAi in modelli murini*: l'efficacia dimostrata dall'RNAi contro il retroelemento LINE *in vitro* nel ridurre la proliferazione e nel promuovere il differenziamento, ci ha incoraggiato a testare questo sistema anche *in vivo* su modelli murini inoculati con tumori umani. Utilizzeremo a questo scopo un vettore retrovirale commercialmente disponibile, nel quale verrà impacchettato il costrutto interferente. Topi nudi inoculati con tumori umani saranno "infettati" con questi retrovirus e gli effetti sulla progressione tumorale saranno rilevati.

◦ *Effetto inibitorio dell'indinavir a stadi avanzati della crescita tumorale*: ci proponiamo di approfondire le modalità di azione dell'indinavir nel ritardare la crescita tumorale nella sua fase avanzata nel microcitoma e di estendere questo studio anche ad altri modelli di tumori. L'obiettivo di questo studio consiste nel valutare il possibile uso di questo farmaco in modo sequenziale all'efavirenz.

◦ *Valutare l'effetto di questi farmaci sulla motilità delle cellule tumorali*: in parallelo agli studi sopra riportati, ci proponiamo inoltre di valutare se gli inibitori di RT e di PI abbiano un effetto sulla motilità ed invasività delle cellule tumorali.

Budget

I° anno

Finanziamento totale	€ 250.000

Questo budget è stato utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget è stato suddiviso tra le diverse U.O. partecipanti indicate a pag. 48.

II° anno

Finanziamento totale	€ 225.000

Questo budget verrà utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget verrà suddiviso tra le diverse U.O. indicate a pag. 48, coerentemente al primo anno di attività.

III° anno. Il budget del III° anno verrà eventualmente confermato, dopo valutazione ed approvazione del "Progress Report" sui risultati ottenuti nei due anni precedenti.