

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

U.O. 14 – Responsabile Scientifico: Barbara Ensoli, ISS

U.O. 15 – Responsabile Scientifico: Paola Sinibaldi Vallebona, Università Tor Vergata, Roma

U.O. 16 – Responsabile Scientifico: Corrado Spadafora, ISS

Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 14 - Dr.ssa Barbara Ensoli, Centro Nazionale AIDS, ISS

Nostrì studi recenti hanno mostrato che una classe di farmaci antiretrovirali, 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 fuse 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, mediante il blocco dell'invasione cellulare e dell'attivazione della metalloproteasi della matrice-2, 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; Toschi et al., *submitted*).

Sulla base di questi dati è stata avviata una sperimentazione clinica multicentrica di fase II per valutare l'attività di Indinavir come monoterapia in pazienti con CKS iniziale o avanzato. I risultati dell'analisi ad interim hanno indicato che il trattamento con Indinavir è ben tollerato ed induce un'elevata frequenza di risposta nei soggetti con CKS iniziale; al contrario nel CKS avanzato e complicato, il trattamento con indinavir induce una temporanea stabilizzazione di malattia, generalmente seguita da progressione. La risposta al trattamento richiede elevati livelli plasmatici di farmaco ed è associata ad una significativa diminuzione del numero di cellule endoteliali circolanti e alla stabilizzazione dei livelli plasmatici di MMP e di fattori angiogenici, quali il bFGF (Monini et al., AIDS 2009). Questi dati sono coerenti con l'azione dei farmaci ad azione anti-angiogenica, i quali sono in grado di bloccare la crescita dei tumori iniziali ma non dei tumori avanzati, la cui vascolatura è già differenziata e stabilizzata ed indicano che nel CKS avanzato il trattamento con Indinavir potrebbe essere efficace in associazione a chemioterapia convenzionale e/o come terapia di mantenimento dopo riduzione della massa tumorale. Sulla base di questi dati, è stata avviata un nuovo studio clinico di fase II per il trattamento del CKS avanzato con Indinavir in associazione a chemioterapia. Lo studio prevede un trattamento di induzione debulking con indinavir associato a Vinblastina e Bleomicina, ed una fase di mantenimento con Indinavir in monoterapia.

I nostri studi hanno inoltre indicato che un altro bersaglio potenzialmente efficace per la terapia dei tumori sono le RT cellulari, 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 le U.O. 16 e 17, 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 singenico; 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*.

a) Valutazione degli effetti antiangiogenici ed antitumorali di indinavir ed efavirenz, da soli od in associazione, in 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 settimane 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 1×10^6 cellule B16-F10. In queste condizioni sperimentali è stata osservata 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 ($2-3 \text{ cm}^2$), 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.

È stato, inoltre, effettuato un esperimento per valutare l'effetto del trattamento con HIV-PI o NNRTI in un tumore caratterizzato da alta incidenza nell'uomo, quale il carcinoma del colon. A tale scopo gli animali sono stati trattati con indinavir o efavirenz, e 2 giorni dopo sono stati inoculati sottocute, previo irraggiamento subletale, con una linea di carcinoma umano del colon (cellule SW480, 3×10^6 cellule/topo). Il trattamento è stato proseguito per 63 giorni. Entrambi i farmaci hanno avuto un effetto modesto ma sensibile sulla crescita del tumore, suggerendo che anche in questo modello tumorale umano è utilizzabile per valutare gli effetti antitumorali del trattamento combinato con i 2 farmaci.

Gli effetti antitumorali del trattamento con HIV-PI e NNRTI in associazione sono stati studiati in un altro modello di tumore umano ad alta incidenza nell'uomo, quello del 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, 1×10^6 cellule/topo). Il trattamento è stato proseguito per 53 un totale di giorni. Sebbene il trattamento con i 2 farmaci somministrati separatamente abbia inibito modestamente la crescita di questo modello tumorale allogenic, la somministrazione combinata di indinavir ed efavirenz ha avuto un effetto anti-tumorale additivo.

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 nei tumori dei topi trattati con indinavir e/o efavirenz rispetto ai controlli trattati con salina, mediante analisi immunoistochimica di marker endoteliali (CD31), di proliferazione e del ciclo cellulare (Ki67) e con TUNEL test. A tuttora è stata effettuata l'analisi dei marcatori dell'endotelio vascolare e dei fattori angiogenici nei tumori indotti dalla linea di melanoma murino B16, sia nel modello singenico che nel topo immunocompromesso, tuttavia, questo tipo di indagine è stata resa difficoltosa dalla presenza di necrosi emorragica all'interno delle masse tumorali, probabilmente a causa degli elevati livelli di VEGF, fattore angiogenico noto per indurre edema e stravasamento ematico, prodotti dalle cellule tumorali stesse. L'analisi proseguirà quindi nei modelli tumorali di carcinoma del colon e della mammella.

Recenti evidenze della letteratura indicano che gli HIV-PI sono in grado di modulare la risposta immune e l'infiammazione associata a tumori. Infatti, è stato dimostrato che questi farmaci sono in grado di inibire l'apoptosi di linfociti T e cellule progenitrici ematopoietiche, le risposte infiammatorie NF- κ B-mediate e l'attivazione di cellule dendritiche, e di modulare le risposte immuni T-citotossiche. Per determinare se il blocco della crescita tumorale osservato con HIV-PI e/o NNRTI sia in parte dovuto agli effetti di questi farmaci sulla risposta immune, abbiamo utilizzato un modello di immunità umorale e cellulare in uso nel nostro laboratorio basato su topi immunocompetenti immunizzati con la proteina Tat. A tale scopo, topi Balb-c sono stati trattati giornalmente mediante gavage intragastrico con un cocktail di farmaci antiretrovirali contenente NNRTI (efavirenz) od HIV-PI (kaletra, costituito dall'associazione di lopinavir con ritonavir, uno degli ultimi farmaci di questa classe ad essere entrato nella pratica clinica), a dosi comparabili a quelle utilizzate nell'uomo. Due giorni dopo i topi hanno cominciato un protocollo di immunizzazione con la proteina Tat (7.5 μ g, 2 priming per via intradermica seguiti da un boost per via sottocutanea in associazione ad adiuvante, ogni 15 giorni), continuando il trattamento con i farmaci per 45 giorni. Risultati preliminari di questo esperimento indicano che né il trattamento con HIV-PI né con NNRTI hanno effetti sensibili sulla risposta immune umorale (produzione di IgG e IgM specifiche, tipo di epitopi specifici riconosciuti), e sulla risposta immune cellulare (studiata mediante valutazione ELISpot della produzione di IFN- γ , IL2 e IL4 da parte degli splenociti dei topi immunizzati. L'analisi statistica di questi dati è in corso. I risultati di questi esperimenti suggeriscono che l'azione antitumorale di HIV-PI e NNRTI non sia mediata da effetti sulla risposta immune.

Infine, è stata valutata la capacità di indinavir di bloccare la progressione di lesioni di neoplasia cervicale intraepiteliale (CIN) o la loro insorgenza in un modello di topo transgenico per le proteine E6 ed E7 di HPV, in collaborazione con il Dr Enrico Giraudo (Università di Torino). Questo topo transgenico sviluppa lesioni CIN in seguito a trattamento con estrogeni (Girando et al JCI 2004). Gli animali (12 per gruppo) sono stati trattati con indinavir alle dosi convenzionali o 3X più alte di quelle utilizzate in pazienti HIV⁺ (35mg/Kg/day). Il farmaco è stato somministrato tramite gavage intragastrico una volta al giorno per 6 settimane. I trattamenti 1X e 3X sono stati ben tollerati dagli animali senza evidenziare alcun

segno di tossicità. I risultati ottenuti mostrano come l'indinavir sia in grado di ridurre l'incidenza tumorale. L'analisi in immunofluorescenza effettuata con il mAb anti-Meca32, marker selettivo per le cellule endoteliali, ha evidenziato che nei tessuti provenienti dagli animali trattati con indinavir vi è una forte riduzione della densità vascolare e l'angiogenesi tumorale. In particolare, la dose 1X ha ridotto la densità vascolare rispettivamente del 35% e quella 3X del 53%. L'analisi degli effetti pro-apoptotici degli HIV-PI è stata fatta sui tessuti murini utilizzando un anticorpo capace di riconoscere specificamente la forma attivata della caspasi-3. I risultati ottenuti hanno evidenziato che indinavir alla dose 1X aumenta di 1.7 fold l'indice apoptotico, mentre alla dose 3X determina un aumento di 2.9 fold rispetto al controllo. In parallelo, le indagini sulla proliferazione cellulare, effettuate utilizzando un anticorpo anti-Ki-67, hanno mostrato che i farmaci mantengono pressoché invariati gli indici tumorali di proliferazione. Tutti questi dati, nel loro insieme, ci fanno pensare che indinavir già da solo abbia un ottimo potenziale antitumorale e pro-apoptotico nel modello murino di topo transgenico esprimente HPV. Successive indagini accerteranno se questo HIV-PI possa interferire anche con l'espressione di p16 e l'espressione e l'attivazione di MMPs e VEGF. Studi di tossicità in vivo con efavirenz da solo od in associazione con HIV-PI sono in fase di allestimento.

b) Valutazione degli 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.

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 μ M di farmaco per 4-5 giorni. Tali concentrazioni sono paragonabili a quelle osservate nel plasma di pazienti HIV⁺ trattati con dosi terapeutiche di indinavir. 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 scopo queste linee cellulari sono state coltivate per 5 giorni con indinavir (0.1, 1 e 10 μ M) 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 μ M. 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).

Vari studi hanno dimostrato che, a dosi elevate, il ritonavir ed il saquinavir sono in grado di modulare l'attività del proteasoma (André et al Proc Natl Acad Sci 1998; Tovo AIDS 2000; Piccinini et al AIDS 2001; Pati et al., Blood 2002, Gaedicke et al. Cancer Res 2002). Tali effetti richiedono concentrazioni di farmaco simili o superiori ai livelli terapeutici di picco. Poiché il proteasoma controlla molteplici pathway cellulari, tra cui il turnover delle proteine, l'apoptosi, l'emivita e l'attività di proteine che regolano il ciclo cellulare, e la maturazione e l'attivazione di NF- κ B, per approfondire i meccanismi alla base dell'attività anti-tumorale dell'indinavir abbiamo analizzato gli effetti di concentrazioni di indinavir simili e superiori alle dosi terapeutiche di picco sulla crescita, la sopravvivenza e la capacità invasiva in vitro di cellule da carcinoma del colon (linea SW-480). I risultati ottenuti hanno dimostrato che il farmaco è in grado di bloccare l'invasione di questa linea neoplastica a tutte le concentrazioni testate, senza effetti sulla crescita basale o sulla sopravvivenza cellulare.

Si è quindi valutato se il trattamento di queste cellule tumorali con dosi elevate di indinavir possa influenzare l'accumulo di I κ B α e di p21, la cui degradazione è mediata dal proteasoma. I risultati ottenuti hanno dimostrato che elevate concentrazioni di indinavir non bloccano la degradazione di I κ B α indotta da TNF α ed non inducono un accumulo di p21 in queste cellule che si sono invece rivelate assai sensibili all'azione dell'epoxomicina, un noto inibitore del proteasoma (Toschi et al, submitted). Questi

risultati suggeriscono che concentrazioni di indinavir simili o superiori a quelle presenti nel plasma di pazienti possono indurre inibizione della crescita tumorale grazie alla loro capacità di bloccare l'angiogenesi con un meccanismo d'azione indipendente dal proteasoma.

Infine, 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 μM per identificare le dosi alle quali si ottiene la massima risposta e le dosi subottimali da utilizzare successivamente negli esperimenti di associazione con indinavir.

Parallelamente agli esperimenti in vivo sul modello murino di neoplasia CIN, in collaborazione con il Prof. Giovanni Barillari (Università "Tor Vergata") sono stati inoltre condotti esperimenti di proliferazione ed invasione su linee cellulari di carcinoma della cervice (CaSki ed HeLa, rispettivamente contenenti HPV-16 e HPV-18) coltivate in presenza di indinavir alla dose di 10 μM per un periodo di 24, 48, 72 o 96 ore. I risultati ottenuti sulle cellule HeLa hanno indicato che indinavir non influenza la proliferazione, ma riduce in modo tempo-dipendente l'invasività cellulare. Il trattamento con la medesima dose di HIV-PI sulle cellule CaSki ha invece indicato che indinavir non ha alcuna efficacia su proliferazione o invasione. Allo scopo di comprendere quale meccanismo possa regolare l'inibizione di invasione determinata da questi HIV-PI si è analizzata l'espressione, tramite RT-PCR, di MMP-2 ed MMP-9 in seguito al trattamento di queste linee cellulari con la dose 10 μM utilizzata nei saggi precedentemente descritti. I risultati ottenuti indicano che indinavir è in grado di ridurre l'espressione di MMP-2 rispettivamente del 25% in cellule HeLa. Nelle cellule CaSki, invece, non si è rilevata una riduzione di MMP-2 a carico dell'indinavir. Ulteriori esperimenti sono attualmente in corso con il clone di cellule CIN2 9E in cui HPV-31 è in forma episomale coltivato in presenza di fibroblasti feeder e, in parallelo, in colture organotipiche.

I dati ottenuti nell'ambito di questi studi forniranno, attraverso la dimostrazione dell'efficacia in appropriati studi clinici, l'opportunità di sviluppare nuove strategie terapeutiche per la cura di forme tumorali frequenti in pazienti infettati o meno da HIV-1. L'utilizzo di questi farmaci caratterizzati da bassa tossicità e costo moderato, da soli od in combinazione con chemioterapici, potrebbe significativamente migliorare il trattamento dei pazienti e la loro qualità di vita.

Pubblicazioni

- 1) Monini P, Sgadari C, Toschi E, Barillari G, Ensoli B. Antitumor effects of antiretroviral activity. *Nat. Rev. Cancer*, 4:861-875, 2004.
- 2) Monini P, Toschi E, Sgadari C, Bacigalupo I, Palladino C, Carlei D, Barillari G, Ensoli B. The use of HAART for biological tumour therapy. *J. HIV Ther*, 11:53-56, 2006.
- 3) Monini P, Sgadari C, Grosso MG, Bellino S, Di Biagio A, Toschi E, Bacigalupo I, Sabbatucci M, Cencioni G, Salvi E, Leone P, Barillari G, Gatti G, Caratelli L, Ensoli B. Concerted Action on Kaposi's Sarcoma. Clinical course of classic Kaposi's sarcoma in HIV-negative patients treated with the HIV protease inhibitor indinavir. *AIDS*, 2009 Feb 20;23(4):534-8.
- 4) Toschi E, Sgadari C, Malavasi L, Bacigalupo I, Chiozzini C, Carnei D, Compagnoni D, Bellino S, Falchi M, Palladino C, Leone P, Barillari G, Ensoli B, Monini P. Human immunodeficiency virus protease inhibitors are effective against highly prevalent human tumors via a proteasome-independent block of angiogenesis and matrix metalloproteases. (sottomesso per la pubblicazione a *Int J Cancer*).

Pubblicazioni correlate all'argomento

- 1) Sgadari C, Barillari G, Toschi E, Carlei D, Bacigalupo I, Baccarini S, Palladino C, Leone P, Bugarini R, Malavasi L, Cafaro A, Falchi M, Valdembri D, Rezza G, Bussolino F, Monini P, Ensoli B. HIV protease inhibitors are potent anti-angiogenic molecules and promote regression of Kaposi's sarcoma. *Nat. Med.*, 8:225-232, 2002.

- 2) Ensoli B. HIV protease inhibitors have specific anti-cancer effects. *Biomed. & Pharmacother.*, Vol. 56, No. 8, 2002.
- 3) Sirianni MC, Vincenti L, Topino S, Giovanetti A, Mazzetta F, Libi F, Scaramuzzi D, Andreoni M, Pinter E, Baccharini S., Rezza R, Monini P, Ensoli B. NK cell activity controls human herpesvirus 8 latent infection and is restored upon HAART in AIDS patients with regressing Kaposi's sarcoma. *Eur. J. Immunol.*, 32:2711-2720, 2002.
- 4) Toschi E, Sgadari C, Monini P, Barillari G, Bacigalupo I, Palladino C, Baccharini S, Carlei D, Grosso G, Sirianni MC, Ensoli B. Treatment of Kaposi's Sarcoma, an update. *Anti-Cancer Drugs*, 13:977-987, 2002.
- 5) Monini P, Sirianni MC, Ensoli B. Concomitant clearance of human herpesvirus 8 from blood and regression of leukopenia-associated aggressive classic Kaposi's sarcoma upon α -interferon therapy. *Oncol. Rev. J.*, issue 4, pp.18-20, 2002.
- 6) Sgadari C, Monini P, Toschi E, Baccharini S, Grosso MG, Moracci G, Malavasi L, Ensoli B. HIV Protease Inhibitors inhibit Kaposi's sarcoma by blocking angiogenesis and tumour cell invasion. *Haematologica*, (Meeting Supplement 1 to n. 11) 87:37-41, 2002.
- 7) Monini P, Sgadari C, Barillari G, Ensoli B. The HIV protease inhibitors: anti-retroviral agents with anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-tumor activity. *J. Antimicrobial Chemother.*, 51:207-211, 2003.
- 8) Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Monini P. The Fibroblast Growth Factors. In: *The Cytokine Handbook (IV Edition, Chapter 31, Thomson A. and Lotze M. Eds.)*, Vol. II, pp.747-781, 2003.
- 9) Barillari G, Sgadari C, Toschi E, Monini P, Ensoli B. HIV protease inhibitors as new treatment options for Kaposi's sarcoma. *Drug Res. Update*, 6:173-181, 2003.
- 10) Sgadari C, Monini P, Barillari G, Ensoli B. Use of HIV protease inhibitors to block Kaposi's sarcoma and tumour growth. *Lancet Oncol.*, 4:537-547, 2003.
- 11) Alessandri G, Fiorentini S, Licenziati S, Bonafede M, Monini P, Ensoli B, Caruso A. CD8(+)CD28(-) T lymphocytes from HIV-1-infected patients secrete factors that induce endothelial cell proliferation and acquisition of Kaposi's sarcoma cell features. *J. Interferon Cytokine Res.*, 23:523-531, 2003.
- 12) Sirianni MC, Libi F, Campagna M, Scaramuzzi D, Monini P, Ensoli B. Role of killer inhibitory receptors in human herpesvirus type 8 infection and KS development. In Monduzzi Eds., *International Proceedings Division, 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montreal (Canada), July 18 – July 23, 2004*, pp. 257-259.
- 13) Sirianni MC, Libi F, Campagna M, Rossi D, Capello D, Sciaranghella G, Carbone A, Simonelli C, Monini P, Gaidano G, Ensoli B. Down-regulation of the major histocompatibility complex class I molecules by human herpesvirus type 8 and impaired natural killer cell activity in primary effusion lymphoma development. *Br. J. Haematol.*, 130:92-95, 2005.
- 14) Garrafa E, Alessandri G, Benetti A, Turetta D, Corradi A, Cantoni AM, Cervi E, Bonardelli S, Parati E, Giulini SM, Ensoli B, Caruso A. Isolation and characterization of lymphatic microvascular endothelial cells from human tonsils. *J. Cell. Physiol.*, 207:107-113, 2006.
- 15) Sgadari C, Toschi E, Bacigalupo I, Sabbatucci M, Palladino C, Carlei D, Barillari G, Ensoli B. Patogenesi del Sarcoma di Kaposi. In: *Tumori ed Infezioni da HIV. Patogenesi e studi clinici del GICAT (Italian)*. Milano: Biomedica, pp. 15-26, 2006.
- 16) Simonelli C, Talamini R, Bearz A, Berretta M, Spazzapan S, Monini P, Sgadari C, Sartor I, Ensoli B, Tirelli U. Interleukin-2 continuous infusion and angiogenesis surrogate markers in metastatic renal cell carcinoma. *Ann. Oncol.*, 17:1335-1336, 2006.

Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 15 - Prof.ssa Paola Sinibaldi Vallebona, Università Tor Vergata, Roma

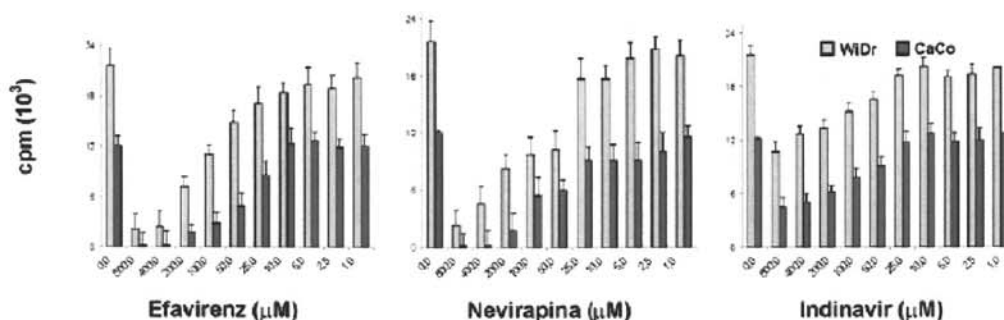
La trasformazione tumorale è un processo multifattoriale che vede coinvolte sia funzioni proprie della cellula che fattori microambientali. La chemioterapia tradizionale, rivolta all'eliminazione selettiva delle

cellule neoplastiche, è stata oggi parzialmente affiancata da terapie innovative, che tendono ad inibire la progressione del tumore, agendo su processi associati al suo sviluppo.

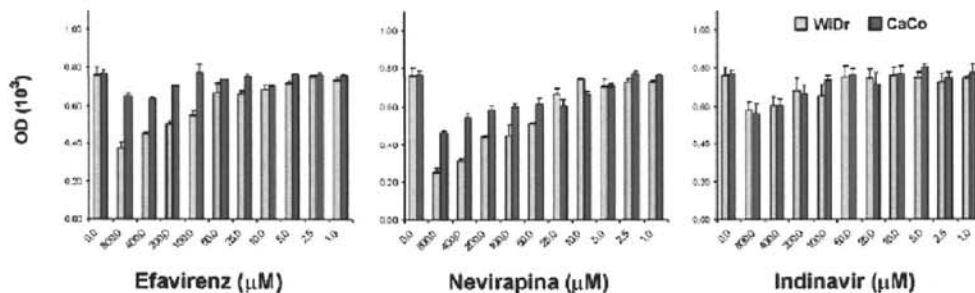
È' acquisizione recente che farmaci ad attività antiretrovirale, inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI) ed inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI) siano anche in grado di esercitare attività anti-proliferativa nei confronti di cellule tumorali.

Nel presente progetto è stata preliminarmente indagata l'attività antitumorale di tali farmaci, su modelli preclinici, che rappresentano la fase di studio preliminare alla sperimentazione clinica sull'uomo. Successivamente siamo andati a saggiare l'efficacia anti-proliferativa (Figura 1A) e l'attività citotossica (Figura 1B) di Indinavir, Efavirenz e Nevirapina su due linee di adenocarcinoma del colon di derivazione umana (WiDr e CaCo). I tests eseguiti hanno evidenziato per Nevirapina ed Efavirenz un elevato effetto anti-proliferativo, maggiore rispetto a quello indotto da Indinavir. Tutte e tre le molecole analizzate hanno però dimostrato di possedere una ridotta attività citotossica. La linea cellulare CaCo è risultata maggiormente inibita nella proliferazione ma meno sensibile all'effetto citotossico esercitato dai farmaci,

A)



B)



rispetto alla linea WiDr (Tabella 1).

Figura 1. Effetto su A) proliferazione cellulare e B) metabolismo cellulare.

	CaCo	CaCo	WiDr	WiDr
	CC ₅₀ (μM)	PIC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	PIC ₅₀ (μM)
Efavirenz	2450.00	81.66	672.28	296.65
Nevirapina	1037.81	138.44	445.27	248.06
Indinavir	1373.61	474.86	1604.58	667.02

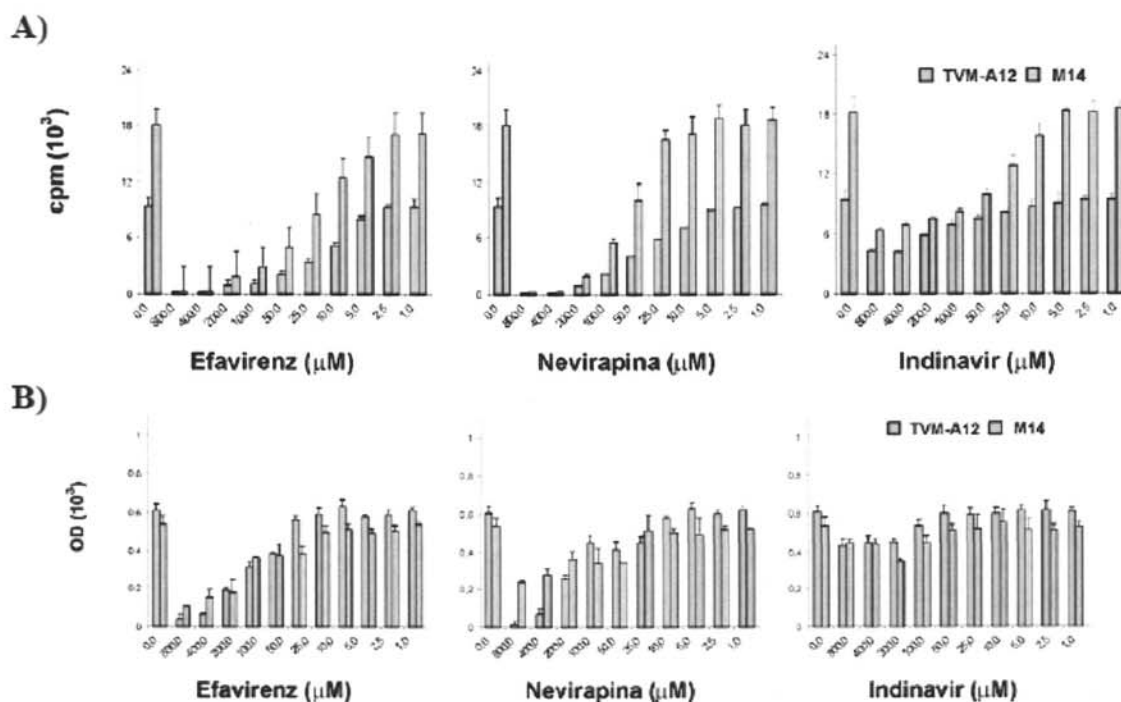
CC₅₀= Citotoxic concentration 50 calcolata mediante MTS assay

PIC₅₀= Proliferating inhibitory concentration 50 calcolata mediante incorporazione di timidina triziata

Tabella 1

Sulla base di nostri recenti studi sul coinvolgimento di un retrovirus endogeno umano (HERV-K) nel processo di progressione del melanoma, avevamo proposto come ulteriore obiettivo del presente

progetto quello di indagare l'efficacia sia di HIV-PI che di NNRTI nei confronti di cellule di melanoma. A tal fine è stata valutata l'attività anti-proliferativa (Figura 2A) e citotossica (Figura 2B) esercitata da Nevirapina, Efavirenz ed Indinavir nei confronti di due linee cellulari di melanoma umano (TVM-A12 e M14), in cui avevamo in precedenza dimostrato la presenza di un retrovirus endogeno, appartenente alla famiglia degli HERV-K. I dati ottenuti, riportati in Tabella 2 confermano quanto abbiamo già descritto



per le linee di adenocarcinoma del colon umano.

Figura 2. Effetto su: **A)** proliferazione cellulare e **B)** metabolismo cellulare.

	TVM-A12	TVM-A12	M14	M14
	CC ₅₀ (μM)	PIC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	PIC ₅₀ (μM)
Efavirenz	271.31	82.29	320.06	111.27
Nevirapina	286.68	175.53	547.17	187.97
Indinavir	1128.00	561.13	1935.00	352.82

CC₅₀= Citotoxic concentration₅₀ calcolata mediante MTS assay

PIC₅₀= Proliferating inhibitory concentration₅₀ calcolata mediante incorporazione di timidina triziata

Tabella 2

Poiché i dati ottenuti evidenziavano che gli NNRTI era quelli che maggiormente inibivano l'attività proliferativa cellulare, pur non inducendo un marcato effetto tossico, evidenziabile come variazione del metabolismo cellulare, siamo andati a verificare se l'inibizione della capacità replicativa potesse essere attribuita ad in potenziale effetto differenziante, come peraltro avevamo in precedenza già dimostrato nei confronti di un'altra linea di melanoma umano (A-375).

L'osservazione (mediante microscopia ottica, elettronica a scansione e confocale) conferma come entrambi i farmaci antiretrovirali, inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa, siano in grado di modificare il fenotipo, in modo rapido (già dopo 4-5 gg dal trattamento), facendo acquisire alle cellule di melanoma umano una morfologia simil-dendritica, un'aumentata capacità adesiva al substrato ed una riorganizzazione del citoscheletro. In Figura 3 sono riportate le immagini relative al trattamento della