

linea cellulare di melanoma umano TVM-A12 con il farmaco nevirapina. Nessun effetto differenziante è stato invece riscontrato nelle colture trattate con Indinavir.

Nell'ambito dello studio condotto sulla linea di melanoma umano TVM-A12 abbiamo occasionalmente osservato che mantenendo la coltura in presenza di una bassa concentrazione di siero bovino fetale (1%) le cellule crescevano in sospensione, anche quando la concentrazione di siero veniva riportata ai valori standard (10%). Tale fenomeno veniva invece inibito se le colture in monostrato venivano addizionate con Efavirenz, Nevirapina od Indinavir. L'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione delle cellule con fenotipo modificato evidenziava inaspettatamente la presenza di particelle virali, identificate come appartenenti alla famiglia dei retrovirus endogeni umani HERV-K.

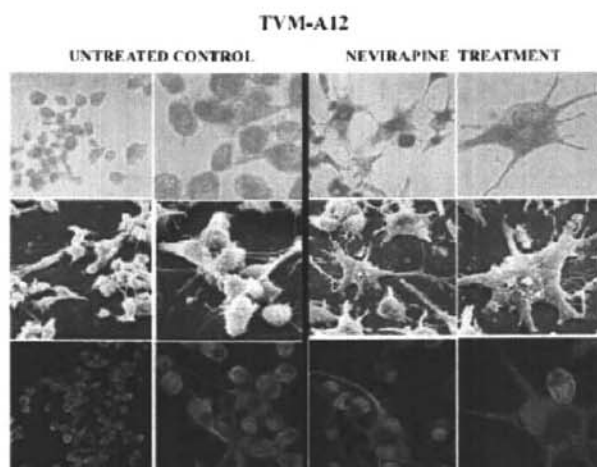


Figura 3

Sia sulla linea parentale di melanoma umano TVM-A12 che sulle cellule con crescita in sospensione (indicate come Clone 6) è stata valutata mediante Real Time PCR la capacità di Nevirapina, Efavirenz ed Indinavir di inibire l'espressione di HERV-K (Figura 4).

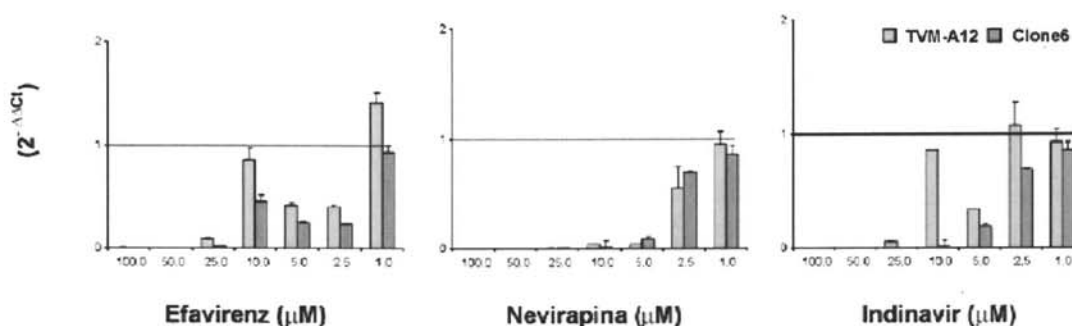


Figura 4

| | TVM-A12 | Clone 6 |
|------------|-----------------------|-----------------------|
| | IC ₅₀ (μM) | IC ₅₀ (μM) |
| Efavirenz | 11.37 | 8.01 |
| Nevirapina | 2.2 | 1.89 |
| Indinavir | 29.97 | 6.00 |

IC₅₀= concentrazione inibitoria del 50% dell'espressione di HERV-K

Tabella 3

I dati riportati in Figura 4 evidenziano come Nevirapina sia il farmaco che presenta maggiore efficacia nell'inibire l'espressione virale ed Indinavir quello che risulta invece essere dotato di minore effetto. Le cellule del Clone 6, che corrispondono alla popolazione cellulare in cui il virus HERV-K risulta riattivato, sono ovviamente più sensibili all'inibizione dell'espressione del virus, rispetto alla linea parentale. Sugli stessi sistemi cellulari è stata anche valutata l'attività anti-proliferativa (Figura 5A) e citotossica (Figura 5B) esercitata dai farmaci oggetto dello studio.

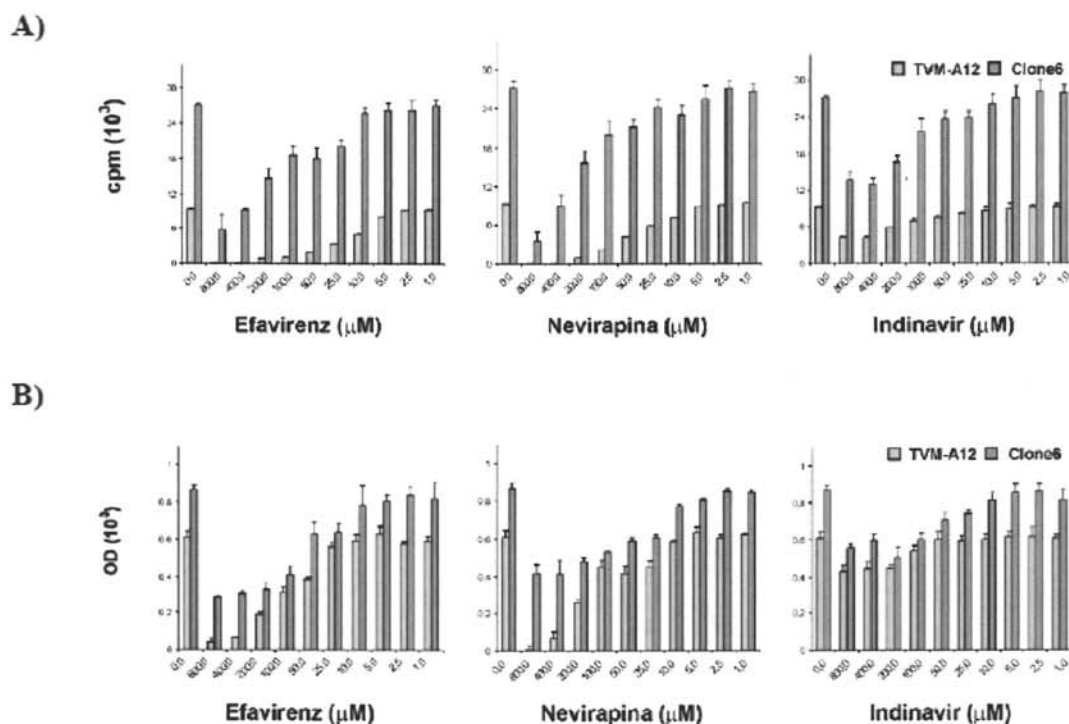


Figura 5. Effetto su: A) proliferazione cellulare e B) metabolismo cellulare.

| | TVM-A12 | TVM-A12 | Clone 6 | Clone 6 |
|------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | CC ₅₀ (μM) | PIC ₅₀ (μM) | CC ₅₀ (μM) | PIC ₅₀ (μM) |
| Efavirenz | 271.31 | 82.29 | 384.40 | 339.90 |
| Nevirapina | 286.68 | 175.53 | 560.75 | 358.54 |
| Indinavir | 1128.00 | 561.13 | 966.70 | 630.70 |

CC₅₀= Citotoxic concentration ₅₀ calcolata mediante MTS assay

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

Tabella 4

Confrontando poi le concentrazioni dei farmaci, attive nell'indurre attività citotossica ed antiproliferativa (Tabella 4), con quelle attive nell'inibire l'espressione virale (Tabella 3) risulta evidente come tutti e tre i farmaci possiedano un'elevata specificità antiretrovirale.

Conclusioni

La sperimentazione condotta ci permette di concludere che i farmaci antiretrovirali, siano essi inibitori della proteasi di HIV o inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa, sono in grado di esercitare attività antitumorale, che sembra essere maggiore nei confronti delle cellule tumorali umane (adenocarcinoma di colon e melanoma) rispetto a quelle di derivazione murina o di ratto. L'attività anti-

proliferativa, associata a scarsa tossicità ed a marcata attività differenziante, sembrerebbe indicare tali farmaci come eccellenti antitumorali.

Nei confronti del melanoma poi, in cui nostri studi confermano la presenza all'interno delle cellule del tumore di retrovirus endogeni umani (HERV-K) riattivati, con ogni probabilità responsabili della progressione tumorale e della metastatizzazione, farmaci che associano proprietà antiretrovirale ed antitumorale sembrano rappresentare farmaci di elezione.

Risulta inoltre non trascurabile il fatto che tutti i farmaci che abbiamo preso in esame nello studio, sono già ampiamente utilizzati nella terapia dell'AIDS e che le dosi utilizzate corrispondono a quelle attualmente impiegate nelle terapie HAART. Ciò ne permetterebbe l'impiego, senza necessità di ulteriori studi di tossicità, in patologie quali l'adenocarcinoma del colon e soprattutto il melanoma, che al momento non possiedono una terapia farmacologica soddisfacente.

Publicazioni:

- 1) Serafino A, Balestrieri E, Pierimarchi P, Matteucci C, Moroni G, Oricchio E, Rasi G, Mastino A, Spadafora C, Garaci E, Sinibaldi Vallebona P. The activation of human endogenous retrovirus K (Herv-K) is implicated in melanoma cell malignant cell transformation. *Exp Cell Res.* 2009 Mar 10;315(5):849-62.
- 2) Serafino A, Balestrieri E, Pierimarchi P, Matteucci C, Rasi G, Moroni G, Mastino A, Garaci E, Sinibaldi Vallebona P. Activation of human endogenous retrovirus-K and production of infectious virus-like particles in human melanoma cells. *Melanoma Research* 16: Sup. 1 September 2006.
- 3) Sinibaldi Vallebona P, Lavia P, Garaci E, Spadafora C. A role for endogenous reverse transcriptase in tumorigenesis and as a target in differentiating cancer therapy. *Gene, Chromosomes and Cancer* 45, 1-10, 2006.
- 4) Sciamanna I, Landriscina M, Pittoggi C, Quirino M, Mearelli C, Baraldi R, Mattei E, Serafino A, Cassano A, Sinibaldi Vallebona P, Garaci E, Barone C, Spadafora C. Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth. *Oncogene* 24 (24) 3923-31, 2005.

Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 16 - Dr. Corrado Spadafora, SBGSA, ISS

1. Interazioni sinergiche antitumorali con inibitori della trascrittasi inversa (RT).

Questa parte del progetto, iniziata in collaborazione con la U.O. 14 (Barbara Ensoli), era originariamente finalizzata all'obiettivo di stabilire se gli inibitori non nucleosidici della RT (efavirenz, nevirapina) e gli inibitori delle proteasi (indinavir) fossero in grado di esercitare una sinergica e potenziata azione antitumorale se adoperati in combinazione. Lo studio è stato effettuato *in vitro*, su linee cellulari, ed *in vivo*, su topi nudi inoculati con cellule A-375 ed i risultati, riportati nei precedenti Progress Reports, sono stati sostanzialmente negativi. L'indinavir si è dimostrato poco efficace sia *in vitro* che *in vivo*, con l'eccezione nella fase di crescita terminale del tumore inoculato in topi nudi, e gli effetti osservati sono sostanzialmente equivalenti a quelli ottenuti con i soli inibitori non nucleosidici RT. Questo studio è stato successivamente esteso anche a combinazioni con inibitori nucleosidici di RT, come l'abacavir, ed in particolare sulla combinazione efavirenz/abacavir.

L'efavirenz (efv) e l'abacavir (abc) sono stati combinati a differenti concentrazioni ed i loro effetti testati sulla linea cellulare A-375 di melanoma umano dopo 96 ore di esposizione, come riassunto nella Fig. 1. In particolare, le combinazioni (efv 25 μ M + abc 75 μ M) e (efv 30 μ M + abc 75 μ M) hanno dimostrato un significativo effetto sinergico, che sostanzialmente annulla la proliferazione delle cellule esposte, rispetto agli effetti esercitati individualmente dai singoli composti. La Fig. 2 dimostra inoltre che, in concomitanza alla ridotta proliferazione, la combinazione delle due molecole - soprattutto efv 25 μ M + abc 75 μ M - induce morte cellulare. Al contrario, simili effetti non sono osservati su cellule non trasformate come i fibroblasti umani WI-38.

2. Sviluppo di una terapia genica finalizzata al silenziamento di LINE-1 utilizzando vettori virali.

Abbiamo riportato nei precedenti Reports gli effetti del silenziamento di LINE-1 per RNAi transitorio o permanente utilizzando un vettore retrovirale che esprime il piccolo RNA interferente diretto contro LINE-1. In entrambi i casi, la soppressione di LINE-1 tramite "RNA interference" provoca una ridotta proliferazione, una morfologia differenziata ed una minore tumorigenicità se le cellule interferite vengono inoculate in topi nudi. Questi dati sono stati oggetto di pubblicazioni negli anni precedenti. Allo scopo di valutare l'efficacia di tale approccio in esperimenti *in vivo* su modelli murini inoculati con tumori umani e per identificare il vettore virale più adatto a questo scopo, abbiamo esteso lo studio anche a vettori lentivirali ed adeno-associati (AAV). I lentivirus sono virus con genoma a RNA. Fanno parte della famiglia dei Retrovirus ma, a differenza dei retrovirus, sono in grado di infettare sia cellule in attiva divisione che cellule quiescenti. Allo scopo di ottenere un vettore lentivirale utilizzabile per terapia genica, abbiamo clonato all'interno del suddetto vettore lentivirale una sequenza oligonucleotidica di 19 bp che interferisce in maniera specifica con una porzione di sequenza dell'ORF1 della famiglia di LINE1 attiva in cellule umane. L'oligonucleotide di 19 bp è stato clonato all'interno del plasmide pLVTHM – che esprime anche il gene reporter GFP - ottenendo il vettore ricombinante pLVTHMshORF1h.

➤Proliferation assay (t: 96h):

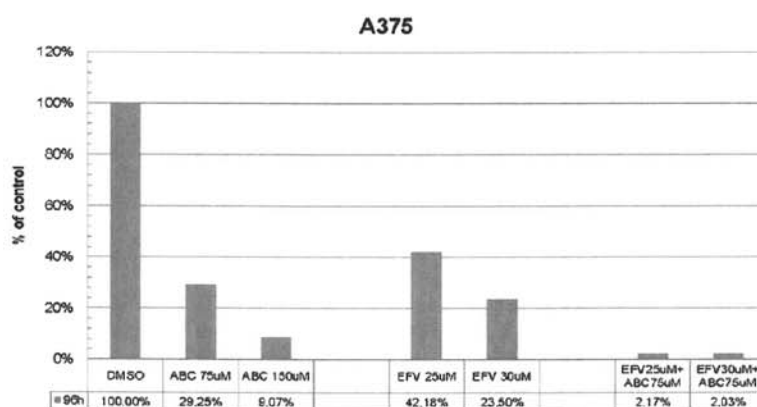


Figura 1

➤Cell death (t: 96h)

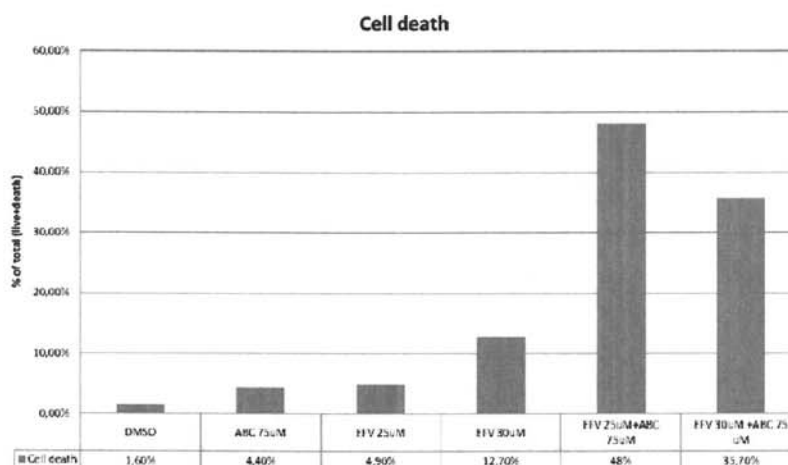


Figura 2.

Assieme al vettore lentivirale, lo stesso oligonucleotide di 19bp è stato clonato nel plasmide pAAV-MCS, ottenendo il vettore adenovirale ricombinante pAAV-shORF1h che verrà utilizzato per produrre dei vettori virali adeno-associati (AAV), virus con genoma a DNA a doppio filamento. In particolare, il vettore AAV ottenuto appartiene al sierotipo 2 (AAV2), il più efficiente per l'infezione della maggior parte dei tumori solidi e delle cellule del melanoma primario.

Entrambi i vettori sono stati utilizzati per un esperimento di trasfezione delle cellule 293T per verificare che il costrutto fosse in grado di esprimere correttamente l'oligonucleotide interferente, cosa che è stata confermata per Northern Blotting come riportato nella Fig. 3 (ultime due corsie).

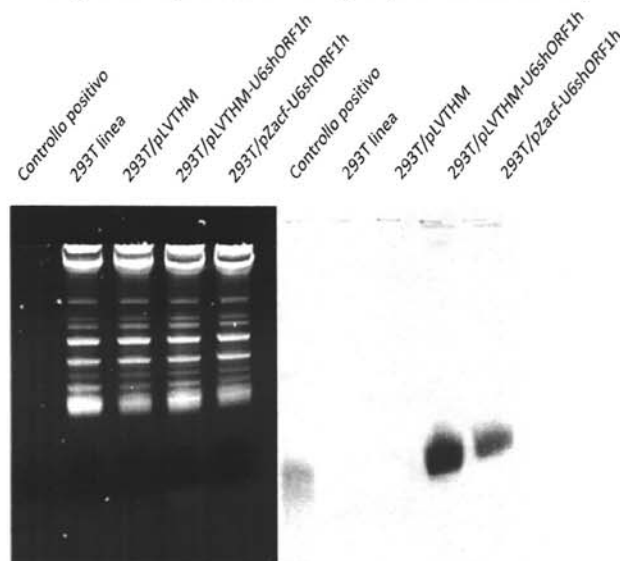


Figura 3

Il vettore lentivirale è stato utilizzato per produrre la progenie virale co-trasfettando le cellule 293T con il vettore ricombinante e i due vettori pCMV- Δ R8.2-dSaclI e pHCMVSV-G necessari per la produzione di particelle virali mature. Particelle lentivirali così ottenute contenenti il vettore lentivirale ricombinante LVTHM-shORF1h sono state testate infettando cellule A375.

Dal numero delle cellule GFP-fluorescenti, mostrato in **Fig. 4**, risulta che l'efficienza di infezione delle cellule A375 con il vettore virale è stato sufficientemente elevato. Tuttavia la fluorescenza tende a diminuire nel tempo indicando un probabile silenziamento della sequenza veicolata dal vettore. Esperimenti di RT-PCR sull'RNA delle cellule infettate, estratto in tempi diversi dall'infezione, confermano che non vi è silenziamento dell'ORF1 del retroelemento LINE1 nelle cellule infettate.

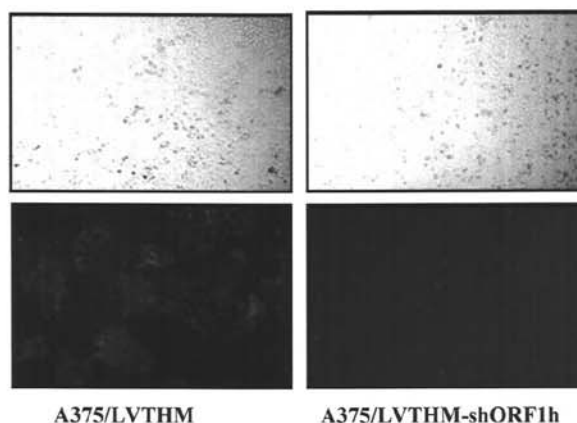


Figura 4

Lo stesso tipo di indagine è al momento in corso per valutare l'efficacia del vettore AAV2 ottenuto dal ricombinante pAAV-shORF1h.

3. Analisi per microarray del trascrittoma di cellule tumorali esposte ad inibitori RT.

Nell'ambito di questo programma avevamo caratterizzato l'alterazione dell'espressione dei "coding genes" in cellule di melanoma umano esposte ad inibitori dell'RT. In particolare, avevamo identificato circa 170 geni la cui espressione è fortemente modulata in seguito al trattamento rispetto alle stesse cellule non trattate. Estendendo il lavoro iniziato negli anni precedenti, nel corso del III° anno abbiamo investito una parte considerevole dei nostri sforzi in una ulteriore caratterizzazione della riprogrammazione del trascrittoma che segue l'inibizione dell' RT endogena. Paragonando i profili di espressione genica ottenuti attraverso nuovi screening per microarray di cellule A-375 esposte e non esposte a nevirapina ed efavirenz abbiamo identificato 20 microRNAs (miRNAs) ed oltre un centinaio di Ultra Conserved Coding Regions (UCRs) le cui espressioni sono fortemente modulate in seguito all'inibizione di RT. Questi nuovi risultati, in aggiunta a quelli precedentemente ottenuti, rivelano per la prima volta che la RT endogena svolge un ruolo regolativo non solo sull'espressione dei geni codificanti ma anche su quelli non codificanti e, più in generale, sull'intero trascrittoma nucleare. Questi risultati sono oggetto di un manoscritto in fase di completamento.

Publicazioni

- 1) Oricchio E, Sciamanna I, Beraldi R, Tolstonog GV, Schumann GG, Spadafora C. Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation, differentiation and tumor progression. *Oncogene*. 2007 26, 4226-4233.
- 2) Tafani M, Schito L, Anwar T, Indelicato M, Sale P, Di Vito M, Morgante E, Beraldi R, Makovec F, Letari O, Caselli G, Spadafora C, Pucci B, Russo MA. Induction of autophagic cell death by a novel molecule is increased by hypoxia. *Autophagy*. 2008 4, 1042-1053.
- 3) Spadafora C. A reverse transcriptase-dependent mechanism plays central roles in fundamental biological processes. *Syst Biol Reprod Med*. 2008 Jan-Feb;54(1):11-21.
- 4) Spadafora C. Sperm-mediated 'reverse' gene transfer: a role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information. *Hum Reprod*. 2008 23, 735-740.
- 5) Sciamanna I, Vitullo P, Curatolo A and Spadafora C. Retrotransposons, reverse transcriptase and the genesis of new genetic information. *GENE* (sottomesso per la pubblicazione)
- 6) Oricchio E, Sciamanna I and Spadafora C. Non-nucleosidic Reverse Transcriptase Inhibitors Antagonize Human LINE-1 Retrotransposition in Tumor Cells. (sottomesso per la pubblicazione a PLoSONE)

ALLEGATO 1**Progetto di ricerca su terapie oncologiche innovative
(ONCOTECNOLOGIA)- RENDICONTO COMPLESSIVO**

Finanziamento ex art. 2 comma 1, d.l. 89/2003

IMPORTO COMPLESSIVO FINANZIAMENTO EURO 9.000.000

| TITOLO DELLA RICERCA | FINANZIAMENTO utilizzato |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Attività di coordinamento dell'Istituto Superiore di Sanità | 505.004,00 |
| Le basi metodologiche per una chemioterapia anti-tumorale mirata: il saggio dell'EDR nel carcinoma ovarico ed in altre neoplasie | 2.220.000,00 |
| Genetica molecolare della farmacoresistenza neoplastica e dell'oncogenesi | 2.160.000,00 |
| Le basi cellulari della farmacoresistenza tumorale: le cellule neoplastiche primitive e i meccanismi antiapoptici | 2.015.000,00 |
| Identificazione di nuovi modulatori dell'angiogenesi tumorale per lo sviluppo di strategie anti-angiogeniche innovative | 699.999,00 |
| Infiammazione e progressione tumorale: effetto di inibitori di NF-kB e di "scavengers" di radicali liberi in modelli animali di cancro del colon, della mammella e della prostata | 469.998,00 |
| Regolazione del turnover di Bcl-2 RNA mediante RNA antisenso | 230.000,00 |
| 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 | 699.999,00 |
| | € 9.000.000,00 |