



Collegio Ghislieri

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

10° Corso di formazione avanzata

**Ricerca traslazionale
in ematologia/oncologia**

16-20 maggio 2011, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Carlo Bernasconi

10° Corso di formazione avanzata

**Ricerca traslazionale
in ematologia/oncologia**



Collegio Ghislieri

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

10° Corso di formazione avanzata

**Ricerca traslazionale
in ematologia/oncologia**

16-20 maggio 2011, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Carlo Bernasconi

© Copyright 2011 

Edizioni Internazionali srl
Divisione EDIMES - Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

Tutti i diritti sono riservati.
Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo
(compresi i microfilm e le copie fotostatiche)
senza il permesso scritto dell'editore.

Indice

Prefazione	pag. IX
------------------	---------

Introduzione al corso

1. Self-renewal e differenziazione delle cellule staminali:
insegnamenti dalla biologia dello sviluppo embrionale » 3
CarloAlberto Redi
2. Ricerca traslazionale e terapie cellulari nell'uomo » 17
Carlo Bernasconi
3. Conoscenze attuali sui meccanismi molecolari di controllo
dell'emopoiesi » 25
Sergio Ferrari
4. Attualità di citogenetica molecolare in ematologia » 33
*Antonio Cuneo, Sara Martinelli, Francesco Cavazzini,
Maria Ciccone, Antonella Bardi, Gian Matteo Rigolin*

Bioinformatica: strumento indispensabile nella ricerca traslazionale

5. Integrazione di dati e conoscenza a supporto della ricerca » 51
Paolo Romano
6. Knowledge-based data analysis and information retrieval » 65
Blaž Zupan
7. Il progetto ONCO-i2b2: integrazione di biobanche
e dati clinici a supporto della ricerca traslazionale
in oncologia » 71
*Riccardo Bellazzi, Daniele Segagni, Valentina Tibollo,
Arianna Dagliati, Leonardo Perinati, Alberto Zambelli,
Silvia Priori*

Argomenti di genomica medica

8. Genomica medica e pratica clinica » 79
Carlo Bernasconi
9. Profilo genico, prognosi e terapia dei tumori » 85
Alberto Zambelli, Anna Pagani
10. La centralità dell'RNA in biologia e medicina » 91
Angelo Nicolin

Targeted therapies: alcuni meccanismi d'azione

11. Inibizione terapeutica del proteasoma » 97
Paolo Milani, Giampaolo Merlini
12. Inibizione dei processi di metilazione del DNA » 105
Valeria Santini, Alessandro Sanna
13. Farmaci anti-angiogenici: come predire la risposta
e ottimizzare la terapia » 110
Francesco Bertolini
14. Targeted therapies con anticorpi monoclonali » 114
Marino Clavio, Marco Gobbi

Targeted therapies di alcune emopatie maligne e tumori solidi

15. Leucemia mieloide acuta e sindromi mielodisplastiche » 127
Paolo Bernasconi
16. Targeted therapy nelle malattie mieloproliferative
croniche Philadelphia-negative » 146
Alessandro Maria Vannucchi
17. Molecular basis of target therapy for aggressive B-Cell
lymphoma » 152
*Riccardo Bruna, Silvia Rasi, Alessio Brusca, Valeria Spina,
Michaela Cerri, Clara Deambrogi, Sara Monti, Stefania Cresta,
Daniela Piranda, Marco Fangazio, Silvia Franceschetti,
Daniela Capello, Davide Rossi, Gianluca Gaidano*
18. Mieloma multiplo » 162
Michele Cavo, Giulia Perrone, Carolina Terragna

19. Eterogeneità genetica dei tumori e terapie personalizzate » 166
Giorgio Stassi

Cellule staminali mesenchimali (CSM): prime applicazioni cliniche

20. MSC and autoimmune diseases » 171
Federica Benvenuto
21. Impiego delle cellule staminali mesenchimali
in cardiologia » 176
*M. Gneccchi, P. Danieli, E. Cervio, F. Pisano,
M.C. Ciuffreda, M. Mura, G. Malpasso*
22. Impiego delle cellule staminali mesenchimali
nelle malattie renali » 189
Marina Morigi
23. Trials clinici con l'uso di CSM » 192
Paolo Bernasconi

Prospettive di immunoterapia cellulare

24. Immunoterapia cellulare adottiva con linfociti T citotossici:
un aggiornamento » 213
*Rita Maccario, Daniela Montagna, Antonia Moretta,
Patrizia Comoli*
25. Possibile impiego terapeutico di cellule NK alloreattive
in pazienti affetti da emopatie maligne o tumori solidi » 221
Daniela Pende
26. Vaccinoterapia antitumorale: a che punto siamo » 228
Antonio Curti

Risposta immune e induzione di tolleranza in trapianti allogenici

27. Cellule staminali del cordone ombelicale e tolleranza
immunologica » 233
Laura Salvaneschi
28. Tolleranza al trapianto: ci siamo negli animali,
a quando nell'uomo? » 242
Giuseppe Remuzzi

Prefazione

L'argomento scelto per il Corso di quest'anno riguarda la ricerca traslazionale. C'è stata qualche perplessità nel decidere di utilizzare il termine "traslazionale", per l'abuso che ultimamente si è fatto di tale aggettivo. Poi però è prevalso il concetto che questo termine indica con chiarezza un settore ben definito della ricerca biomedica: il necessario ponte di passaggio fra la ricerca biologica di base e la ricerca clinica applicata. Tale settore ha indicazioni, obiettivi, modalità operative che sono peculiari e che verranno precisate nello svolgimento del Corso. Quindi, l'importante è utilizzare il termine in modo appropriato.

Trattando di ricerca traslazionale in ematologia/oncologia, l'intento è quello di puntualizzarne due aspetti importanti: la ricerca farmacologica alla base di targeted therapies e le premesse per l'applicazione di terapie cellulari nell'uomo. Per quanto riguarda le targeted therapies, l'analisi dei meccanismi d'azione delle principali categorie di farmaci precede l'esposizione dei risultati ottenuti in alcune emopatie maligne e tumori solidi; per le premesse all'esecuzione di terapie cellulari nell'uomo sono state scelte tre applicazioni di grande attualità, come l'utilizzo in clinica delle cellule staminali mesenchimali, alcune prospettive di immunoterapia cellulare e i tentativi di induzione di tolleranza ad un trapianto allogenico.

Agli autorevoli Colleghi che con generosità hanno accettato l'invito a svolgere le lezioni sui difficili argomenti trattati, e hanno contribuito alla realizzazione di questo volume, vanno i più sentiti ringraziamenti del Collegio Ghislieri e miei personali.

Carlo Bernasconi

Pavia, 16 maggio 2011

INTRODUZIONE AL CORSO

1

Self-renewal e differenziazione delle cellule staminali: insegnamenti dalla biologia dello sviluppo embrionale

CarloAlberto Redi

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia

La Biologia dello Sviluppo, la disciplina che sino ad un paio di decenni orsono era meglio conosciuta come embriologia molecolare, o tout-court, embriologia, è il campo del sapere che ha al proprio centro la riflessione su come si realizzi il passaggio da una singola cellula (totipotente per capacità proliferativa e differenziativa, lo zigote) al milione di miliardi di cellule che compongono un individuo (un uomo, ad esempio, con un passaggio da 1 a 10^{15} cellule ! ! !). Si capirà subito dunque che questa disciplina ha al proprio centro di indagine attuale, ed anche ha avuto sotto un profilo storico, la capacità di rinnovarsi e di differenziarsi delle cellule nel corso dello sviluppo ontogenetico. E dunque, per chiarezza espositiva sarà ben seguire un profilo storico per meglio capire dove siamo giunti con l'avanzamento delle conoscenze, dove ci troviamo con le possibilità tecniche oggi-giorno, quali scenari applicativi si sono aperti in tanti campi, dalla farmacologia alla medicina rigenerativa, e quali gli spazi aperti oggi per la ricerca biomedica in questo settore; certamente senza tralasciare gli aspetti teorici legati allo sviluppo di paradigmi concettuali del tutto propri della Biologia dello Sviluppo e della Biologia delle Cellule staminali. Paradigmi che è bene derivare dalla prospettiva storica e calare nel disegno di futuri esperimenti capaci di vanificare precedenti "verità" per fornire nuovi dati utili ad una visione più avanzata di quegli stessi fenomeni che indagati in precedenti anni avevano dato una indicazione utile allo sviluppo degli "arnesi" concettuali visti con gli occhi del dopo.

Profilo storico

La piena comprensione dei meccanismi che regolano l'ordinata espressione (repressione) del genoma nello spazio e nel tempo dello sviluppo embrionale è ancora lontana; va però precisato che in questi ultimi anni le nostre conoscenze al riguardo sono progredite di molto ed oggi, dopo aver abbandonato la idea naif che potessimo trovare i pochi geni della staminalità (attivi e/o repressi) conosciamo le logiche che regolano le complesse circuiterie che su quei meccanismi si basano. Sono circuiterie la cui logica potrà essere impiegata nel-

l'ambito della Biologia Sintetica e dello sviluppo di strategie utili a controllare la crescita neoplastica, tutti aspetti strettamente legati ai concetti di rinnovo e differenziazione cellulare così paradigmaticamente messi in campo dalla Biologia delle cellule Staminali.

Ne deriva un forte invito alla lettura, non facile, della splendida rassegna Eric H. Davidson della Divisione di Biologia del California Institute of Technology a Pasadena (California, USA) dal titolo "Emerging properties of animal gene regulatory networks" pubblicata su Nature, 2010; 468: 911-922.

Da questo invito discende poi l'impostazione di una visione storica del rapporto tra rinnovo e differenziazione cellulare per la comprensione degli insegnamenti che la embriologia/biologia dello sviluppo ci può fornire. Vi è, in altre parole, la necessità di una riflessione storica su alcune delle grandi domande della Biologia nei secoli scorsi per trovare oggi un aiuto alla comprensione delle complesse (concettualmente e tecnicamente) problematiche e complessi rapporti tra rinnovo e differenziazione cellulare. Da sempre, si può dire, ed a partire dai filosofi greci, si pensi ad Aristotele, per giungere alle grandi figure della embriologia sperimentale (Loeb, Delage, Spemann), da sempre si è tentavano di chiarire questo rapporto. Per non iniziare proprio ab ovo, si può ricordare la grande questione posta dalla teoria del plasma germinale di August Weismann, la trasmissione ed espressione degli *elementi ereditari*. Il tentativo, in altre parole, di capire il ruolo del nucleo e del citoplasma nell'ereditarietà e come si attua la differenziazione cellulare durante lo sviluppo embrionale.

Le grandi acquisizioni concettuali della embriologia sperimentale della fine del secolo XIX e degli inizi del secolo XX derivano da esperimenti effettuati con i pochi strumenti disponibili impiegati per agitare, tagliare, asportare, ablare, legare, incidere, suturare gli stadi iniziali dello sviluppo embrionale di alcuni organismi animali.

Questi organismi modello erano di necessità specie animali nelle quali le uova, gli oociti, possono essere facilmente manipolabili per le grandi dimensioni: ecco la scelta di rane, tritoni, ricci di mare e lumache di vario genere. Così, la grande abilità manuale permette ad eccezionali personalità scientifiche quali Wilhelm Roux, Hans Driesch e Sven Horstadius di compiere esperimenti cruciali per l'avanzamento delle conoscenze scientifiche (sviluppo a mosaico, sviluppo regolativo e gradienti morfogenetici per ricordarne alcuni). In retrospettiva, questi dati risulteranno utili al passaggio del dibattito scientifico sulla differenziazione cellulare dalla *ipotesi provvisoria* di Charles Darwin (la teoria della pangenesi: ogni cellula somatica contiene delle particelle, i pangeni, capaci di migrare a ritroso nelle cellule germinali e così trasmettere le caratteristiche di quella cellula) alla teoria di Weismann *della continuità del plasma germinale* da una generazione all'altra (mentre la linea somatica si diversifica ad ogni generazione) ed alla comprensione dei meccanismi cellulari della differenziazione cellulare. Spicca tra tutti i ricercatori l'allievo di Theodor Boveri e successore alla cattedra occupata da August Weismann, Hans Spemann per la genialità nella formulazione del disegno sperimentale e nella capacità di interpretazione dei risultati. Spemann interviene su morule di salamandra per compiere delle legature, parziali o totali, allo

stadio di 8 o di 16 cellule per seguire il destino differenziativo delle 4/8 cellule di destra e delle 4/8 di sinistra (vedi oltre i risultati di Plachta et al., 2011). Sarà necessario però attendere la possibilità tecnica di ottenere dei micromovimenti (impiegando viti micrometriche per ottenere movimenti lineari discreti di stantuffi di siringhe) di sottili aghi che possono muoversi nelle tre direzioni spaziali (perché la siringa che li porta è articolata a cremagliera su due supporti, destro e sinistro) mentre al loro interno vengono esercitate pressioni idrauliche positive (per iniettare) e negative (per aspirare) per far sì che Robert Briggs e Thomas King studino la potenzialità nucleare nel corso del differenziamento cellulare che accompagna lo sviluppo in *Rana pipiens*.

Di fatto, per svolgere queste ricerche, vengono perfezionate le tecniche necessarie ad enucleare gli oociti ed a preparare nuclei isolati da trasferire negli stessi. Nel 1952, Briggs e King, riescono ad isolare il nucleo di una cellula somatica prelevata da una rana adulta ed a trasferirlo poi in un oocita enucleato. Gli zigoti così ottenuti non riuscirono però a svilupparsi ulteriormente. Un ulteriore perfezionamento strumentale (in particolare delle micropipette) permette a John Gurdon, che impiega rospi sudafricani *Xenopus laevis*, di ottenere lo sviluppo di un embrione sino al completamento dello stadio larvale. In questo modo, Gurdon dimostrò che i nuclei di cellule somatiche differenziate, trasferiti nel citoplasma di una cellula uovo enucleata, sono in grado di modificare il loro programma genetico fino ad assumerne uno nuovo, di tipo embrionale. Alcuni anni dopo riuscì ad ottenere uno sviluppo larvale completo e la nascita di nuovi individui che, dal punto di vista genetico, sono una “copia genomica” del donatore della cellula somatica impiegata per il trasferimento nucleare: sono cloni.

Primo insegnamento

Il primo insegnamento viene dunque dalla descrizione delle proprietà del vivente. E nell’ambito di rinnovamento e differenziazione cellulare Sir John Gurdon ripropone artificialmente ciò che accade in natura (frequente fenomeno) nei vegetali ed in molti gruppi di animali: la clonazione, a dire la produzione di individui geneticamente identici. In molti taxa zoologici, i cloni compaiono in seguito a:

- riproduzione asessuata (vegetativa), in questo caso i cloni sono anche geneticamente identici al genitore;
- poliembrionia, nei Mammiferi, per scissione degli stadi embrionali precoci; il che è occasionale nell’Uomo ed in molti altri Mammiferi ma è la norma nell’armadillo a nove bande (*Dasybus novemcinctus*) ove ogni parto produce quattro cuccioli/cloni (nell’armadillo a dodici bande nascono otto cloni).

Nella poliembrionia i nuovi nati sono geneticamente differenti dal genitore ma cloni tra loro risultando essere geneticamente identici. Nella nostra specie si stima che circa 1 nascita su 400-500 nascite sia di gemelli monozigotici (a dire di gemelli identici, e dunque di cloni) il che significa che nell’uomo, ogni minuto circa, nascono cloni! Diverse sono le modalità attraverso le quali, in natura, si realizza la clonazione. Nei Protozoi (unicellulari), si verifica per scissione, longitudinale o trasversale, della cellula/individuo. Negli animali multicellulari si

attua con meccanismi di scissione o gemmazione o frammentazione e può accadere in diverse fasi dello sviluppo, nell'embrione o nella larva o nell'adulto. Nei Poriferi (spugne) per gemmazione dall'individuo adulto: sul corpo dell'individuo si producono delle piccole gemme, dei gonfiori, che si staccano liberandosi e producendo un nuovo individuo/clone. Negli Cnidari (coralli) il polipo, individuo asessuato (la medusa è l'individuo sessuato), può clonare individui sia per gemmazione, sia per divisione trasversale/longitudinale (ognuna delle due parti rigenera poi quella mancante), sia per frammentazione dell'intero corpo o della sola parte pedale (le comuni attinie degli acquari: il genitore si muove lungo il substrato, gruppi di cellule si staccano dal suo piede dando origine a nuovi individui/cloni). A volte i vari gruppi di cloni formano colonie: un esempio è dato dalle barriere coralline. Nei Platelminti (vermi piatti) gli individui adulti possono andare incontro a scissione mentre gli stadi larvali sono capaci di gemmazione: l'embrione originatosi dalla fecondazione di una cellula uovo con uno spermatozoo (riproduzione sessuata) nel corso dello sviluppo raggiunge lo stadio larvale che inizia a gemmare nuovi individui (cloni tra loro) come nel caso dei Platelminti Digenei.

La clonazione è riproducibile tecnicamente grazie a due metodi: la suddivisione dell'embrione ed il trasferimento di nuclei somatici.

Artificialmente, la prima di queste metodiche simula quanto accade in natura nel caso dei gemelli identici: l'embrione ai primissimi stadi di sviluppo viene suddiviso in due o più subunità, ciascuna delle quali dà origine a un individuo/clone. L'*embryo splitting* è molto usato in veterinaria per aumentare il numero di esemplari di particolare valore economico. La tecnica del trasferimento di nucleo somatico permette di ottenere cloni impiegando cellule, anche somatiche, da qualsivoglia stadio dello sviluppo ed in particolare da individui adulti. La clonazione riproduttiva è oggi impiegata in zootecnia per la riproduzione di animali di particolare interesse economico. È questo il caso di animali transgenici produttori di molecole ad azione farmacologica.

Qui è chiaro il risvolto economico della tecnica del trasferimento nucleare. La produzione di un animale transgenico in grado di produrre (ad esempio nel latte) una grande quantità di una preziosa molecola è assai costosa (anche mezzo milione di euro). È chiaro che è economicamente vantaggioso riprodurre un simile animale per clonazione anziché crearne un altro. Un altro campo di applicazione è quello dell'incremento numerico degli esemplari di animali in via di estinzione, anche se è chiaro che per questa via si perde variabilità genetica in quanto gli animali prodotti sono tutti copie genetiche.

L'insegnamento che deriva dal successo dei trasferimenti nucleari è chiaro: il nucleo di cellule somatiche terminalmente differenziate, trasferito nel citoplasma di una cellula uovo, può perdere il proprio programma genetico ed acquisirne uno nuovo in grado di iniziare e terminare lo sviluppo embrionale sino alla nascita di un clone. La pratica conseguenza e la più promettente applicazione in ambito biomedico della tecnica del trasferimento nucleare è certamente quella della produzione di popolazioni cellulari, o di veri e propri tessuti, da trapianto; cellule differenziate *ad hoc* per la medicina rigenerativa. È chiaro che in questo caso è

necessario disporre di oociti umani per poter produrre staminali embrionali. Fatto questo di rilevanza per la riflessione in Etica. L'impiego della tecnica del trasferimento nucleare è ammessa in alcune legislazioni per la produzione di embrioni da cui derivare linee di staminali embrionali umane nell'ambito di ricerche specificatamente autorizzate. È questo il caso di alcuni paesi quali il Regno Unito (solo tre permessi accordati ad oggi!), la Spagna, Singapore, Corea del Sud. A questo riguardo, il 17 giugno 2009 New York è divenuto il primo e solo stato USA ad adottare una politica di remunerazione per le donne che decidano di donare oociti per le ricerche sulle cellule staminali embrionali. Lo Empire State Stem Cell Board, responsabile per il programma di ricerca, di ben 600 milioni di dollari, sulle cellule staminali embrionali ha infatti deciso dopo attente riflessioni sociali, politiche ed etiche di "pareggiare" lo stato delle donne donatrici a quello degli uomini donatori di sperma (anch'essi, da sempre, retribuiti), scatenando una nutrita serie di dichiarazioni sia a favore sia contrarie ("saranno le diseredate del pianeta a vendere la propria salute").

Per tante e diverse patologie si può prevedere di differenziare *in vitro* i diversi tipi cellulari necessari per la terapia cellulare di sostituzione delle cellule danneggiate o perse. Questa applicazione è però ostacolata da considerazioni di tipo etico che trovano accoglienza nella legislazione di tanti paesi. Per completezza di trattazione è bene però ricordare che è improprio chiamare zigote l'oocita ricostituito con il nucleo di una cellula somatica: l'oocita ricostituito non è in grado di dare inizio allo sviluppo embrionale se non dopo opportune stimolazioni artificiali (vedi oltre lo sviluppo di media condizionati) che lo incanalano verso lo sviluppo di una blastocisti e certamente solo pochissime di queste sono in grado di svilupparsi in embrioni e feti dopo trasferimento in una madre surrogata. In alternativa, l'oocita ricostituito può essere indotto a formare sfere embrioidi, capaci di espandersi in coltura e portare alla formazione di cellule staminali. Infatti, gli oociti ricostituiti non sono frutto della unione di uno spermatozoo e di un oocita (lo zigote): l'oocita ricostituito con il nucleo di una cellula somatica del paziente costituisce una potenziale forma di espansione cellulare (per via asessuata) del paziente stesso. Con opportuni stimoli artificiali si può indurre l'oocita ricostituito a incanalarsi verso una moltiplicazione mitotica che porta alla formazione delle sfere embrioidi (non di blastocisti) e indirizzare la differenziazione di queste (dopo espansione in coltura) verso particolari tipi cellulari.

Riprogrammazione genetica di cellule somatiche

Da questo primo insegnamento ne deriva che uno dei più promettenti campi di ricerca è quello rivolto a identificare le molecole che nel citoplasma dell'oocita assicurano la riprogrammazione genetica dei nuclei terminalmente differenziati: in altre parole un promettente campo di ricerca è la dissezione molecolare del citoplasto animale. I risultati di queste ricerche saranno capaci di avanzare le nostre conoscenze sulle primissime fasi di sviluppo embrionale (transizione materno - zigote e zigote - morula) e di assicurare tecniche per la produzione di cellule staminali embrionali senza incorrere nelle problematiche di tipo etico -

normativo - proibitive. Questa anticipazione deriva da alcuni lavori usciti negli ultimissimi anni e da altri pubblicati nei mesi di gennaio e febbraio 2011.

E dunque è ancora una volta necessario procedere lungo l'asse temporale e riprendere la riflessione dalla produzione di cellule staminali paziente-specifiche grazie alla tecnica della clonazione terapeutica: esattamente la stessa tecnica della clonazione riproduttiva con la sola differenza che lo sviluppo dell'embrione ricostituito viene terminato nelle fasi preimpianto per poter derivare cellule staminali paziente-specifiche. Questa proposizione teorica è oggi vicina al raggiungimento del traguardo paradossalmente proprio quando è ragionevole ritenere che sarà ben presto superata. L'ottenere staminali paziente-specifiche pare infatti ben più agevole, e privo di implicazioni etiche, seguendo due linee di ricerca che portano al medesimo risultato.

L'una si declina nel tentativo di trovare citoplasti naturali di specie ad alta produzione di oociti (coniglio, mucca, maiale e altri animali da macello) o citoplasti artificiali e sintetizzati a partire dalle conoscenze su quelli naturali, citoplasti basati sull'utilizzo di singole molecole capaci di revertire il programma genetico (ad esempio la reversina!). L'altra linea si identifica con la possibilità di trasferire cellule somatiche con quei pochissimi fattori che sappiamo sostenere la pluripotenza delle staminali.

1) *I citoplasti artificiali*

La concezione classica dello sviluppo embrionale viene rappresentata come una progressiva restrizione del destino differenziativo della cellula, da una condizione di totipotenza qual'è quella dello zigote ad una situazione altamente specializzata e differenziata dei tessuti dell'organismo adulto. Le cellule staminali delle prime fasi dello sviluppo sono considerate pluripotenti, in grado cioè di dare origine ai tre foglietti embrionali, mentre le cellule staminali di tessuti specifici delle fasi terminali dello sviluppo o dell'individuo adulto (staminali unipotenti) sono considerate ristrette nelle loro potenzialità differenziative in dipendenza del tessuto da cui sono state isolate. Questo paradigma è stato recentemente messo in discussione da almeno tre linee di evidenze:

- la scoperta che alcune cellule staminali adulte possono differenziarsi in altri tipi cellulari, se esposte alle condizioni ambientali appropriate (Jopling et al., 2011; si legga in particolare questo lavoro per il chiaro inquadramento concettuale dei concetti di de-differenziazione, transdifferenziazione e riprogrammazione genetica);
- esperimenti di trasferimento nucleare hanno dimostrato che il genoma di nuclei di cellule somatiche terminalmente differenziate può essere geneticamente riprogrammato quando trasferito all'interno di cellule uovo enucleate (Wilmut et al., 1997; Wakayama et al., 1998). Il processo di riprogrammazione genetica è tale per cui all'interno dell'ooplasmia il genoma riacquista la totipotenzialità dello zigote;
- eleganti esperimenti hanno dimostrato la capacità di ibridi cellulari (Tada et al., 2001) e di estratti cellulari isolati da cellule somatiche di diversa natura (Hakelien e Collas, 2002) di riprogrammare l'espressione genica di altri tipi di

cellule somatiche o dei loro nuclei isolati. Quando linfociti di timo sono stati fusi con cellule EG o con cellule ES, i nuclei di questi hanno acquisito proprietà di tipo pluripotente staminale, con la riattivazione di un transgene represso (il transgene Oct4 specifico delle cellule ES) (Tada et al., 2001). In altri esperimenti sono state esposte in coltura cellule somatiche (o i loro nuclei isolati) all'azione di estratti cellulari di altre cellule somatiche con il risultato che all'interno delle cellule trattate è stato messo in evidenza l'assorbimento di fattori di trascrizione, un successivo aumento dell'attività trascrizionale e l'espressione di geni specifici delle cellule da cui sono stati preparati gli estratti cellulari. Il livello di espressione dei geni regolatori è risultato inalterato, ad indicare che i cambiamenti dello stato trascrizionale sono dipesi dal processo di riprogrammazione (Hakelien e Collas, 2002). Ad oggi sono ancora sconosciuti i meccanismi e le molecole coinvolte nei processi di riprogrammazione nucleare e cellulare. Un aiuto alla loro comprensione potrebbe venire dal confronto tra l'attività di riprogrammazione di estratti cellulari ottenuti da oociti competenti o non competenti allo sviluppo embrionale. Studi recenti hanno evidenziato la presenza nel compartimento antrale dell'ovario di topo di due tipi di oociti riconoscibili per una diversa organizzazione della cromatina. Un oocita che presenta un anello di cromatina positiva al fluorocromo Hoechst 33342 attorno al nucleolo (denominato Surrounded Nucleolus - oocita SN) ed una cromatina filiforme e fortemente compatta; ed un altro tipo di oocita con cromatina finemente dispersa e senza un anello attorno al nucleolo (NSN, Not Surrounded oocita) (Mattson e Albertini, 1990; Zuccotti et al., 2002). La differenza morfologica di questi due oociti ha un significato biologico in quanto solo l'oocita SN è in grado di sviluppo embrionale *in vitro* fino allo stadio di blastocisti, mentre l'oocita NSN si ferma allo stadio di 2 cellule (Zuccotti et al., 2002). Lo studio degli eventi citologici e molecolari che, ci si attende, possano avvenire in cellule somatiche coltivate in presenza di estratti cellulari isolati da oociti SN o NSN permetterebbe la messa a punto di un sistema *in vitro* in grado, attraverso la comparazione, di identificare i tempi, le modalità ed i meccanismi coinvolti nel processo di riprogrammazione cellulare. Per poter attuare con successo una simile analisi comparativa è necessario studiare in dettaglio i meccanismi molecolari ad oggi conosciuti in grado di regolare l'espressione del genoma di Mammifero.

2) *L'induzione di pluripotenza, le cellule simil-embryonali iPS*

Un'altra strategia che può essere impiegata per ottenere cellule staminali simil-embryonali segue una via "diretta" per giungere alla espressione di alcuni dei geni responsabili della staminalità. È questo un modo di attivare dei "fattori intrinseci" al genoma con l'inserimento, grazie a tecniche di ingegneria genetica, di geni della staminalità direttamente nelle cellule somatiche. Di fatto è oggi possibile riprogrammare geneticamente le cellule somatiche (ad esempio i fibroblasti della pelle) e ottenere cellule staminali simili a quelle embrionali (con ciò risolvendo anche il problema etico) impiegando vettori virali per inserire nelle cellule somatiche alcuni geni responsabili dello stato di staminalità (ad esempio Oct4, Nanog,

Sox2, ecc.). Queste opportunità tecniche aprono un promettente campo di ricerca sulla riprogrammazione della capacità di sviluppo (pluripotenza) dei nuclei somatici e sul prelievo delle cellule staminali dai distretti tissutali differenziati in cui si trovano. Nel brevissimo volgere di un paio di anni siamo già giunti alla possibilità di riprogrammare cellule somatiche senza impiegare i vettori virali (eludendo con ciò tutti i problemi che l'impiego di virus può creare), impiegando proteine; con ciò realizzando quanto scritto nel 2001 nel rapporto Dulbecco là dove si suggeriva di impiegare "citoplasti" al fine di riprogrammare geneticamente le cellule terminalmente differenziate!

Queste ricerche già lasciano intravedere una moltitudine di applicazioni terapeutiche a partire dallo sviluppo di protocolli basati sull'impiego di cellule staminali e di nuclei riprogrammati per la produzione dei necessari reagenti biologici (cellule e tessuti ricavati dalla espansione in coltura). È così che il gruppo di Yamanaka (Kyoto University) e quello di Thomson (Wisconsin University) sono riusciti nella operazione di inserire, per trasfezione, quattro geni della staminalità (Oct4, Sox2, c-myc e Klf4) impiegando dei retrovirus come veicoli ottenendo la induzione di pluripotenza (induced pluripotent stem cells, iPS) in cellule terminalmente differenziate come i fibroblasti. L'efficienza e la resa di "staminalità" sono ancora molto basse, meno dello 0,1%, ma la via è aperta. Risultati incoraggianti sono stati poi ottenuti nel 2008 e negli ultimi mesi del 2009 con la possibilità di ottenere la riprogrammazione genetica a iPS con l'impiego di un solo gene della staminalità, Oct4 (Kim 2009), ed anche con il solo impiego delle proteine codificate da pochi geni della staminalità (Belmonte, 2009). Per un profilo riassuntivo e storico sulla induzione di pluripotenza si veda Stadtfeld e Hochedlinger K (2010).

In definitiva si è giunti, concettualmente, ad una unificazione delle due strategie (citoplasti e retrotrasfezione di geni della staminalità) poichè è ragionevole ritenere che le proteine dei geni della staminalità impiegate negli ultimi esperimenti siano i fattori "attivi" presenti nei citoplasti sino ad oggi provati.

Medicina rigenerativa

La possibilità di rintracciare in situ le cellule staminali e di indurne la differenziazione cellulare a fini riparativi resta un obiettivo principe per la medicina rigenerativa, si veda il chiaro lavoro di Hugo J. Snippet e Hans Clevers "Tracking adult stem cells" (2011). Sino a quel momento sarà però la produzione di tipi cellulari specifici quella che potrebbe permettere di trattare molte malattie: diversi tipi di neuroni per il Parkinson e l'Alzheimer, cellule muscolari cardiache per le vittime di infarto, cellule pancreatiche secernenti insulina per alcuni tipi di diabete sino alla generazione di papille dermali o cellule staminali del follicolo pilifero per alcuni tipi di calvizie.

Per capire la dimensione delle possibilità di intervento terapeutico, basti pensare che solo negli USA circa 60 milioni di persone presentano patologie del sistema cardiovascolare, più di 15 sono affette da diabete, 10 dalla osteoporosi, più di 4 dall'Alzheimer e più di 2 dal Parkinson. Una Europa sempre più longeva e con

un tasso demografico inferiore a quello di sostituzione è una Europa destinata ad essere costituita in grande maggioranza da senescenti bisognosi delle terapie basate sull'impiego delle cellule staminali. L'ottenere un organo è un obiettivo da considerarsi ancora lontano: le cellule in differenziamento giungono a formare un organo anche grazie a messaggi di tipo *posizionale*, moltiplicandosi e crescendo su *supporti* specifici, supporti che oggi non riusciamo a riprodurre *in vitro* nonostante i progressi della bioingegneria dei materiali biologici. Già diverse imprese mercantili sono attive a questo riguardo. È chiaro l'intento di giungere alla produzione di significative quantità di reagente biologico sfruttando in particolare la possibilità di transdifferenziare (grazie all'impiego di particolari miscele di sostanze quali l'acido retinoico, l'insulina, triiodotironina, eritropoietina ed altre; è questo un campo di attivissima ricerca) le cellule staminali comunque ottenute: la transdifferenziazione ampia di diversi ordini di grandezza la potenzialità produttiva dei diversi tipi istologici.

Ciascuna di queste imprese è chiaramente indirizzata allo sfruttamento commerciale delle capacità proliferative e differenziative delle cellule staminali, con specifiche strategie sia di produzione (staminali da embrione, da feto, da adulto o da riprogrammazione genetica) sia di settore applicativo (identificabile in prima istanza con l'origine delle staminali: cellule del sistema nervoso, del mesenchima, del sangue). Il settore più "tradizionale" è quello delle staminali ematopoietiche, ma con il progredire delle tecniche di prelievo, transdifferenziazione ed espansione in coltura, i settori verranno sempre più ad identificarsi. Così, la *Osiris Therapeutics*, occupandosi di staminali del mesenchima, mira alla produzione di diversi tipi cellulari - osteoblasti, condrociti, mioblasti, preadipociti ed altri ancora - che si differenziano dal mesenchima. Le potenziali applicazioni cliniche sono quelle legate alla terapia cellulare per la rigenerazione ed il recupero funzionale dell'osso, della cartilagine e del muscolo. È chiaro che patologie (ereditarie o traumatiche) quali la osteoporosi, la osteoartrite, l'infarto, l'obesità, traumi di ossa e tendini trovano un ulteriore scenario di trattamento. Attività principale della *Neurotech* è la identificazione ed il prelievo di staminali neuronali dal cervello di adulti umani per la loro espansione in coltura (ottenibile con l'aggiunta di Epidermal Growth Factor, basic Fibroblast Growth Factor e Leukaemia Inhibitory Factor al terreno di coltura) e trapianto allo stadio di neurosfere in ospiti murini per saggiarne la funzionalità prima dell'impiego su pazienti. Emerge chiaro da questi due esempi l'apporto delle imprese BioTec alla ricerca di base. Di necessità, per una efficace competizione commerciale con le altre imprese, ciascuna di esse è tesa all'avanzamento delle conoscenze di base sul differenziamento (e, seppure oggi ancora limitatamente, alla creazione di nuovi posti di lavoro) poiché l'identificazione dei fattori che più efficacemente stimolano la riprogrammazione è in grado di determinare il successo commerciale della impresa.

Con l'avvento della presidenza di Barak Obama è caduto il divieto di finanziare le ricerche sulle ES ed ora i National Institutes of Health (NIH) finanziano tali ricerche ed hanno derivato nuove linee di ES che sono a disposizione della comunità scientifica (<http://stemcells.nih.gov/>). La dimostrazione della possibilità di

impiegare la ricombinazione omologa anche su cellule ES umane (Zwaka e Thompson, 2003) ha poi aperto anche alla nostra specie la possibilità di utilizzare quest'ultima tecnica per lo studio delle funzioni di singoli geni e per le possibili applicazioni di terapie cellulari in medicina rigenerativa per patologie, quali il diabete giovanile ed il Parkinson, che coinvolgono un solo specifico tipo cellulare: si è così aperto un nuovo e promettente capitolo, quello del loro impiego per terapie embrionali. Le cellule staminali somatiche (i.e., non embrionali) già assicurano alcune importanti applicazioni per il trattamento di leucemie, dei grandi ustionati e della degenerazione della cornea.

Per la medicina (rigenerativa) del futuro sarà determinante lo sviluppo di strategie tese all'ottenimento di grandi quantità di cellule staminali da impiegarsi nella pratica clinica. Difficoltà di tipo tecnico (per il prelievo e per la espansione in coltura) per le staminali somatiche e di tipo tecnico ed etico per le ES e le EG costituiscono però dei limiti ad un più vasto impiego terapeutico delle cellule staminali. Molte sono le sperimentazioni in corso, da quelle più datate e pluriennali per il trattamento del Parkinson, del diabete, dell'infarto del miocardio con l'impiego di staminali somatiche sino a quella recentissima per lo stroke spinale impiegando oligodendrociti derivati da ES da parte della GERON che nell'aprile 2009 ha ottenuto il permesso per la prima sperimentazione (GRNOPC1) su 11 pazienti affetti da stroke spinali impiegando cellule del sistema nervoso ottenute da staminali embrionali.

Quest'ultima sperimentazione è iniziata nel giugno del 2009 dopo l'approvazione da parte della Food and Drug Administration (FDA statunitense) di un voluminoso dossier; purtroppo è stata interrotta di lì a poco a causa di effetti collaterali insorti in un paziente. È stata comunque ripresa nel maggio del 2010 ed il trapianto di cellule differenziate derivate da ES è così uscito dalla cronaca aneddotica per passare alla pratica clinica che si spera diventi routinaria. Un segnale in tal senso è costituito dal fatto che la FDA ha dato il via libera alla ripresa di un'altra sperimentazione che era stata pure bloccata tempo fa, quella su dodici pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (morbo di Lou Gehrig) condotta dalla Neuralstem di Rockville (Maryland, USA).

Va precisato comunque, per chiarire le attuali applicazioni e non generare facili entusiasmi, che a tutt'oggi la principale applicazione potenziale della tecnologia delle cellule ES umane è rivolta allo studio dello sviluppo embrionale ed a quello della scoperta di nuovi farmaci. In particolare, in farmacologia, la abilità a far crescere popolazioni pure di specifici tipi cellulari offre un ottimo strumento per saggiare l'efficacia di nuove molecole nel trattamento di diverse patologie: si possono infatti provare centinaia e migliaia di nuovi farmaci in un tempo brevissimo e con una spesa minima rispetto ai saggi farmacologici oggi normalmente impiegati.

Ultimo (per ora!) insegnamento

Il recentissimo lavoro di Plachta e collaboratori (Plachta et al., 2011) ci consegna l'ultimo, per ora! insegnamento della biologia dello sviluppo riguardo la stami-

nalità ed i geni (master) che la controllano in una circuiteria quanto mai complessa. Illuminante a questo proposito è il commento al lavoro di Plachta da parte di Magdalena Zernicka-Goetz (2001) ove la visione del biologo dello sviluppo si incardina e diviene quella del biologo delle staminali con un passaggio concettuale chiarissimo tra l'embriologo ed il biologo cellulare/molecolare: il fenomeno in studio, e l'oggetto in studio, è il medesimo, è la domanda che differisce con la risposta che è esattamente la stessa. Come sopra ricordato, i Grandi della embriologia classica prima e sperimentale e molecolare poi si chiedevano quanto precocemente nello sviluppo si potesse mettere in evidenza un qualche tratto funzionale, fisiologico, citogenetico, biochimico, di qualunque natura fosse ma capace di marcare l'ingresso in una via differenziativa distinta tra soma e germe, tra embrione e annessi, tra diverse linee cellulari. E così, in anni ben più recenti, il biologo delle staminali si chiedeva quanto precocemente fosse possibile mettere in evidenza (e quali fossero i geni master capaci di mettere in evidenza) la precoce transizione da totipotenza al restringimento di potenza della pluripotenza. Ora nel lavoro di Plachta e collaboratori e nel chiaro commento di Zernicka-Goetz risulta chiaro come queste due strade concettuali siano la stessa: OCT4 è il marcatore tanto ricercato (per ora il solo trovato!) capace di segnare in modo ineludibile il "destino" dei primissimi blastomeri, nella morula tra 4-8 blastomeri. E qui si saldano i concetti ormai classici di divisione simmetrica e asimmetrica con la sola asimmetrica in grado di mantenere la riserva di staminali (di qualunque grado di potenza). Plachta e collaboratori dimostrano che solo quei blastomeri che mantengono una alta concentrazione nucleare di OCT4 sono in grado di dividersi asimmetricamente e di contribuire allo sviluppo del trofotoderma (in aggiunta ai blastomeri con un basso contenuto di OCT4) ed a quello delle cellule del nodo embrionale (staminali embrionali).

Si consiglia fortemente di leggere questi due lavori, al di là dello specifico contenuto tecnico, e di inquadrali nella riflessione or ora esposta.

Di rilievo sarà per il bravo embriologo, biologo dello sviluppo, il richiamo a quel preformismo molecolare che deriva dalla dissezione del citoplasto oocitario (vedi sopra): già a livello materno, con la produzione di oociti antrali carichi, o di oociti antrali poveri, di OCT4 si realizza quel "destino" differenziativo cellulare che tante domande poneva in un quadro del tutto incomprensibile sulle ragioni di esistenza di due tipi di oociti antrali capaci di essere ovulati, fecondati e però un solo tipo (ricco in OCT4!) capace di sostenere lo sviluppo embrionale, come già messo in evidenza (Zuccotti et al., 2002; Monti e Redi, 2009) e sopra ricordato (citoplasti artificiali).

Coltivare cellule

Un aspetto di grande rilievo nell'ambito della staminalità è ricoperto dalle possibilità di coltivare cellule nel modo desiderato: in altre parole, di coltivare cellule mantendole in un particolare stato differenziativo o indifferenziato o incanalando verso una definita condizione di differenziamento. E certamente i sistemi di coltura condizionata in vitro giocheranno un ruolo cruciale nello sviluppo e nei

tempi di applicazione della derivazione di linee di cellule staminali utili in medicina rigenerativa e non vi è alcun dubbio sulla necessità di arrivare quanto prima a scoprirne ed identificarne il maggior numero possibile (non fosse altro per un sistema dettato dalla impresa mercantile che vede nel brevetto di questi media di coltura una fonte importante di profitto). Infatti, per sfruttare appieno il potenziale delle SC umane per le terapie cellulari in medicina rigenerativa, nella biologia dello sviluppo, nella scoperta e valutazione di nuove molecole ad azione farmacologica, vi è oggi la precisa necessità di sviluppare media a composizione definita, nota, e capaci di condizionare la differenziazione cellulare (o la de-differenziazione, o la transdifferenziazione o la riprogrammazione) in un preciso senso o di mantenere indefinitamente lo stato di pluripotenza delle ES umane. Sviluppo di media di questo tipo si è rivelato sino ad oggi molto ostico e di difficile ottenimento. Solo recentemente si sono avuti alcuni significativi avanzamenti grazie ai lavori di Joseph Klim e collaboratori (Klim et al., 2010) e del gruppo guidato da Hideaki Tsutsui (Tsutsui et al., 2011).

A questo proposito è interessante il commento di Elefanty e Stanley (2010) ove si rende molto chiaro come la principale sfida per la medicina rigenerativa basata sulle terapie cellulari con SC derivate dalle ES umane sia proprio la capacità di sviluppare media di livello qualitativo ottimale (clinical-grade) e non soggetti alle attualità variazioni di resa per cui da un blocco di prosuzione all'altro variano le possibilità del ricercatore e del clinico di ottenere o mantenere desiderate qualità cellulari dalle linee che si stanno maneggiando. Hideaki Tsutsui e collaboratori sono stati capaci di identificare un piccolo insieme di tre molecole che fungono da inibitori della differenziazione cellulare e che possono essere ben adsorbiti su una superficie di fibronectina che funge da supporto fisico per le cellule in coltura. Ancora dopo 20 passaggi le ES umane così coltivate si rivelano pluripotenti sia in una serie di saggi citogenetici e citochimici che evidenziano la normalità del cariotipo e la produzione di OCT4, SSEA4 e NANOG sia al saggio della formazione di teratomi una volta iniettate.

Nell'ambito della sterminata bibliografia si suggerisce di fare riferimento ad alcuni testi, quali il rapporto preparato dall'*Unesco* (McCall Smith e Revel, 2001) e di quello del *National Institute of Health* statunitense (Kirschstein e Skirboll, 2001), documenti entrambi ricchi di dati e riferimenti bibliografici, cartacei ed elettronici, ad oggi del tutto validi. Inoltre, il lettore troverà indicazioni di grande aiuto nello svolgimento del lavoro di laboratorio e di clinica nel rapporto B-153 della BCC (*Business Communications Co*) che ha prodotto *Stem cell and progenitor cell therapy: current uses and future possibilities* (Edwards, 2002); sebbene di costo proibitivo per 187 pagine di libro (4.000 €!) il rapporto è decisamente di grande aiuto sia per coloro che entrano sia per coloro che già sono attivi nel campo delle staminali. Sul tavolo di lavoro non può mancare il manuale di biologia delle cellule staminali del Cold Spring Harbor (Marshak et al., 2001) ed il volume della serie *metodi in biologia molecolare* della Humana press dedicato alle cellule staminali embrionali (Turksen, 2002). Continuamente aggiornato e certamente il più ricco di informazioni e materiale è poi il sito della rivista *Nature* dedicato alle cellule staminali (*Nature reports stem cells*: <http://www.nature.com/>

stemcells/index.html). Si consiglia vivamente di visitare questo sito. Inoltre è di grande ausilio il recente “Stem cells and regenerative medicine: from molecular embryology to tissue engineering” di Krishnarao e Raghu Appasani (Humana press, 2011) con una esauriente prefazione di Sir John Gurdon e ben 32 capitoli che ripercorrono tutte le tappe teoriche e pratiche della staminalità: rinnovo e differenziazione cellulare.

Per le citazioni sopra-riportate vale il suggerimento di consultare anche la bibliografia riportata negli articoli citati: questi sono stati sempre i più recenti, salvo casi di classici, per evitare un lunghissimo elenco.

Bibliografia

1. Appasani K, Appasani R. Stem cells and regenerative medicine: from molecular embryology to tissue engineering. Humana press, Totowa/New Jersey, USA. Edts. 2011.
2. Autori vari. Nature Insights: Stem-cell biology. Nature. 2006; 441 (7097): 1059-1102.
3. Belmonte JCI, Ellis J, Hochedlinger K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells and reprogramming: seeing the science through the hype. Nat Rev Genet. 2009; 10: 878-883.
4. Eric H. Davidson EH. Emerging properties of animal gene regulatory networks. Nature. 2010; 468: 911-922.
5. Edwards S. Stem cell and progenitor cell therapy: current uses and future possibilities. BCC (Business Communications Co); 2002; www.bio.com.
6. Elefanty AG and Stanley EG. Defined substrates for pluripotent stem cells: are we there yet? Nat Methods. 2010; 7: 967-968.
7. Hakelien AM, Collas P. Novel approaches to transdifferentiation. Cloning Stem Cells 2002; 4: 379-387.
8. Kim JB, Greber B, Arauzo-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H, Scholer HR. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. Nature. 2009; 461: 649-654.
9. Kirschstein R, Skirboll LR. Stem cells: scientific progress and future research directions. National Institutes of Health. 2002; <http://www.nih.gov/news/stem-cell/scireport.htm>.
10. Klim JR, Li L, Wrighton PJ, Piekarczyk MS, Kiessling LL. A defined glycosaminoglycan-binding substratum for human pluripotent stem cells. Nat Methods. 2010; 7: 989-994.
11. Jopling C, Boue S, Belmonte JCI. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011; 12: 79-89.
12. Marshak DR, Gardner RL, Gottlieb D. Stem cell Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Eds. 2001.
13. Mattson BA, Albertini DF. Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. Mol Reprod Dev. 1990; 25: 374-383.

14. McCall Smith A, Revel M. The use of embryonic stem cells in therapeutic research. UNESCO headquarters, February 2001.
15. Monti M, Redi CA Oogenesis specific genes (Nobox, Oct4, Bmp15, Gdf9, Oogenesin1 and Oogenesin2) are differentially expressed during natural and gonadotropin-induced mouse follicular development. *Mol Reprod Dev.* 2009; 76: 994-1003.
16. Plachta N, Bollenbach T, Pease S, Fraser SE, Pantazis P. Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo. *Nat Cell Biol.* 2011; 13:117-123.
17. Snippet HJ, Clevers H Tracking adult stem cells. *EMBO reports* 12:113-122.
18. Stadtfeld M, Hochedlinger K (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 2011; 24: 2239-2263.
19. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol.* 2001; 11: 1553-1558.
20. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126: 663-676.
21. Tsutsui H, Valamehr B, Hindoyan A, Qiao R, Ding X, Guo S, Witte ON, Liu X, Ho CM, Wu H. An optimized small molecule inhibitor cocktail supports long-term maintenance of human embryonic stem cells. *Nat Comm.* 2011; 2: 167-175.
22. Turksen K. Embryonic stem cells: methods and protocols. Humana Press, Totowa/New Jersey, USA. Edt. 2002.
23. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumuluscell nuclei. *Nature.* 1998; 394: 369-374.
24. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 1997; 385: 810-813.
25. Zernicka-Goetz M. Proclaiming fate in the early mouse embryo. *Nat Cell Biol.* 2011; 13: 112-114.
26. Zuccotti M, Ponce RH, Boiani M, Guizzardi S, Govoni P, Scandroglio R, Garagna S, Redi CA. The analysis of chromatin organisation allows selection of mouse antral oocytes competent for development to blastocyst. *Zygote.* 2002; 10: 73-78.
27. Zwaka TP, Thomson JA. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2003; 21: 319-321.

Ricerca traslazionale e terapie cellulari nell'uomo

Carlo Bernasconi

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia,
Consulente Ematologo presso l'IRCCS Fondazione "Salvatore Maugeri", Pavia

La ricerca biomedica comprende tre settori ben distinti: la ricerca di base, la ricerca traslazionale, la ricerca clinica. Il settore intermedio, quello della ricerca traslazionale, rappresenta il ponte di passaggio fra la ricerca scientifica di base e la sua possibile applicazione clinica. Tale concetto è ben rappresentato dall'espressione inglese "*from bench to the bedside*".

Non si tratta di una semplice suddivisione formale di diversi settori di ricerca, bensì di una precisa esigenza operativa. Infatti, nell'ambito biomedico può essere vantaggioso il rapido trasferimento di una nuova conoscenza biologica di base ad una sua utile applicazione clinica. Tale percorso è però reso difficile dal fatto che in questi due settori la ricerca procede a due diverse velocità; infatti, la ricerca di base ha in genere un ritmo molto rapido e soprattutto di recente produce in veloce successione risultati che meritano di essere sperimentati in clinica per un loro possibile utilizzo pratico; invece, la ricerca clinica è molto lenta e deve necessariamente osservare a salvaguardia dei pazienti precise normative, che possono ritardare anche per parecchio tempo l'applicazione di una nuova procedura di diagnosi o terapia. In questo contesto, la ricerca traslazionale ha la finalità di facilitare e accelerare il miglior utilizzo delle scoperte di base, sempre assicurando la maggior efficacia e sicurezza per il paziente.

A tal fine servono ricercatori particolarmente esperti nel tradurre in pratica le scoperte della scienza di base. Per raggiungere questo obiettivo si utilizzano anche nuovi strumenti e tecnologie innovative. Ad esempio, per integrare dati e conoscenze ottenuti in campioni sempre più numerosi è oggi indispensabile il supporto di uno strumento bioinformatico, mentre indagini di biologia molecolare e di genomica sempre più si avvalgono anche di nanotecnologie. Nei grandi Centri di ricerca si sono così formati gruppi di lavoro particolarmente esperti in ricerche di tipo traslazionale, e le Società scientifiche si sono attrezzate per sostenere tale tipo di ricerche. L'opportunità di questa impostazione generale del lavoro di ricerca si è affermata recentemente in parecchi settori disciplinari; fra questi soprattutto in farmacologia con il preciso obiettivo di impostare efficaci terapie mirate (*targeted therapies*), ed in ematologia/oncologia con lo scopo di favorire, oltre

all'impostazione di farmacoterapie mirate, anche la possibile applicazione nell'uomo di specifiche terapie cellulari.

A quest'ultimo riguardo è opportuna una considerazione. Da quanto sopra riportato risulta evidente che la ricerca traslazionale rappresenta un ponte fra la scienza e la clinica. È un ponte che può essere percorso nei due sensi: non solo dalla scienza alla clinica, ma anche in senso opposto. Infatti, mentre il percorso usuale prevede che scoperte di laboratorio vengano trasferite per un'utile applicazione al letto dell'ammalato, non è infrequente che da informazioni cliniche raccolte con l'attento studio dei pazienti derivino suggerimenti per nuovi esperimenti di laboratorio. "*Science does not stop at the laboratory door*" afferma Donnal Thomas in uno dei primi capitoli del libro "*Bone Marrow Transplantation*" (1994), riferendosi al fatto che le basi scientifiche della biologia del trapianto di midollo osseo sono state poste dalle ricerche pionieristiche condotte nei roditori, si sono sviluppate con gli studi eseguiti nei cani, ma si sono enormemente espanse con l'esperienza raccolta con l'applicazione terapeutica nell'uomo. L'intervento di fattori specie-specifici è evidente soprattutto quando si tratta di terapie cellulari.

Tra le terapie cellulari fatte oggetto di ricerche traslazionali, e alcune già sperimentate nell'uomo, appaiono di particolare interesse le premesse per le prime applicazioni cliniche attuate con l'impiego di cellule staminali mesenchimali, alcune prospettive di immunoterapia cellulare e le possibili modalità di induzione della tolleranza ad un trapianto allogenico. Questi argomenti di ricerca traslazionale, applicata allo studio di terapie cellulari nell'uomo, verranno trattati di tre sessioni del presente corso di formazione avanzata. Di tali sessioni appare opportuna una breve introduzione.

Cellule staminali mesenchimali: premesse per applicazioni cliniche

Friedenstein et al. (1968) per primi riuscirono a identificare in colture di midollo osseo una popolazione di cellule non-ematopoietiche aderenti alla plastica, con caratteristiche simili a quelle dei fibroblasti e dotate di proprietà osteogenetica. Ricerche successive hanno poi dimostrato che queste cellule hanno la capacità di differenziare in particolari condizioni colturali anche lungo altre linee cellulari di derivazione mesodermica, dando origine a condrociti, tenociti, adipociti e mioblasti.

È in base a questa capacità differenziativa multilineare che Caplan (1991) ha proposto di indicare tali cellule con il termine di *mesenchymal stem cells (MSCs)*, anche se molti altri termini sono stati utilizzati per descrivere tale popolazione non-omogenea di cellule multipotenti.

Riguardo alla terminologia è da osservare che permangono ancora alcune perplessità se sia oggi appropriato indicare come "cellula staminale" un elemento che secondo i criteri attualmente condivisi verrebbe invece definita "multipotente". Per tale motivo recentemente la *International Society for Cellular Therapy* ha indicato come più appropriata la dizione di *multipotent mesenchymal stromal cells*, con conservazione dello stesso acronimo *MSCs* (Dominici et al., 2006).

La stessa *International Society for Cellular Therapy* ha anche precisato i criteri minimi per definire le MSCs multipotenti umane:

- 1) adesione alla plastica in condizioni colturali standard;
- 2) espressione positiva per i marcatori di superficie CD105, CD73 e CD90 ed assenza invece di espressione dei marcatori ematopoietici, quali CD34, CD45, CD11a, CD19 e HLA-DR;
- 3) capacità in vitro di differenziare sotto stimoli specifici in condrociti, osteociti, adipociti.

Anche se originariamente le MSCs sono state identificate nel midollo osseo, popolazioni cellulari molto simili sono state in seguito isolate anche in altri tessuti, comprendenti il tessuto adiposo, la placenta, il liquido amniotico, alcuni tessuti fetali (come il polmone e il sangue fetale). Anche il sangue di cordone ombelicale è stato identificato come una possibile sorgente di MSCs; in un primo tempo tale osservazione non era stata da tutti condivisa, probabilmente per il basso contenuto in MSCs e per le diverse modalità di raccolta e conservazione del sangue cordonale; in seguito però tale derivazione è stata sicuramente accertata (Bieback et al., 2004). Considerando la possibilità della diversa sorgente delle MSCs, un'opportuna raccomandazione è quella di precisare sempre nella descrizione delle ricerche condotte con tali cellule il loro tessuto di origine.

Uno dei criteri funzionali utilizzato per definire le MSCs è la loro capacità già ricordata di differenziare lungo molteplici linee mesodermiche (Prockop, 1997). Studi più recenti hanno poi portato all'identificazione di cellule pluripotenti che non solo sono capaci di differenziare in cellule della linea mesodermica, ma anche delle linee ectodermica ed endodermica, come neuroni, endoteli, epatociti, ecc. Queste cellule sono state ottenute da cellule aderenti di colture di midollo osseo e sono state indicate da Jiang et al. (2002) con il termine di *multipotent adult progenitor cells* (MAPCs); altri Autori hanno utilizzato altri termini per indicare elementi cellulari simili, ottenuti con analoghe procedure; inoltre, popolazioni cellulari con uguali caratteristiche differenziative sono state isolate da tessuto adiposo, da sangue di cordone ombelicale e da liquido amniotico. Tutti questi tipi di cellule primitive richiedono precise condizioni colturali, comprendenti l'impiego di siero fetale specifico per le cellule embrionali e colture protratte a bassa densità cellulare; per contro, non è stato sino ad ora possibile isolare queste cellule direttamente dal midollo osseo o da altri tessuti freschi. In conclusione, non è ancora chiaro se queste cellule primitive svolgano un reale ruolo fisiologico oppure siano solo il risultato di una prolungata espansione in vitro di cellule di tipo mesenchimale.

Accanto a questa ampia plasticità differenziativa prospettata per le MSCs, sono state dettagliatamente studiate in vitro e in vivo alcune loro peculiari proprietà immunosoppressive e immunomodulatorie (Nauta e Fibbe, 2007). Esse infatti inibiscono la proliferazione di linfociti T e la produzione di citochine in risposta ad alloantigeni o a mitogeni non specifici (Rasmusson et al., 2005), un meccanismo mediato da dirette interazioni cellulari ed anche da fattori solubili. Le MSCs inibiscono inoltre la funzione delle cellule detritiche, delle cellule NK e dei linfociti B. Inoltre, le MSCs appaiono essere immunologicamente privilegiate poiché il

loro immunofenotipo, determinato su cellule coltivate, è stato descritto come MHC Classe I+, MHC Classe II-, CD40-, CD80-, CD86- (Tse et al., 2003); tale immunofenotipo è considerato non immunogenetico e suggerirebbe che le MSCs possono essere efficaci nell'indurre una tolleranza immunologica; infatti, l'espressione di antigeni di classe I consentirebbe l'attivazione di linfociti T alloreattivi, ma per l'assenza di molecole costimolatorie non si potrebbe innescare un segnale secondario e si formerebbero linfociti T anergici. Quindi, l'effetto immunosoppressivo esercitato dalle MSCs risulta essere indipendente dallo stato di compatibilità nell'ambito dell'MHC (Le Blac et al., 2003).

Una terza proprietà biologica che caratterizza le MSCs, rendendole particolarmente interessanti per possibili applicazioni cliniche, è la loro intensa attività paracrina, esercitata attraverso la secrezione di numerose molecole bioattive, non solo con capacità immunomodulanti ma anche con attività di fattori di crescita (Bernardo et al., 2009; Caimi et al., 2010).

L'ampia potenzialità differenziativa, la documentata capacità immunomodulante e l'intensa attività paracrina costituiscono la solida base biologica su cui si imposta la valutazione di possibili impieghi terapeutici delle MSCs in medicina rigenerativa e dei trapianti. Tale valutazione appare favorita dal fatto che le MSCs isolate dal midollo osseo o da altri tessuti presentano la capacità di espandersi estesamente in vitro, sino ad ottenere un numero di cellule che consentano la sperimentazione clinica nell'uomo (Barry e Murphy, 2004). Naturalmente qualsiasi applicazione clinica deve essere preceduta da adeguati studi pre-clinici in modelli animali.

Sino ad ora il potenziale terapeutico delle MSCs è stato valutato con alcuni studi clinici di fase I/II e III, la maggior parte ancora in corso o completati solo di recente. Tali studi riguardano soprattutto la terapia e la prevenzione della GvHD, e l'induzione della tolleranza al trapianto allogenico di organi solidi (specie trapianto renale). Inoltre, con intenti riparativi MSCs sono state utilizzate in pazienti con infarto miocardico acuto o insufficienza cardiaca cronica, cirrosi e insufficienza epatica grave, danno renale, malattia di Crohn, diabete mellito di tipo 1, sclerosi multipla, osteogenesi imperfecta.

Alcune prospettive di immunoterapia cellulare

Fra le varie strategie di immunoterapia cellulare, alcune presentano un particolare interesse per le loro emergenti possibilità di applicazione clinica: l'immunoterapia adottiva con linfociti T citotossici, il possibile impiego terapeutico di cellule NK alloreattive, la vaccinoterapia antitumorale.

Una procedura di immunoterapia cellulare adottiva si attua somministrando ad un paziente immunocompromesso cellule immunocompetenti (ad esempio linfociti T specifici per un determinato antigene), capaci di instaurare o ricostituire nell'organismo ricevente meccanismi di immunosorveglianza nei confronti di agenti infettivi patogeni o di cellule tumorali.

Le cellule che vengono utilizzate per strategie di immunoterapia cellulare adottiva possono derivare dallo stesso individuo immunocompromesso previa adegua-

ta manipolazione in vitro per l'acquisizione dello stato di immunocompetenza verso l'antigene desiderato, oppure da un adatto donatore allogenico specificamente immunocompetente.

Il primo tentativo di immunoterapia con linfociti T citotossici è stato eseguito dal gruppo di ricerca di Seattle, allo scopo di prevenire le gravi complicanze post-trapianto di midollo osseo dovute a infezione da CMV (soprattutto la polmonite interstiziale) (Riddel e Greenberg, 1995).

L'efficacia di tale approccio terapeutico è stata poi dimostrata per la prevenzione e il trattamento della malattia linfoproliferativa post-trapianto EBV-correlata (Heslop e Rooney, 1997; Comoli et al., 2002) e per la terapia di altre neoplasie EBV-correlate, come ad esempio il carcinoma-nasofaringeo resistente alle terapie convenzionali (Comoli et al., 2005).

Per quanto riguarda i pazienti affetti da leucemia, è esperienza clinica condivisa che il trapianto di cellule staminali ematopoietiche svolge un'importantissima azione di immunoterapia cellulare adottiva, aumentando l'immunosorveglianza antineoplastica attraverso un processo definito come GvL (*graft versus leukemia*). Tale processo è mediato soprattutto dai linfociti T e NK del donatore, dotati di una specifica alloreattività nei confronti delle cellule leucemiche del ricevente ammalato. L'effetto GvL è strettamente connesso con la reazione trapianto verso ospite, ed i vari tentativi di utilizzare tale forma di terapia cellulare sono stati sino ad ora gravati dal rischio di innescare una incontrollabile GvHD. Idealmente, la possibilità di poter instaurare un'efficace immunoterapia cellulare adottiva anti-leucemica è legata al fatto di poter in futuro isolare ed espandere linfociti T citotossici specificamente diretti verso antigeni presenti sulle cellule leucemiche ed assenti sulle altre cellule.

In questi ultimi anni una serie di studi sono stati poi rivolti alla valutazione di un possibile utilizzo terapeutico di cellule NK alloreattive in pazienti affetti da emopatie maligne o da tumori solidi (Miller et al., 2005; Ljunggren e Malmberg, 2007). È qui opportuno ricordare che le cellule NK sono regolate da una serie di recettori che trasmettono segnali sia di attivazione che di inibizione, con il risultato di una forte capacità di modulare alcune funzioni immunologiche effettrici, e fra queste innanzitutto la citotossicità. Sono state inoltre attuate alcune procedure che consentono la preparazione di cellule NK umane per uso clinico, soprattutto purificandole dai linfociti T per eliminare il rischio di GvHD. Infatti, il razionale su cui si basano i primi tentativi di impiego di cellule NK alloreattive nella terapia antitumorale è quello di eliminare selettivamente le cellule neoplastiche, rispettando le cellule normali.

Su un'analoga impostazione biologica è basata la vaccinoterapia antitumorale. In questo settore di studi le ricerche sono state dirette soprattutto all'identificazione degli antigeni tumore-associati che possano costituire il bersaglio della reazione immunologica, e alla migliore comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari che portano allo sviluppo di una risposta immune. Anche se sino ad ora i risultati ottenuti sono stati sul piano pratico globalmente inferiori alle aspettative, l'impiego di procedure di vaccinoterapia rimane sempre uno degli aspetti più interessanti della lotta antitumorale.

Induzione di immunotolleranza ad un trapianto allogenico

Il termine di immunotolleranza definisce una condizione in cui il sistema immunitario accetta organi o tessuti di un donatore, ma è capace di rispondere normalmente ad altri antigeni estranei. Si tratta quindi di una tolleranza specifica.

Sebbene i recenti progressi nell'impiego dei farmaci immunosoppressivi abbiano consentito di migliorare notevolmente la sopravvivenza a breve termine degli organi trapiantati, questi risultati hanno avuto uno scarso impatto sulla perdita a distanza degli organi stessi, dovuta in gran parte a rigetto cronico. Inoltre, l'elevata incidenza di infezioni opportunistiche e di neoplasie secondarie, aggiunta a tossicità specifiche di ogni singolo farmaco, limitano notevolmente le terapie immunosoppressive a lungo protratte. Quindi, l'induzione di una immunotolleranza donatore-specifica rappresenta l'*holy grail* della trapiantologia, poiché vorrebbe evitare la tossicità di terapie immunosoppressive croniche prevenendo il rigetto acuto e cronico di un trapianto allogenico (Sykes, 2009).

Un numero enorme di ricerche sono state condotte negli ultimi 50 anni per studiare i meccanismi immunologici del rigetto di un trapianto allogenico. Nel trapianto di organi solidi (il più studiato è stato il trapianto di rene) l'allorispota è diretta dal ricevente contro cellule bersaglio del donatore, e vengono coinvolte cellule T e cellule B. In campo sperimentale sono state proposte alcune strategie per prolungare la sopravvivenza degli organi trapiantati. Recentemente, fra tali strategie le più promettenti si sono dimostrate quelle basate sull'espansione e attivazione di cellule T regolatrici (T-reg). Tuttavia, le medesime procedure trasferite in campo umano si sono rivelate inefficaci, probabilmente per una maggiore complessità del sistema immunitario umano e maggiori ostacoli all'induzione della tolleranza (Casiraghi et al., 2010).

Particolarmente complessa è la situazione immunologica nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche, che comporta il trasferimento di cellule immunocompetenti dal donatore al ricevente e l'allorispota può esercitarsi in entrambe le direzioni, sia dall'ospite verso il trapianto (rigetto) che dal trapianto verso l'ospite (GvHD). Si ritiene che queste risposte siano in gran parte mediate dalle cellule T e nel tentativo di ridurle il più possibile si ricerca il maggior grado di MHC-compatibilità fra donatore e ricevente. Tuttavia, la nozione che le cellule NK sono capaci di alloriconoscimento (Colonna et al., 1993), e la dimostrazione data per la prima volta dal gruppo di ricerca dell'Istituto di Ematologia di Perugia in pazienti affetti da leucemia acuta sottoposti a trapianto aploidentico di cellule staminali ematopoietiche che non tutte le allorispote sono nocive (Ruggeri et al., 2002), hanno portato a rivolgere un rinnovato interesse all'allorispota NK utilizzando come uno strumento di immunoterapia.

È soprattutto su queste basi che si appoggiano i progressi nella comprensione e nell'utilizzo della risposta immune nel trapianto di organi solidi e di cellule staminali ematopoietiche (Christiansen e Velardi, 2009). In questo problema, già estremamente complesso, recentemente si è inserita la conoscenza delle proprietà immunomodulatorie esercitate dalle MSCs. Sul piano storico, al riguardo è interessante ricordare l'esperienza pionieristica raccolta dal gruppo di ricerca di

Pittsburg (Starzl et al., 1992; Pham et al., 1995), che ha portato all'acquisizione, oggi da tutti condivisa, che l'infusione di midollo osseo praticata contemporaneamente ad un trapianto di organo solido (rene, fegato, cuore, polmone) ne migliora notevolmente l'accettazione. Il midollo osseo contiene numerose popolazioni cellulari immunocompetenti, e fra queste noi oggi sappiamo che le MSCs svolgono un ruolo peculiare. Recentemente, nel novembre 2008 si è quindi formato un gruppo di studio multicentrico internazionale, con sigla MISOT (*Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation*, www.misot.de), con il preciso scopo di valutare l'applicazione delle MSCs al trapianto di organi solidi, al fine di indurre con questa procedura cellulo-mediata una tolleranza immunologica ed evitare, o almeno ridurre, l'immunosoppressione farmacologica. Nella sua prima riunione il MISOT ha formulato una serie di raccomandazioni, che debbono essere osservate per impostare le ricerche di questa nuova strategia di terapia cellulare (Dahlke et al., 2009).

Bibliografia

1. Barry EP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Bioch Cell Biol.* 2004; 36: 568.
2. Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells. *Ann NY Acad Sc.* 2009; 1176: 101;
3. Bieback K, Kern S, Kluter H, et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2004; 22: 625.
4. Caimi PF, Reese J, Lee Z, Lazarus M. Emerging therapeutic approaches for multipotent mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol.* 2010; 17: 505.
5. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991; 9: 641.
6. Casiraghi F, Aiello S, Remuzzi G. Transplant tolerance: progress and challenges. *J Nephrol* 2010; 23: 263.
7. Christiansen FT, Velardi A. Progress in understanding and exploiting the immune response in solid organ and hemopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21: 522.
8. Colonna M, Brooks EG, Falco M, et al. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science.* 1993; 260: 1121.
9. Comoli P, Labirio M, Basso S, et al. Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood.* 2002; 99: 2592.
10. Comoli P, Pedrazzoli P, Maccario R, et al. Nasopharyngeal carcinoma with autologous Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 8942.
11. Dahlke MH, Hoogduijn M, Eggenhofer E, et al. Toward MSC in solid organ transplantation: 2008 position paper on the MISOT study group. *Transplantation.* 2009; 88: 614.

12. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8: 315.
13. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AL, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursors cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968; 6: 230.
14. Heslop HE, Rooney CM. Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative disease. *Immunol Rev*. 1997; 157: 217.
15. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt L, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418: 41.
16. Le Blac K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*. 2003; 57: 11.
17. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 329.
18. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-Mortari A, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 2005; 105: 3051.
19. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007; 110: 3499.
20. Pham SM, Keenan RJ, Rao AS, et al. Perioperative donor bone marrow infusion augments chimerism in heart and lung transplants recipients. *Ann Thorac Surg*. 1995; 60: 1015.
21. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997; 276: 71.
22. Rasmuson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens. *Exp Cell Res*. 2005; 305: 33.
23. Riddell SR, Greenberg PD. Principles for adoptive T cell therapy of human viral disease. *Ann Rev Immunol*. 1995; 13: 545.
24. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched haemetapoietic transplants. *Science*. 2002; 295: 2097.
25. Starzl TE, Demetris AJ, Murase M, et al. Cell migration, chimerism and graft acceptance. *Lancet*. 1992; 358: 2034.
26. Sykes M. Hematopoietic cell transplantation for tolerance induction: animal models to clinical trials. *Transplantation*. 2009; 87: 309.
27. Thomas D. The evolution of the scientific foundation of bone marrow transplantation based on human studies. In: Bone marrow transplantation. Forman SJ, Blume KG, Thomas D, eds. Blackwell Scientific Publications, Boston. 1994.
28. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic - cell proliferation by human normal stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003; 75: 17S.

Conoscenze attuali sui meccanismi molecolari di controllo dell'emopoiesi

Sergio Ferrari

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli studi di Modena e Reggio Emilia, Modena

Il modello cinetico dell'emopoiesi

Tradizionalmente l'emopoiesi è considerata un modello strettamente gerarchico in quanto da una cellula staminale emopoietica pluripotente si generano, attraverso numerose transizioni differenziative, dapprima precursori mieloidi e linfociti e quindi cellule terminalmente differenziate.

Questo modello ha il vantaggio di proporre una serie di eventi sequenziali chiari ma non spiega completamente la plasticità del processo, e cioè l'adattamento del processo stesso ai diversi stimoli del microambiente midollare e la diversa capacità di attivare moduli funzionali, cioè insiemi di geni, essenziali per diversi processi biologici quali proliferazione, differenziamento, apoptosi o lo stato di quiescenza, che sembra caratterizzare un'alta percentuale di cellule staminali emopoietiche.

Se parliamo di omeostasi fisiologica di microambienti o di tessuti dobbiamo considerare un equilibrio che si realizza attraverso diversi stati funzionali della cellula, come sopra già menzionato, e cioè, in ordine sequenziale, quiescenza, proliferazione, differenziamento e apoptosi.

I tempi di realizzazione di queste fasi dinamiche sono diversi da tessuto a tessuto ed è per questo che si parla di tessuti ad alta capacità rigenerativa, quali in generale gli epitelii pluristatificati, ma anche il tessuto emopoietico.

Altri tessuti hanno un ricambio più lento, ad es. il tessuto nervoso. Le cellule staminali dell'adulto sono alla base di questo equilibrio.

È altrettanto evidente che una qualsiasi alterazione di questo equilibrio omeostatico porta ad una situazione anomala e comunque sempre patologica (ipoplasie, aplasie, iperplasie, e qualora insorgano alterazioni genetiche a displasie, metaplasie e neoplasie).

Alla base del modello cinetico vi è il controllo genetico delle diverse fasi del ciclo cellulare ed in particolare della transizione G₀/G₁, cioè dell'entrata in ciclo di una cellula quiescente, della progressione G₁ e della transizione G₁/S, della fase S, della progressione G₂ e della transizione G₂/M. Se la cellula non supera il primo "check point" di controllo endogeno della transizione G₁/S, detto anche

punto di non ritorno, può comunque attivare diversi programmi genetici quale quello differenziativo, quello pro-apoptotico o compiere una progressione inversa dalla fase G1 alla quiescenza, G0. Se una cellula invece non supera il second check point di controllo del ciclo G2/M attiva di solito un programma pro-apoptotico.

Centinaia di geni sono coinvolti nella regolazione delle diverse transizioni del ciclo cellulare, ma limitandoci semplicemente ad elencare le categorie funzionali dei geni coinvolti, possiamo riassumerle in:

1. fattori di crescita, citochine, ormoni;
2. recettori specifici presenti sulla superficie della cellula o endocellulari
3. come i recettori per la famiglia degli ormoni steroidei;
4. trasduttori del segnale;
5. fattori trascrizionali;
6. geni oncosoppressori.

Anche l'adesione cellula/cellula o cellula/matrice giuoca un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi fisiologica, come dimostrato dalla crescente interesse e importanza funzionale delle nicchie delle cellule staminali. In questa breve trattazione ci limiteremo a prendere in considerazione il modello cinetico di regolazione della mielopoiesi affrontato con un approccio sperimentale di "Systems Biology", cioè analizzando la risposta delle cellule staminali emopoietiche umane a diverse interferenze operate mediante l'utilizzazione di farmaci o mediante esperimenti di trasferimento genico per studi di over-espressione o di silenziamento genico.

L'interferenza viene valutata mediante l'utilizzazione di tecnologie genomiche (mappe trascrizionali, controllo epigenetico ecc) e post-genomiche ed in particolare i profili di espressione genica e altri approcci di genomica funzionale. Più recentemente anche lo studio dei territori cromosomici e l'effetto posizionale dell'espressione genica può essere valutato mediante lo studio di modelli 3D in microscopia confocale.

È indubbio poi che gli ematologi sperimentali hanno il vantaggio di ottenere con relativa facilità popolazioni cellulari omogenee per marcatori di superficie, immunofenotipo, mediante l'utilizzazione di separatori cellulari o più recentemente con l'uso di biglie immunomagnetiche, e di avere messo a punto saggi di differenziamento in vitro o saggi clonogenici in terreni semisolidi. Anche i trapianti di midollo hanno permesso l'acquisizione di un notevole bagaglio di conoscenze sulla regolazione dell'emopoiesi sia nell'uomo ma in particolare nei modelli murini, utilizzati per studi di ripopolamento del midollo dopo irradiazione, trapianti seriali nei topi e valutazione ad es. delle capacità di auto rinnovamento, self-renewal, delle cellule staminali emopoietiche.

Il microambiente midollare e le nicchie della cellula staminale emopoietica

Il tessuto emopoietico è localizzato all'interno delle ossa e quindi in stretto contatto con il tessuto osseo con cui ha rapporti d'interdipendenza.

Nel tessuto emopoietico coesistono diversi tipi di cellule staminali in grado di rin-

novare tutte le componenti cellulari dei due tessuti. La cellula staminale emopoietica, in grado di dare origine a tutte le cellule del sangue, compresi gli osteoclasti di derivazione monocitaria; la cellula staminale mesenchimale, in grado di dare origine alle cellule stromali del midollo, fibroblasti, adipociti, condrociti e osteoblasti, e il precursore emangioblastico in grado di dare origine alle cellule endoteliali midollari.

Le cellule staminali circolano nel tessuto midollare riccamente vascolarizzato e possono o entrare in circolo o prendere rapporti mediante adesione cellulare con i diversi tipi cellulari presenti nel microambiente emopoietico. Si parla quindi di nicchia osteoblastica, adesione con gli osteoblasti, nicchia vascolare, adesione con le cellule endoteliali, e di diverse nicchie stromali, adesione con adipociti, fibroblasti e cellule staminali mesenchimali.

Inoltre gli isolotti eritropoietici sono caratterizzati dall'adesione degli eritroblasti ai macrofagi del tessuto midollare, ed è in questa sede che vengono regolate le fasi del differenziamento eritrocitario.

Nelle diverse nicchie la cellula staminale emopoietica prende contatti mediante adesione cellula/cellula con i diversi tipi cellulari, attiva i meccanismi di adesione cellula/matrice e risponde agli stimoli micro ambientali. Inoltre l'adesione favorisce l'attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale che portano a proliferazione cellulare quali Wnt, Notch, Sonic Hedgehog, BMP, MAP chinasi, JAK/STAT o vie che inibiscono la proliferazione quali TGF- β , Angiopietina, TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-17 e che probabilmente sono responsabili dello stato di quiescenza. Il condizionamento conseguente l'adesione cellulare e gli stimoli micro ambientali avviene sia a carico della cellula staminale emopoietica come pure delle componenti cellulari della nicchia. La divisione della cellula staminale emopoietica può essere simmetrica o asimmetrica, con diversi destini delle cellule figlie. Modelli sperimentali murini, topi transgenici, knockout o trattamenti farmacologici, hanno dimostrato che è possibile interferire sia con l'osteogenesi sia con l'emopoiesi. In generale un aumento degli osteoblasti determina una maggiore efficienza dell'emopoiesi, una diminuzione riduce l'efficacia dell'emopoiesi. Questo serie di esperimenti ha portato alla definizione di "terapia della nicchia staminale emopoietica".

L'auto-rinnovamento delle cellule staminali emopoietiche, self-renewal

Circa il 75% delle cellule staminali emopoietiche umane si trova fuori ciclo, cioè in uno stato di quiescenza. Tali cellule devono essere reclutate in ciclo, transizione G0/G1, e quindi diventare ciclanti.

Alla base di questa espansione proliferativa si ipotizza un meccanismo di divisione simmetrica.

Le vie mitogeniche di auto-rinnovamento che si possono attivare sono quelle già elencate precedentemente, e coinvolgono centinaia di geni. Studi condotti nel nostro laboratorio suggeriscono che le cellule staminali emopoietiche quiescenti sono prive di marcatori di superficie, CD34-/Lin-. Tali cellule sono sicuramente staminali in quanto in grado di ripopolare un midollo murino irradiato con una

efficienza però di circa 100 volte inferiore alle cellule staminali emopoietiche CD34+. L'acquisizione del marcatore CD34 caratterizza cellule in ciclo o proliferanti. La fase G1 del ciclo cellulare è sicuramente la più permissiva alla trascrizione genica e alla sintesi proteica ed è da considerarsi una fase di adattamento trascrizionale agli stimoli che la cellula staminale emopoietica riceve nelle diverse nicchie e più in generale dal microambiente emopoietico.

Quando la cellula entra in ciclo, transizione G0/G1, la fase G1 è lunga e complessa; quando la cellula è altamente proliferante accorcia drasticamente la lunghezza del G1; quando la cellula differenzia allunga progressivamente la fase G1 e non riesce più a superare il check point di controllo della transizione G1/S. È quindi in G1 che si determina il destino della cellula staminale emopoietica, autorinnovamento o differenziamento. Sperimentalmente questi aspetti sono stati studiati nelle cellule staminali embrionali di topo che proliferano rapidissimamente in presenza di LIF.

L'assenza di questo fattore permette il loro differenziamento. Si ha un G1 molto breve nelle staminali embrionali altamente proliferanti, una espressione costitutiva del complesso Ciclina E/CDK1 e una fosforilazione pure costitutiva di RB. Questi dati suggeriscono che l'elevata capacità proliferativa dipende dal rapido superamento del check point di controllo G1/S. L'allungamento della fase G1, in assenza di LIF, e il conseguente ripristino della fase G1 precoce e media porta al differenziamento.

Tali dati indicano inoltre che le finestre differenziative sono nella fase G1 del ciclo cellulare. Nelle cellule staminali emopoietiche dell'adulto non vi sono dati sperimentali così chiari e la capacità di self-renewal viene valutata mediante trapianti seriali in modelli murini. Lo studio dei numerosi geni coinvolti nell'auto-rinnovamento delle staminali adulte è sperimentalmente affrontato mediante modelli di topi knock-out e transgenici.

La fase di commitment della cellula staminale emopoietica

Questa fase si caratterizza per i diversi programmi genetici che la cellula staminale emopoietica attiva per indirizzarsi verso le diverse linee differenziative mieloidi e linfoidi.

In particolare la fase di scelta di linea mieloide contempla il passaggio da cellula staminale emopoietica pluripotente a diversi progenitori e precursori quali mieloblasti, monoblasti, eritroblasti e megacarioblasti.

Numerosi sono gli approcci sperimentali che sono stati utilizzati per chiarire il controllo genetico di questa fase ed in particolare modelli di topi transgenici e knockout dove i geni studiati funzionalmente appartengono alla famiglia dei fattori trascrizionali.

L'approccio sperimentale in vitro più usato per valutare il ruolo funzionale dei diversi fattori di trascrizione è invece relativo a esperimenti di "systems Biology". Infatti, mediante tecniche di trasferimento genico per studi di overespressione o silenziamento genico in cellule staminali emopoietiche purificate, si è potuto valutare l'interferenza funzionale di numerosi fattori di trascrizione mediante:

- 1) lo studio dei profili di espressione genica;
- 2) la capacità di formare colonie mediante il saggio clonogenico;
- 3) l'espressione di marcatori del differenziamento mediante citometria.

I risultati ottenuti sono chiari e indicano che la scelta di linea differenziativa da parte della cellula staminale emopoietica dipende da quali e quanti fattori di trascrizione sono espressi nella cellula e dalla possibilità che, mediante la formazione di omodimeri o eterodimeri si realizzi un effetto sinergico o antagonista. Il meccanismo con cui i fattori di trascrizione determinano la scelta di linea differenziativa è probabilistico.

Ad esempio, l'eterodimero GATA1/FOG attiva nella cellula staminale emopoietica un programma genetico differenziativo che porta a eritroblasti e megacarioblasti. Se però FOG forma eterodimeri con altri fattori di trascrizione viene esclusa la possibilità di attivare la eritro-megacariocitopoiesi. Inoltre questi esperimenti hanno portato alla definizione funzionale di "master regulators" del differenziamento, cioè di fattori di trascrizione in grado di attivare programmi genetici differenziativi specifici. È evidente che questi eventi sono qualitativi, riguardano cioè singole cellule, ad es. una cellula staminale emopoietica che diventa precursore.

L'aspetto quantitativo di espansione dei precursori mieloidi si realizza mediante l'espressione differenziale dei recettori per fattori di crescita emopoietici nei diversi contesti mieloidi: EPOR negli eritroblasti, M-CSFR nei monoblasti, MPL nei megarioblasti e G-CSFR nei mieloblasti.

L'interazione specifica di questi recettori con i corrispondenti fattori di crescita presenti nel microambiente emopoietico determina l'attivazione di vie di trasduzione del segnale quali JAK/STAT o la via mitogenica classica delle MAP chinasi e quindi l'intensa proliferazione cellulare dei precursori.

A questa fase proliferativa segue la fase differenziativa che si caratterizza per un allungamento della fase G1 del ciclo cellulare e attivazione di un programma genetico di specializzazione funzionale delle cellule che entrano in una fase post mitotica.

Nel microambiente midollare, nel sangue periferico possiamo morfologicamente distinguere così granulociti neutrofili, eosinofili e basofili, monociti, globuli rossi, piastrine. Tali cellule o frammenti cellulari, piastrine, sopravvivono per tempi diversi più o meno lunghi e poi si attiva inevitabilmente il programma di morte cellulare.

Il midollo osseo può considerarsi un tessuto ad elevata capacità rigenerativa che deve essere continuamente rinnovato e questo grazie proprio all'insieme delle cellule staminali emopoietiche.

Si realizza così come in tutti i tessuti quell'equilibrio omeostatico fra quiescenza, proliferazione, differenziamento e apoptosi.

Numerosi dati sperimentali ottenuti nel nostro e in altri laboratori, usando diversi tipi d'interferenza sia farmacologica che di inattivazione di funzioni geniche, hanno messo in evidenza che il blocco in G1 delle cellule staminali emopoietiche proliferanti porta ad una efficiente attivazione del solo programma differenziativo mono-macrofagico.

Da segnalare che numerosi micro RNA, svolgendo un ruolo importante nella modulazione dell'abbondanza degli RNA messenger, interferiscono anche con il differenziamento delle cellule mieloidi.

Lo sviluppo di mappe trascrizionali

Il completamento del progetto genoma, la sempre più accurata annotazione dei geni, lo sviluppo di strumenti informatici adeguati associati allo studio dei profili di espressione genica mediante DNA microarrays, hanno permesso di mappare i geni trascritti in uno specifico contesto cellulare in modo accurato sul genoma. Si sono prodotte quindi delle mappe del trascrittoma. In particolare, studi di espressione genica condotti nel nostro laboratorio sulle cellule staminali emopoietiche, precursori mieloidi e cellule mieloidi terminalmente differenziate hanno permesso di identificare e mappare sul genoma cluster di geni costitutivamente espressi in tutti i contesti studiati, housekeeping, geni differenzialmente espressi nelle diverse transizioni differenziative, geni indotti o down regolati. Non tutti i 25.000 geni identificati nel genoma umano sono espressi, nelle cellule mieloidi umane. Infatti a seconda dei contesti studiati, sono espressi dai 12 ai 15.000 geni. È possibile mappare sul genoma anche i geni silenti in corso di mielopoiesi. Utilizzando adeguati programmi di analisi dei dati di espressione genica abbiamo identificato in corso di mielopoiesi regioni genomiche sempre silenti, non espresse, e regioni differenzialmente espresse nei diversi contesti cellulari mieloidi. Numerose regioni del genoma, domini cromatinici, sono permanentemente escluse dalla trascrizione nel differenziamento mieloido. Tali regioni contengono geni non emopoietici e quindi associati ad altri tipi di differenziamento o funzioni. La possibile ipotesi interpretativa è che in corso di mielopoiesi molti domini cromatinici sono silenti perché posizionati in regioni etero-cromatiche e quindi non accessibili ai fattori trascrizionali. È possibile che questo imprinting epigenetico favorisca la plasticità differenziativa delle cellule staminali emopoietiche dell'adulto. Anche numerosi geni differenzialmente espressi nelle diverse transizioni differenziative mieloidi sono clusterizzati, favorendo quindi l'accensione di insiemi di geni funzionalmente rilevanti per la specificità funzionale delle diverse filiere differenziative. L'anatomia molecolare di questi cluster ha confermato questa ipotesi.

Caratterizzazione dei territori cromosomici nei nuclei interfascici di cellule staminali emopoietiche e precursori mieloidi

Una interessante prospettiva di studio che stiamo affrontando nel nostro laboratorio e quella di caratterizzare, nelle cellule staminali emopoietiche e nei precursori mieloidi monoblastici e mieloblastici, la distribuzione dei cromosomi nei nuclei in interfase al fine di definirne i territori. Questa possibilità è data dall'uso della microscopia confocale associata alla tecnica di "painting" dei cromosomi mediante sonde fluorescenti. Risultati preliminari indicano che la distribuzione di questi territori cromosomici varia considerevolmente nella fase di "commitment"

da cellula staminale a precursori mieloidi. Questa osservazione deve essere vista alla luce dell'effetto posizionale dell'espressione genica, cioè della variazione del posizionamento dei geni differenzialmente espressi nei territori cromosomici in corso di differenziamento. I geni espressi sono infatti localizzati prevalentemente alla superficie dei territori cromosomici, mentre quelli repressi sono interni ai territori, e quindi, coerentemente con le variazioni dinamiche della distribuzione dei territori cromosomici in corso di differenziamento, si spiega l'espressione genica differenziale. Una seconda linea di ricerca cerca di individuare a quale livello del differenziamento mieloide possano avvenire le traslocazioni cromosomiche che sono alla base dell'insorgenza di leucemie acute e croniche.

Bibliografia

1. Adams GB, Scadden DT. A niche opportunità for stem cell therapeutics. *Gene Therapy*. 2008; 15: 96-99,
2. Arai F, Suda T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Ann NY Acad Sci*. 2007; 1106: 41-53.
3. Cremer T, Cremer M, Dietzel S, et al. Chromosome territories - a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol*. 2006; 18: 307-316.
4. Cremer T, Cremer M. Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010.
5. Coppe A, Ferrari F, Bisognin A, et al. Motif discovery in promoters of genes co-localized and co-expressed during myeloid cell differentiation. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37: 533-549.
6. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, et al. The role of mesenchymal stem cells in haematopoiesis. *Blood Reviews*. 2006; 20: 161-171.
7. Ferrari C, de Castro IJ, Lavitas L, et al. Gene positioning. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010.
8. Ferrari F, Bortoluzzi S, Coppe A, et al. Genomic expression during human myelopoiesis. *BMC Genomics*. 2007; 8: 264-270.
9. Kosak ST, Scalzo D, Alworth SV, et al. Coordinate gene regulation during hematopoiesis is related to genomic organization. *PLOS Biol*. 2007; 5: e309.
10. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*. 2009; 114: 1150-1157.
11. Manfredini R, Zini R, Salati S, et al. The kinetic status of hemopoietic stem cells (HSC) subpopulations underlies a differential expression of genes involved in self-renewal, commitment and engraftment. *Stem Cells* 2005; 23: 496-306.
12. Navarro F, Lieberman J. Small RNAs guide hematopoietic cell differentiation and function. *J Immunol*. 2010; 184: 5939-5947.
13. Novershtern N, Subramanian A, Lawton LN, et al. Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. *Cell*. 2011; 144: 296-309.
14. Orford KW, Scadden DT. Deconstructing stem cells self-renewal: genetic insights into cell cycle regulation. *Nat Rev Gen*. 2008; 9: 115-128.

15. Orkin SH. Diversification of haemopoitic stem cells to specific lineages. *Nature Rev Gen.* 2000; 1: 57-64.
16. Parada L, Misteli T. Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trend Cell Biol.* 2002; 12: 451-462.
17. Quesenberry PJ. The continuum model of marrow stem cell regulation. *Curr Opin Hemat.* 2006; 13: 216-221.
18. Ross J, Li L. Recent avances in under standing extrinsic control of hemopoietic stem cell fate. *Curr Opin Hemat.* 2006; 13: 237-242.
19. Schatteman GC, Dunnwald M, Jiao C. Biology of bone marrow derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292: 1-18.
20. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hemopoietic stem-cells niche. *Blood.* 2005; 105: 2631-2639.
21. Takizawa T, Meaburn KJ, Misteli T. The meaning of gene posirioning. *Cell.* 2008; 135: 9-13,
22. Tomaru Y, Simon C, Forrest ARR, et al. Regulatory interdependence of myeloid transcription factors revealed by matrix RNAi analysis. *Genome Biol.* 2009; 10: R121.
23. Whichard ZL, Sarkar CA, Kimmel M, Corey SJ. Hematopoiesis and its disorders: a systems biology approach. *Blood.* 2010; 115: 2339-2347.
24. Wilson A, Trumpp A. Bone marrow hematopoietic stem cells niches. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 93-106.
25. Wilson A, Laurenti E, Oser G, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell.* 2008; 135: 1118-1129.

Attualità di citogenetica molecolare in ematologia

Antonio Cuneo, Sara Martinelli, Francesco Cavazzini, Maria Ciccone, Antonella Bardi, Gian Matteo Rigolin

Sezione di Ematologia, Dipartimento di Scienze Biomediche e Terapie Avanzate, Università di Ferrara, Arcispedale S. Anna, Ferrara

Le tecniche di analisi citogenetica convenzionale e di citogenetica molecolare hanno consentito l'identificazione di anomalie cromosomiche e genetiche in virtualmente tutte le neoplasie ematologiche.

Mentre la citogenetica convenzionale consente di studiare i cromosomi con un potere di risoluzione relativamente basso (nell'ordine di grandezza delle megabasi), le tecniche di citogenetica molecolare consentono di analizzare piccoli segmenti cromosomici (nell'ordine di grandezza delle kilobasi). Non rientrano in questa presentazione le tecniche di biologia molecolare e di sequenza genica.

Il riconoscimento di alcune di queste anomalie rientra oggi nelle indagini di laboratorio essenziali per la diagnosi, numerose anomalie sono utili per le loro ricadute nell'articolato processo di inquadramento prognostico, alcune sono necessarie per una corretta scelta terapeutica. Dunque le tecniche di citogenetica molecolare rivestono un ruolo di primaria importanza sia per le ricadute diagnostiche che per le ricadute di ricerca (1).

Oggi disponiamo di numerose tecniche in grado di fornire risposte al quesito del ricercatore e del clinico su quali lesioni abbiano indotto la crescita neoplastica ed abbiano favorito la progressione tumorale.

Principi metodologici

I principi di base della tecniche citogenetico-molecolari sono illustrati in dettaglio in alcune eccellenti rassegne (2-4)

La citogenetica convenzionale, con la valutazione morfologica del cariotipo di cellule in metafase dopo bandeggio (*Giemsa-trypsin banding* o *G-banding*), è stata introdotta negli anni '60 e consente la visualizzazione e la valutazione dell'intero corredo cromosomico in un unico esperimento.

Questa metodica riveste ancora oggi un ruolo di centrale nella moderna citogenetica onco-ematologica.

La metodica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) è stata tuttavia adottata nella maggior parte dei laboratori a complemento o in sostituzione del cariotipo

convenzionale, in quanto indagine più rapida, più sensibile ed eseguibile anche su cellule che non si dividono (FISH interfase).

Il principio dell'ibridazione tra acidi nucleici è stato poi sviluppato nella *Ibridazione Genomica Comparativa (Comparative Genomic Hybridization, CGH)* che consente una valutazione globale delle perdite e delle amplificazioni geniche nel DNA tumorale rispetto a quello della controparte cellulare normale. Recentemente sono state inoltre introdotte tecniche ad elevata risoluzione basate sui microarrays: gli *arrays di oligonucleotidi* consentono un'accurata analisi delle variazioni nel numero di copie geniche nel genoma di una cellula tumorale rispetto alla controparte normale; gli *SNPs microarrays* forniscono informazioni sia sul numero di copie che sulle varianti alleliche di specifici geni.

Cariotipo convenzionale

Le cellule vengono coltivate, in genere in presenza di mitogeni, e successivamente trattate con colchicina in modo da bloccare in metafase la divisione cellulare. Si procede quindi a fissazione ed allestimento del vetrino, che viene poi trattato con tripsina e quindi colorato con Giemsa. Il processo di digestione enzimatica elimina le proteine cromosomiche e denatura la doppia elica esponendo al colorante le basi nucleotidiche; il Giemsa ha particolare affinità per le regioni ricche in basi AT determinando lungo l'asse principale dei cromosomi una sequenza di regioni a diversa intensità di colorazione, dette bande cromosomiche (G-positive scure, G-negative chiare), caratteristiche di ogni coppia di cromosomi omologhi. Questa indagine è l'unica che consente di rilevare qualunque tipo di anomalia cromosomica (delezione, monosomia, trisomia totale o parziale di un cromosoma o traslocazioni), è altamente specifica ma ha il limite della scarsa sensibilità, in quanto permette di individuare solo aberrazioni che comportano la perdita il guadagno o lo scambio di segmenti grandi almeno quanto una banda cromosomica, corrispondente a diverse megabasi.

FISH (Fluorescenze In Situ Hybridization)

Utilizza sonde di DNA marcate con fluorocromi per identificare specifiche regioni di DNA genomico che vengono poi visualizzate con microscopio a fluorescenza. Può essere eseguita su cellule in metafase ma anche in interfase, risultando perciò particolarmente vantaggiosa per tipi cellulari che non hanno la tendenza a dividersi. Esistono sonde centromeriche, subtelomeriche o locus-specifiche, per identificare anomalie numeriche, perdita o amplificazione genica ad un particolare locus o traslocazioni, in particolare traslocazioni criptiche difficilmente individuabili con il cariotipo convenzionale.

Sono disponibili diversi tipi di sonde per la ricerca di traslocazioni specifiche, le due tipologie principali sono:

- *dual colour dual fusion translocation probes*: si tratta di sonde specifiche per ognuno dei due geni coinvolti, marcate con differenti fluorocromi. La traslocazione si caratterizza per la giustapposizione dei due segnali di colore diverso sullo stesso cromosoma;
- *break apart probes*: disegnate per individuare anomalie a carico di un gene spe-

cifico che può andare incontro a riarrangiamento con più geni partner (es. MLL, 11q23). La sonda copre la regione del gene dove avviene normalmente la rottura (breakpoint): può trattarsi di una sonda di un singolo colore e la traslocazione si traduce quindi in un segnale separato (split signal) dello stesso colore, oppure può trattarsi di due sonde di due colori diversi, una che mappa al di sopra del breakpoint, l'altra al di sotto, che risultano separate in caso di rottura del gene.

Il limite dell'indagine FISH così descritta consiste nella possibilità di individuare soltanto alterazioni genetiche già note, per le quali siano disponibili sonde specifiche, e che vengano appositamente cercate nel singolo caso.

Questo limite è stato parzialmente superato dalle più recenti applicazioni della tecnica FISH che utilizzano numerose sonde, di altrettanti colori diversi, allo stesso tempo e nella stessa cellula. Esistono in particolare le *whole-chromosome painting probes (WCPs)* che consistono di pool di sequenze di DNA che mappano lungo l'intera lunghezza di un particolare cromosoma e sono tutte marcate con lo stesso fluorocromo, rendendo così visibile l'intero cromosoma in metafase. In base alle esigenze del singolo caso si possono utilizzare sonde specifiche per uno o più cromosomi, fino a poter marcare contemporaneamente tutti i 24 cromosomi umani (24-color karyotyping). *Multiplex (M)-FISH* e *spectral karyotyping (SKY)* sono indagini che applicano questa tecnologia e differiscono tra loro soltanto per la tecnica di imaging con la quale il segnale fluorescente viene poi visualizzato. Non vengono utilizzate di routine a scopo diagnostico ma sono in grado di individuare riarrangiamenti criptici che sfuggono al cariotipo convenzionale. Questa applicazione della FISH non cerca un'anomalia specifica ma esegue una indagine di screening.

CGH (Comparative Genomic Hybridization) and ARRAY-CGH

Fornisce una valutazione globale delle amplificazioni e delezioni geniche che caratterizzano il genoma di una cellula tumorale rispetto a quello della controparte normale.

Il DNA viene estratto dal campione tumorale e dal controllo normale e marcato con un diverso colorante fluorescente nei due casi (in genere verde per il DNA tumorale, rosso per il controllo).

I due campioni vengono poi mescolati e fatti ibridare su un vetrino con un preparato di DNA in metafase estratto da cellule normali. Il risultato viene poi analizzato da un software che valuta il rapporto di intensità cromatica verde/rosso: regioni cromosomiche con elevato rapporto verde/rosso sono aree di verosimile amplificazione genica nella cellula neoplastica; al contrario regioni con un basso rapporto verde/rosso sono aree di verosimile delezione. Questa indagine ha però una sensibilità limitata e non consente la rilevazione di piccole anomalie (<10 Mb) e di traslocazioni bilanciate.

Un netto guadagno in termini di sensibilità si è ottenuto con una variante della stessa tecnica, detta *array-CGH*, in cui la miscela di DNA tumorale e di controllo differentemente marcati viene ibridata non con un preparato di cromosomi in metafase ma con una matrice (array) di frammenti di DNA genomico normale.

Un microarray di DNA (comunemente conosciuto come gene chip, chip a DNA, biochip o matrice ad alta densità) è costituito da un insieme di microscopiche sonde di DNA attaccate ad una superficie solida come vetro, plastica, o chip di silicio. Attualmente la maggior risoluzione si ottiene con gli *arrays di oligonucleotidi* che coprono l'intero genoma e consentono una valutazione altamente sensibile delle variazioni nel numero di copie geniche presenti in un campione di DNA cellulare rispetto ad un controllo.

SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) ARRAYS

Un polimorfismo a singolo nucleotide è una variante nel materiale genico che dipende dalla variazione di un unico nucleotide, tale per cui l'allele polimorfico risulta presente nella popolazione in una proporzione superiore all'1%. Al di sotto di tale soglia si è soliti parlare di mutazione. Gli SNPs possono presentarsi all'interno di una sequenza esonica, di una regione intronica o in una regione intergenica. Gli SNPs costituiscono il 90% di tutte le variazioni genetiche umane, grazie al sequenziamento sono stati in larga parte identificati ed è stato possibile creare SNPs-array che contengono sonde oligonucleotidiche specifiche per approssimativamente 900000 SNPs.

Gli SNPs array possono fornire informazioni molto dettagliate sul genotipo e sulle variazioni nel numero di copie geniche per l'intero genoma di una cellula neoplastica. Il DNA della cellula di interesse viene estratto e digerito con una endonucleasi. I frammenti di restrizione ottenuti vengono amplificati con PCR, marcati con fluorocromi e fatti ibridare con lo SNP array. Un software elabora le informazioni ottenute dalla diversa intensità di fluorescenza del segnale per ogni SNP e ricostruisce su questa base una sorta di cariotipo virtuale per quella cellula.

Tre tipi di informazione si possono ottenere con questa indagine:

- identificazione di fenomeni di *perdita di eterozigosi (LOH, loss of heterozygosity)* a livello di alcuni SNPs (e quindi dei loci corrispondenti), nel tessuto tumorale rispetto alla controparte normale. La perdita di eterozigosi può avvenire per ricombinazione mitotica (*disomia uniparentale acquisita*) ed acquista rilevanza nella cancerogenesi dal momento che può rendere la cellula omozigote per una pre-esistente mutazione;
- identificazione di una maggior frequenza di alcuni specifici SNPs in determinate forme tumorali (possibile associazione con geni malattia) o selezionati dopo una determinata terapia;
- informazioni relative alla perdita o amplificazione genica nelle cellule tumorali (la perdita di tutti gli SNPs in una particolare regione cromosomica indica un'area di delezione, mentre un significativo aumento del segnale è indicativo di un'area di amplificazione genica).

Anomalie citogenetiche molecolari nelle neoplasie ematologiche

I risultati derivanti dall'applicazione delle diverse tecniche oggi disponibili sono riassunti nelle tabelle 1-7 (5, 6). Un riassunto completo è fornito nel lavoro coordinato da Huret e collaboratori (6).

Conclusion e prospettive future

a) *Diagnostica*

La diagnostica delle lesioni citogenetiche molecolari rientra oggi nelle indagini di laboratorio essenziali per un corretto inquadramento e gestione delle neoplasie ematologiche. L'organizzazione dei laboratori diagnostici dovrà prevedere l'allargamento delle reti già disponibili al fine di mettere a disposizione di tutti i pazienti queste indispensabili e sofisticate tecnologie. Le Aziende Ospedaliere-Universitarie e le strutture sanitarie che hanno nella loro "mission" l'assistenza e la ricerca di elevato livello dovranno giocare un ruolo sempre più propositivo nell'allestimento di piattaforme tecnologiche efficienti capaci di garantire diagnostica avanzata e ricerca in strutture economicamente sostenibili.

b) *Ricerca*

Queste tecniche consentono uno rapido ed efficiente screening di tutti i tipi di lesioni di segmenti cromosomici, sia di tipo bilanciato (ad esempio traslocazioni, mediante la citogenetica convenzionale) che non-bilanciato (guadagno o perdita di piccole porzioni del genoma con le tecniche CGH-arrays, SNPs).

L'applicazione ragionata di queste metodiche, spesso propedeutiche all'impiego di potenti metodi di sequenza del genoma (next-generation sequencing), consentono l'identificazione di profili di lesioni genetiche in ciascuna forma neoplastica utili per la comprensione dei meccanismi di trasformazione, dell'emergenza dell'instabilità genetica caratteristica della progressione di malattia e dell'insorgenza dei fenomeni di resistenza ai farmaci (7).

Bibliografia

1. Ebert B, et al. Genomic approaches to the study of hematologic science. In: Hoffman R, et al (eds). Hematology. Principles and practice. 5th ed. Churchill Livingstone, Elsevier, New York. 2009; 16-24.
2. Lillington DM, et al. Molecular cytogenetics and array-based genomic analysis. In: Provan D, Gribben JG (eds). Molecular Hematology. 3rd ed. Wiley-Blackwell. 2010; 19-25.
3. Letai AG, et al. Lymphoma genetics. In: Provan D, Gribben JG (eds). Molecular Hematology. 3rd ed. Wiley-Blackwell. 2010; 117-126.
4. Harrison CJ. Cytogenetics of leukaemia and lymphoma. In: Hoffbrand AV, et al (eds). Postgraduate Haematology. 5th ed. Blackwell publishing, 2005; 492-508.
5. Godley LA, et al. Cytogenetics and molecular abnormalities. In: Kaushansky K, et al (eds). Williams Hematology. 8th ed. McGraw Hill, 2010.
6. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, available at <http://atlasgeneticsoncology.org/>.
7. Ferracin M, Zagatti B, Rizzotto L, Cavazzini F, Veronese A, Ciccone M, Saccenti E, Lupini L, Grilli A, De Angeli C, Negrini M, Cuneo A. MicroRNAs involvement in fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. Mol Cancer. 2010; 26, 9: 123.

AML	t(6;9)(p23;q34)	DEK	NUP214/CA N	Proteina di fusione	Cariotipo	1%	La proteina di fusione agisce come fattore di trascrizione aberrante ed altera il trasporto nucleare legandosi a fattori di trasporto solubili.	Essenziale per la diagnosi (WHO 2008). Significato prognostico sfavorevole. Essenziale nel monitoraggio della risposta. Non è un target terapeutico.		
		EVII	RPN1	Giustapposizione di RPN1, con attività di enhancer, a EVII	Cariotipo o FISH	2%	RPN1 può agire come enhancer di EVII con conseguente stimolo alla proliferazione cellulare e blocco del differenziamento.	Essenziale per la diagnosi (WHO 2008). Significato prognostico sfavorevole. Essenziale nel monitoraggio della risposta. Non è un target terapeutico.		
		RBM15	MKL1	Proteina di fusione	Cariotipo	<1%	La proteina di fusione può modulare l'organizzazione cromatinica, i pathways di differenziamento HOX-mediati o la segnalazione extracellulare.	Essenziale per la diagnosi (WHO 2008). Significato prognostico sfavorevole. Essenziale nel monitoraggio della risposta. Non è un target terapeutico.		
	AML	+8	Sconosciuto			Cariotipo o FISH	10%	Sconosciuto		
			MLL		Duplicazione interna in tandem	Cariotipo e FISH	1-2%	Alterata regolazione trascrizionale di MLL		
			Si veda sopra MDS.					10%	Si veda sopra MDS.	
			-5 or del(5q)					10%		
			del(20q)					5%		Complemento diagnostico ma non essenziali per la diagnosi (WHO 2008). Significato prognostico sfavorevole. Essenziali nel monitoraggio della risposta. Non rappresentano un target terapeutico.
			t(12p) or del(12p)	Possibili geni coinvolti sono ETV6, CDKN1B	Cariotipo o FISH	2%	Sconosciuto			
			-7 or del(7q) and/or -5 or del(5q)	Si veda MDS.		75%	Si veda sopra MDS.			
Therapy-related AML	t(9;11)(p22;q23)/(t(11q23)	Sconosciuto			Cariotipo o FISH	2%	Sconosciuto			
		MLL		Proteina di fusione	Cariotipo o FISH	3%	Si veda sopra per traslocazioni coinvolgenti MLL			
		RUNX1/AML1		Proteina di fusione	Cariotipo o FISH	2%	Si veda sopra per traslocazioni coinvolgenti RUNX1.			

*La percentuale si riferisce alla frequenza dell'alterazione nella malattia in generale, tra parentesi è invece la frequenza nell'ambito dello specifico sottotipo di malattia.

Tab. 2 - Sindromi mielodisplastiche.

Malattia	Alterazioni citogenetiche	Geni coinvolti	Conseguenza	Metodica di rilevazione	Frequenza	Significato patogenetico	Significato clinico dell'alterazione citogenetica	
MDS	-5/del(5q)		Identificata la "regione comunemente deleta" (CDS=commonly deleted segment). Geni coinvolti in quanto aploinsufficienti: RPS14, miR-145, miR-146a. Geni aploinsufficienti coinvolti nella sensibilità alla lenalidomide sono PP2A e CDC25C.	Cariotipo, FISH, SNPs (LOH)	40-100% (la frequenza dipende dalla specifica categoria MDS WHO e dalla sensibilità dell'indagine utilizzata)	RPS14 codifica un componente essenziale della subunità 40S dei ribosomi e la sua aploinsufficienza sembra responsabile del difetto nell'eritropoiesi nella sindrome 5q-, miR-145 e miR-146a stimolano la megacariopoiesi e sono responsabili dei caratteristici micromegacariociti iploblasti. PP2A e CDC25C sono fosfatasi con attività coregolatoria a livello del checkpoint G2-M del ciclo cellulare. Favoriscono la progressione del ciclo cellulare.	Le alterazioni citogenetiche sono utili per la dimostrazione di clonalità ma non essenziali per la diagnosi. Utilizzate negli score prognostici IPSS e WPSS: cariotipo normale, del(20q), del(5q). -Y hanno prognosi favorevole; cariotipo complesso e del(7q) hanno prognosi sfavorevole; le altre anomalie hanno prognosi intermedia. Scarso significato nel monitoraggio della risposta. La delezione isolata (5q) è target terapeutico per la lenalidomide.	
	-7/del(7q)		Identificata la "regione comunemente deleta" (CDS=commonly deleted segment). Diversi possibili geni coinvolti in quanto aploinsufficienti. Recentemente scoperti Trian (Samd9L) e Kasumi (Samd9).	Cariotipo, FISH, SNPs (LOH)		Trian regola negativamente il signalling di numerose citochine modulando la funzione endosomiale di degradazione dei recettori citochinici.		
	+8		Sconosciuto	Cariotipo o FISH				
	del(20q)		Nella regione comunemente deleta mappano il gene per la topoisomerasi I, per la fosfolipasi C, HNF4, ADA ed il regolatore trascrizionale KRML.	Cariotipo o FISH				
	-Y		Sconosciuto	Cariotipo o FISH				

Tab. 3 - Malattie mieloproliferative croniche.

Malattia	Alterazioni citogenetiche	Geni coinvolti	Conseguenza	Metodica di rilevazione	Frequenza	Significato patogenetico	Significato clinico dell'alterazione citogenetica
MPN	CML	ABL1 BCR	Proteina di fusione	Cariotipo o FISH (in caso di inserzione eripitica di 3' ABL all'interno del cromosoma 22, senza traslocazione)	~98% (100%) Alcuni pazienti con CML hanno un'inserzione di ABL1 che risulta così adiacente a BCR in un cromosoma 22, apparentemente normale.	Tirosin-chinasi costitutivamente attivata con attivazione dei pathways di RAS/MAPK, PI3K/AKT, and JAK/STAT.	Essenziale per la diagnosi. Non significativo prognostico. Essenziale nel monitoraggio della risposta. Target terapeutico degli inibitori delle tirosin-chinasi (imatinib, dasatinib, nilotinib).
	PV	Il significato delle singole alterazioni è dettagliato oltre (si veda MDS e AML)		Cariotipo	15-40%		Scarso significato diagnostico, prognostico e nel monitoraggio della risposta. Non rappresentano un target terapeutico.
	ET			Cariotipo	10%		
	PMF				Cariotipo	60%	
Neoplasie mieloidi e linfoidi con eosinofilia ed alterazioni di PDGFRA, PDGFRB o FGFR1		FIP1L1 PDGFRA	Delezione eripitica che giustappone FIP1L1 e PDGFRA con conseguente produzione di una proteina di fusione.	FISH o PCR.	~ 100% (in una minoranza di casi si tratta di traslocazioni che coinvolgono la banda 4q12)	Tirosin-chinasi costitutivamente attivata.	Essenziale per la diagnosi (WHO 2008). Non significativo prognostico. Utile nel monitoraggio della risposta. Target terapeutico per inibitori delle tirosin-chinasi (imatinib).
		PDGFRB ETV6/TEL	Proteina di fusione	Cariotipo e FISH o PCR (poiché non tutte le traslocazioni t(5;12)(q13;3;p13) si traducono nel gene di fusione PDGFRB-ETV6)	~ 100%	Tirosin-chinasi costitutivamente attivata.	
		FGFR1 Vari partner di traslocazione	Proteina di fusione	Cariotipo o FISH	100%	Tirosin-chinasi costitutivamente attivata.	

Tab. 4 - Leucemia acuta linfoblastica.

Malattia	Alterazione citogenetica	Geni coinvolti	Conseguenza	Metodica di rilevazione	Frequenza*	Significato patogenetico	Significato clinico dell'alterazione citogenetica
LAL B	t(9;22)(q34;q11.2)	ABL1	Proteina di fusione	Cariotipo o FISH	10%	Tirosin chinasi costitutivamente attivata con attivazione dei pathways di RAS/MAPK, PI3K/AKT, and JAK/STAT.	Essenziale per la diagnosi (WHO 2008). Le uniche alterazioni con significato prognostico favorevole sono la t(12;21) ed un cariotipo iperdiploide; le altre hanno sostanzialmente significato sfavorevole. Sono essenziali nel monitoraggio della risposta. t(9;22) rappresenta un target terapeutico per gli inibitori delle tirosin-chinasi (imatinib, dasatinib, nilotinib).
	t(4;11)(q21;q23)	AFI1/4	Proteina di fusione	Cariotipo	5%	La proteina MLL è una istone metiltransferasi che assembla complessi proteici che regolano la trascrizione genica mediante il rimodellamento cromatinico.	
	t(1;19)(q23;p13.3)	PBX1	Proteina di fusione	Cariotipo	6% (30%)	Potente attivatore trascrizionale, attività trasformante pleiotropica.	
	t(11;19)(q23;p13.3)	MLL	Proteina di fusione	Cariotipo o FISH	1%		
	t(17;19)(q21-22;p13.3)	HLF	Proteina di fusione	Cariotipo, RT-PCR del trascritto di fusione	1%	Il gene di fusione codifica per un fattore di trascrizione chinomero E2A-HLF con alterata affinità per il DNA e attività anti-apoptotica.	
	t(12;21)(p13;q22)	ETV6/TEL	Proteina di fusione	Spesso non identificabile al cariotipo. Meglio FISH e/o RT-PCR del trascritto di fusione.	25%	RUNX1/AML1 codifica un fattore di trascrizione, anche noto come core-binding factor; essenziale per l'ematopoiesi.	
	Hyperdiploidy 50-60			Cariotipo	10%		
LAL T	del(12p)t(12p)	TEL (ETV6)		Cariotipo	10%	TEL è un fattore di trascrizione importante nell'emopoiesi.	Non essenziali per la diagnosi. Non modificano sostanzialmente la prognosi. Importanti nel monitoraggio della risposta. Non rappresentano un target terapeutico.
	t(11;14)(p15;q11.2)	LMO1/RBTN1	Espressione deregolata	Cariotipo	1%	LMO1 è un partner del fattore di trascrizione SCL. La traslocazione lo giustappone a TRA sottoponendolo all'azione del promotore di quest'ultimo; ne risulta iperespressione.	
	t(11;14)(p13;q11.2)	RBTN2	Espressione deregolata	Cariotipo	3%	Il prodotto genico di RBTN2 ha un ruolo centrale nella regolazione dei pathway ematopoietici nell'adulto. In seguito alla traslocazione risulterà iperespresso.	

	t(8;14)(q24.1;q11.2)	MYC	TRA	Espressione deregolata	Cariotipo	<1%	<1%	Non si forma un gene ibrido, la traslocazione genera uno scambio di promotore: la giustapposizione del gene C-MYC al promotore del gene TCR-alfa determina iper-espressione costitutiva di C-MYC. Proliferazione anche in assenza di fattori di crescita.
	inv(14)(q11.2;q32)	TRA	TCL1A	Espressione deregolata	Cariotipo	<1%		La chinasi AKT è un componente chiave della trasduzione di segnali antiapoptotici e proliferativi nelle cellule T. La proteina TCL1, codificata da TCL1A, interagisce con AKT promuovendone l'attività chimica e il trasporto nucleare. L'iperpressione di TCL1, causata dalla traslocazione che lo giustappone al gene TRA, esalta la fosforilazione dei bersagli di AKT.
	t(10;14)(q24;q11.2)	HOX 11 (previously called TCL3)	TRD	Espressione deregolata	Cariotipo	3%		HOX11 è un fattore di trascrizione normalmente non espresso dai tessuti adulti. Non proteina di fusione, ma scambio di promotore. HOX11 è sottoposto al controllo dei domini regolatori di TRD e deregolato. Ne consegue iper-espressione.
	t(1;14)(p32;q11.2)	TAL1	TCR	Espressione deregolata	Cariotipo	1%		La proteina codificata da TAL1 è un fattore di trascrizione implicato nella differenziazione delle cellule ematopoietiche. Questa traslocazione giustappone TAL1 al locus TCR.
	t(7;9)(q34;q34)	TRB	NOTCH1	Espressione deregolata	Cariotipo	2%		La traslocazione giustappone il gene Notch1 ad elementi promotore ed enhancer del gene TRB. Ne risulta iper-espressione costitutiva di Notch, che attiva geni che inibiscono la differenziazione cellulare; e influenza la proliferazione e la sopravvivenza.
	t(7;19)(q34;p13.3)	TRB	LYL1	Espressione deregolata	Cariotipo	<1%		La traslocazione giustappone il gene LYL1 al gene TRB. Il suo prodotto lega E47 ed E12, due proteine codificate da E2A. Con effetto dominante negativo, il prodotto di LYL1 previene la attivazione dei geni bersaglio di E2A (coinvolti nella differenziazione cellulare). Inoltre interagisce con NFkB, causando riduzione dei livelli di proteine NFkB-dipendenti.
	del(9p),t(9p)	CDKN2A/CDKN2B		Delezione di geni oncosoppressori, coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare.	Cariotipo	<1% (10%)		Le diverse aberrazioni di 9p possono avere diverse conseguenze molecolari. La delezione coinvolge CDKN2A e CDKN2B, che sono geni oncosoppressori. La perdita di eterozigosi si ha per ulteriore delezione, mutazione, o più frequentemente per metilazione del gene rimanente.

*La percentuale si riferisce alla frequenza dell'alterazione nella malattia in generale, tra parentesi è invece la frequenza nell'ambito dello specifico sottotipo di malattia.

Tab. 5 - Linfomi non-Hodgkin.

Malattia	Alterazione citogenetica	Geni coinvolti		Conseguenza	Metodica di rilevazione	Frequenza	Significato patogenetico	Significato clinico dell'alterazione citogenetica
Burkitt	t(8;14)(q24.1;q32)	MYC	IGH	Espressione deregolata	Cariotipo o FISH	95%	Non si forma un gene ibrido, la traslocazione sottopone C-MYC all'azione di enhancer costitutivamente attivi; ne consegue proliferazione cellulare incontrollata.	Essenziale per la diagnosi. Non significato prognostico. Utile nel monitoraggio della risposta. Non rappresenta un target terapeutico.
	t(2;8)(p12;q24.1)	IGK	MYC	Espressione deregolata	Cariotipo o FISH	1%		
	t(8;22)(q24.1;q11.2)	MYC	IGL	Espressione deregolata	Cariotipo o FISH	4%		
Follicolare	t(14;18)(q32;q21.3)	IGH	BCL2	Espressione deregolata	Cariotipo o FISH	20%	BCL2 è una proteina antiapoptotica. La traslocazione si associa a scambio di promotore e sottopone BCL2 all'azione del promotore del locus IGH, con conseguente iper-espressione.	Utile complemento diagnostico e nel follow-up. Scarso significato prognostico. Non è un target terapeutico.
DLBCL	t(3;22)(q27;q11.2)	BCL6	IGL	Espressione deregolata	Cariotipo o FISH	45% for all t(3q27)	BCL6 codifica per un fattore di trascrizione. La traslocazione non crea una proteina di fusione, ma causa scambio di promotore.	Utile complemento diagnostico e nel follow-up. Scarso significato prognostico. Non è un target terapeutico.
		BCL6	IGH	Espressione deregolata	Cariotipo o FISH			
		BCL6		Espressione deregolata	Cariotipo o FISH			
MCL	t(11;14)(q13;q32)	CCND1	IGH	Espressione deregolata	Cariotipo o FISH	~100%	Scambio di promotore. La traslocazione sottopone CCND1, che codifica per la ciclina D1, all'azione del promotore del locus IGH.	Essenziale per la diagnosi. Non significato prognostico. Utile nel monitoraggio della risposta. Non rappresenta un target terapeutico
LPL	t(9;14)(p13;q32)	PAX5	IGH	Espressione deregolata	Cariotipo o FISH		PAX5 è un fattore di trascrizione espresso durante le fasi precoci della Infopoesi B. La traslocazione non crea un gene di fusione, ma causa scambio di promotore. Ne consegue iperespressione di PAX5.	Utile complemento diagnostico e nel follow-up. Scarso significato prognostico. Non è un target terapeutico.

	MALT	t(11;18)(q21;q21)	BIRC3/ API2	MALT1	Proteina di fusione	Cariotipo o FISH	40-50%	Aumentata attivazione del pathway di NF- κ B	Utile complemento diagnostico e nel follow-up. Significato prognostico sfavorevole. Non rappresentano un target terapeutico.
		t(1;14)(p22;q32)	BCL10	IGH	Espressione deregolata	Cariotipo	10%	Aumentata attivazione del pathway di NF- κ B. Bcl 10 è coinvolta nell'apoptosi.	
		t(14;18)(q32;q21)	IGH	MALT1	Espressione deregolata	Cariotipo	10-20%	Aumentata attivazione del pathway di NF- κ B	
		t(3;14)(p14.1;q32)	FOXP1	IGH	Espressione deregolata	Cariotipo	10%	FOXP1 è un fattore di trascrizione, la sua attività risulta potenziata.	
T-NHL	FISH	t(2;5)(p23;q35)	ALK	NPM1	Espressione deregolata	Cariotipo	75%	ALK è un recettore tirosin-chinasi associato alla membrana. La traslocazione risulta nell'attivazione costitutiva del dominio catalitico di ALK.	Utile complemento diagnostico e nel follow-up. Significato prognostico favorevole. Possibile futuro target terapeutico.

Tab. 6 - Leucemia linfatica cronica.

Malattia	Alterazione citogenetica	Geni coinvolti	Conseguenza	Metodica di rilevazione	Frequenza	Significato patogenetico	Significato clinico dell'alterazione citogenetica
CLL	de(13q)	miR-15A, miR-16-1, DLEU2, DLEU7	Aplinsufficienza di geni oncosoppressori, coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare.	Cariotipo o FISH	50% (eterozigote nel 75% dei casi, omozigote nel 25%)	La delezione di miR-15A e miR-16-1 attiva il ciclo cellulare e aumenta la fosforilazione di Rb. DLEU2 e DLEU7 normalmente inibiscono NF-kB.	Scarsa significato diagnostico. Significato prognostico favorevole per del(13q) isolata, intermedio per trisomia 12, sfavorevole per del(11q), de(17p), e le altre anomalie. Utili nel monitoraggio di malattia e nella valutazione della progressione (evoluzione clonale). Non specifici target terapeutici ma importanti nella scelta della terapia.
	trisomia 12	Solo geni candidati ma non confermati: CLLU1, MDM2.	Overespressione di potenziali oncogeni.	Cariotipo o FISH	15%	MDM2 codifica per un importante regolatore di TP53 e la sua overespressione comporta inattivazione funzionale del pathway di p53.	
	del(11q)	ATM	Perdita di geni oncosoppressori	Cariotipo o FISH	7-25% (secondo lo stadio di malattia)	Il gene ATM (atassia-telangiectasia) è coinvolto nel processo di risposta al danno del DNA. La sua perdita si associa ad instabilità genetica.	
	de(17p)	TP53	Perdita di geni oncosoppressori	Cariotipo o FISH	7-8%	Il gene TP53 codifica per la proteina p53, fondamentale regolatrice del ciclo cellulare ed in particolare della risposta al danno del DNA. La sua perdita si associa a grave instabilità genetica.	
	de(6q)	Sconosciuti	Perdita di geni oncosoppressori	Cariotipo o FISH	3-7%	Sconosciuto.	
	tr(14q32)	IGH	Espressione deregolata del gene partner	Cariotipo o FISH	4-9%		
			Diversi possibili partner di traslocazione				

Tab. 7 - Mieloma multiplo.

Malattia	Alterazione citogenetica	Geni coinvolti	Conseguenza	Metodica di rilevazione	Frequenza	Significato patogenetico	Significato clinico dell'alterazione citogenetica
MM	-13/del(13q)	RBI e loci D13S319 and D13S272.	Perdita di geni oncosoppressori	Cariotipo	40%		Non significativo diagnostico. Significato prognostico sfavorevole per le alterazioni del cromosoma 13, t(4;14), t(11;14). Favorevole il cariotipo ipertriploide. Scarso significato nel monitoraggio della risposta. Non rappresentano un target terapeutico.
	t(4;14)(p16;q32)	FGFR3 IGH	Espressione deregolata	<p>Più non essere identificata con cariotipo (traslocazione telomero-telomero). Necessaria la FISH. Therefore molecular probes are indicated, and FISH is relevant.</p>	15%	FGFR3 è un recettore tirosin-chinasico. Attiva molteplici pathways implicati nella proliferazione e differenziazione cellulare. Non proteina di fusione, ma scambio di promotore. La traslocazione sottopone FGFR3 al promotore del locus IGH con conseguente iperespressione.	
	t(14;16)(q32;q23)	IGH	Espressione deregolata	FISH	5%	MAF è un fattore di trascrizione la cui attività risulta potenziata.	
	t(6;14)(p21;q32)	CCND3 IGH	Espressione deregolata	Non sempre individuabile con il cariotipo; meglio FISH.	4%	CCND3 codifica per la ciclina D3, regola la transizione G1/S. La traslocazione sottopone CCND3 all'azione dei promotori del locus IGH, con iperespressione di CCND3.	
	t(11;14)(q13;q32)	CCND1 IGH	Espressione deregolata	Cariotipo o FISH	15%	Scambio di promotore. La traslocazione sottopone CCND1, che codifica per la ciclina D1, all'azione del promotore del locus IGH.	
	t(14q;32)	IGH		Cariotipo o FISH	50%		
	Hyperdiploidy, +3,+5,+7,+9,+11				20%		

**BIOINFORMATICA:
STRUMENTO INDISPENSABILE
NELLA RICERCA TRASLAZIONALE**

Integrazione di dati e conoscenza a supporto della ricerca

Paolo Romano

Centro Biotecnologie Avanzate, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova

La ricerca biomedica dipenderà sempre più dall'analisi automatica delle informazioni disponibili sulla rete Internet. Conseguentemente, l'accesso a queste informazioni diventerà nei prossimi anni un aspetto fondamentale della ricerca. In questo contesto, si dovrà passare da una gestione dei dati e delle informazioni prevalentemente individuale e manuale, cioè svolta dai ricercatori interagendo con i singoli siti di interesse, a una innovativa modalità a larga, prevalente, componente automatica e collaborativa, affidata cioè a software e basata sulla collaborazione all'interno di comunità di ricercatori.

Questo mutato approccio è possibile già ora grazie ad alcune delle più recenti tecnologie informatiche e telematiche che, se implementate utilizzando ben precisi standard e, al contempo, sostenute da una adeguata definizione, insieme sintattica e semantica, delle informazioni e dei sistemi informativi, possono consentire la realizzazione di nuovi strumenti di gestione e analisi dei dati di semplice utilizzo per l'utente finale (ricercatore, clinico, tecnico di laboratorio) e in grado di interoperare¹ in maniera efficiente ed efficace con i sistemi informativi che gestiscono la notevole mole di dati biologici disponibili, peraltro in rapidissima crescita.

In questo contributo, vengono dapprima presentate alcune caratteristiche peculiari dei sistemi informativi e delle informazioni biologiche per la ricerca. Si tratta di uno scenario molto più frammentato e complesso di quanto comunemente si pensi. Successivamente, sono introdotti tre diversi approcci metodologici e i corrispondenti strumenti tecnologici che potranno contribuire a migliorare l'accesso all'informazione, integrando i sistemi informativi esistenti e conducendo a una più vasta ed efficace gestione delle informazioni e della conoscenza per la ricerca biomedica.

Le caratteristiche delle informazioni biologiche

Le informazioni biologiche disponibili per la ricerca e la clinica sono ingenti, distribuite in molti siti della rete Internet e gestite con sistemi informativi molto ete-

¹Si parla di interoperabilità quando due sistemi informatici sono in grado di interagire autonomamente.

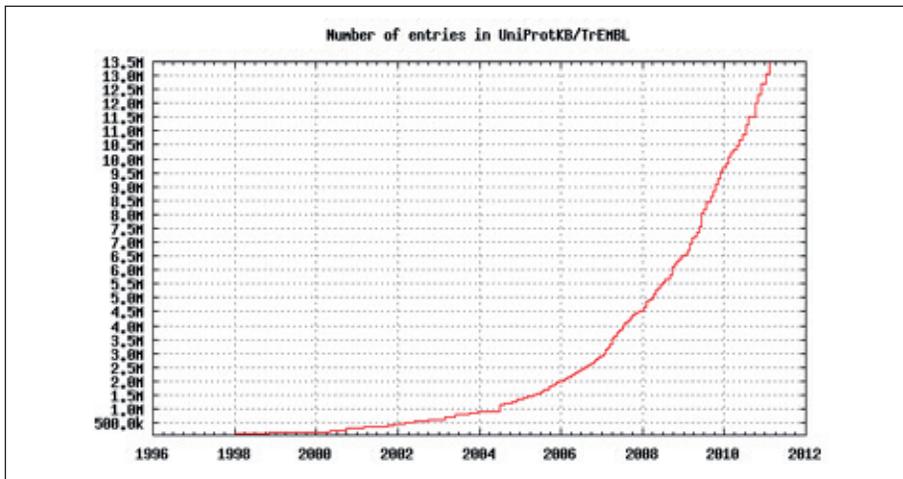


Fig. 1 - Andamento del numero di sequenze incluse in UniProtKB/TrEMBL.

Fonte <http://www.ebi.ac.uk/uniprot/TrEMBLstats/>

rogegni. A titolo d'esempio, si considerino alcuni numeri. Le banche dati di sequenze nucleotidiche hanno incrementato la propria dimensione del 40% in media negli ultimi tre anni. Lo European Nucleotide Archive (ENA) dello European Bioinformatics Institute (EBI) contiene quasi 200 milioni di sequenze, per un totale di circa 300 miliardi di basi. Analogo andamento ha la UniProt Knowledge Base (UniProtKB) che include circa 13 milioni di sequenze, corrispondenti a quasi 4 miliardi di aminoacidi. In figura 1 è riportato l'andamento del contenuto di UniProtKB.

PRIDE (PRoteomics IDentifications) comprende attualmente più di 100 milioni di spettri di spettrometria di massa, mentre IntAct include già più di 230,000 interazioni molecolari note. Infine, ArrayExpress, una delle principali banche dati di esperimenti di microarray, ha duplicato la propria dimensione in ciascuno degli ultimi due anni. Attualmente, include i risultati di circa 16.000 esperimenti e 450.000 ibridizzazioni. Si veda in figura 2 l'andamento della crescita di Array Express.

Le più recenti tecnologie stanno incrementando ulteriormente, e in maniera molto accentuata, questo fenomeno. Un singolo esperimento di Next-Generation Sequencing (NGS) è in grado di produrre, già attualmente, 16 miliardi di basi. In prospettiva, altri ambiti di ricerca produrranno grandi quantità di dati che potranno essere analizzati esclusivamente in-silico.

Tra questi, l'analisi della variabilità genetica individuale e delle mutazioni puntiformi, nonché delle relative conseguenze funzionali, studi fondamentali per la medicina personalizzata che promette di affrontare con successo molte delle attuali problematiche di inefficacia delle cure somministrate in maniera indiscriminata, o meglio non individualizzata, e l'analisi del metaboloma, cioè dei pathways metabolici, e delle reti geniche, nonché di interazione proteina-proteina e proteina-ligando.

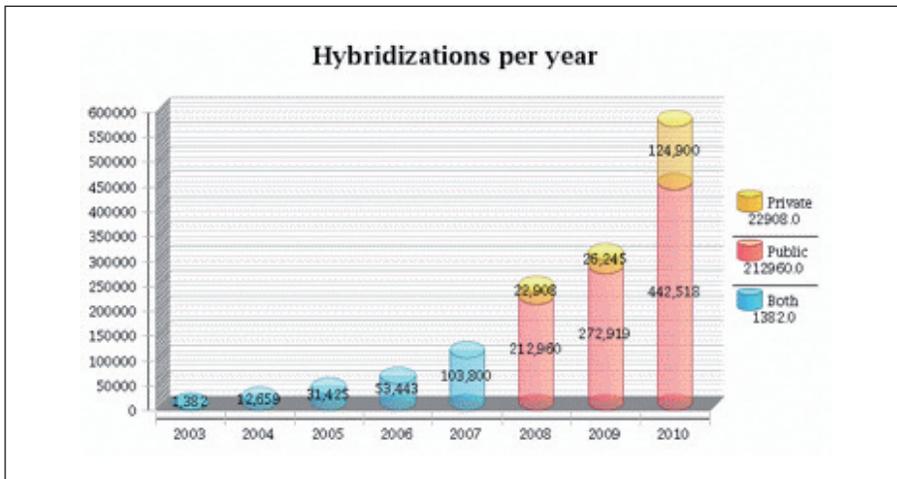


Fig. 2 - Andamento del numero di ibridizzazioni incluse in ArraExpress.

Fonte <http://www.ebi.ac.uk/microarray-srv/stats/>

Una collaborazione internazionale per costruire una mappa dettagliata della variabilità genomica umana, il progetto “1,000 Genomes”, ha appena concluso la sua fase pilota (1). L’obiettivo di questa fase era di identificare tramite tecnologie di NGS il 95% delle variazioni presenti in almeno l’1% della popolazione in tre popolazioni distinte. In questo contesto sono stati prodotti circa 4.9 Tbasi (~3 Gbasi/persona). In questo modo, sono state determinate 15 milioni di mutazioni, 1 milione di delezioni/inserzioni e 20.000 varianti di maggiore dimensione (<http://www.1000genomes.org/>). Sulla scia di queste tecnologie si sta affermando la Bioinformatica Clinica, che affronta il problema dell’integrazione di informazioni cliniche e genomiche per orientare la pratica diagnostica e terapeutica alla medicina personalizzata. Al contrario di quanto spesso ritenuto, le banche dati di biologia molecolare sono molto numerose e gestite da molti gruppi distinti. La lista dei siti SRS² pubblici, che è gestita da BioWisdom³, comprende, ad esempio, un elenco di più di 1,150 database. Il supplemento annuale di Nucleic Acids Research dedicato ai database di biologia molecolare (2) ne ha elencato 1,330 nel 2011⁴.

Le ovvie problematiche che derivano dalla disponibilità di una così ingente mole di informazioni sono ulteriormente complicate dalla distribuzione dei dati sulla rete Internet e dalla eterogeneità dei relativi sistemi informativi. A questa eterogeneità corrispondono diversi software di gestione dati, diversi formati, diverse sintassi e, a volte, diverse semantiche⁵. Infine, il continuo sviluppo di conoscenze e delle informazioni ad esse associate implica una rapida evoluzione delle esi-

²Sequence Retrieval System (SRS) è un software per l’indicizzazione integrata di banche dati di biologia molecolare.

³<http://www.biowisdom.com/download/srs-parser-and-software-downloads/public-srs-installations/>

⁴<http://www.oxfordjournals.org/nar/database/a/>

⁵Con lo stesso termine ci si riferisce a informazioni o dati diversi.

genze dei ricercatori e degli obiettivi che gli strumenti d'analisi devono porsi.

In questa situazione, la ricerca e l'integrazione delle informazioni, compiti normalmente svolti dai ricercatori accedendo ai siti web d'interesse, diventano esse stesse molto complesse e impegnative e richiedono un adeguato supporto informatico.

L'integrazione dei dati e l'automazione dei processi sono quindi necessari per ottenere una visione complessiva e più precisa di tutte le informazioni disponibili. Nello stesso tempo, risultano indispensabili per eseguire automaticamente interrogazioni e/o analisi che coinvolgono più database e software ed eseguire con efficienza analisi che coinvolgono grosse quantità di dati. In ultima analisi, l'integrazione delle informazioni è indispensabile per realizzare un effettivo data mining.

L'integrazione dei processi: workflow management systems

Un approccio efficace all'integrazione dei dati biologici si basa sui workflow automatici. Un workflow è, per definizione, l'automazione, anche parziale, di un processo. Il suo obiettivo concreto è l'implementazione di un processo complesso di analisi dei dati in un ambiente standardizzato. I suoi vantaggi principali sono:

- l'efficienza: in quanto procedura automatica, libera il ricercatore dai compiti ripetitivi,
- la riproducibilità: le analisi vengono svolte in maniera standardizzata, il che contribuisce a una "good practice", e possono essere replicate facilmente e ripetute a distanza di tempo,
- il riuso: i risultati intermedi possono essere archiviati e riutilizzati,
- la tracciabilità: essendo eseguito in un ambiente trasparente, la provenienza dei dati, cioè la sorgente informativa o l'elaborazione dalla quale derivano, può essere verificata a posteriori.

Un ricercatore che svolga un dato processo di analisi complesso on-line, deve necessariamente conoscere gli strumenti, software e database, che possono svolgere le elaborazioni che lo compongono, sapere su quali siti si trovano e saper usare le relative interfacce utente. Analogamente, in un'analisi automatizzata è necessario che il software comprenda quale elaborazione è necessaria per uno specifico compito (e.g. allineamento sequenze, recupero di struttura di proteina), sappia trovare le implementazioni di quel servizio (e.g. BLAST, fornito da NCBI, e PDB, disponibile all'EBI), sappia comporre i servizi per ottenere l'elaborazione desiderata, e infine sappia trasferire adeguatamente le informazioni tra i servizi coinvolti.

Per consentire queste funzionalità, si può utilizzare una metodologia articolata (3) che prevede:

- l'utilizzo di modelli condivisi dei dati degli "oggetti biologici" (geni, proteine, ecc.),
- la definizione di linguaggi XML a schema definito (con vocabolari controllati) per l'archiviazione dei dati,

- l'utilizzo di Web Services, interfacce per la comunicazione tra software, per lo scambio dei dati,
- la caratterizzazione dei dati e delle analisi da effettuare tramite un'apposita ontologia,
- la codifica dei processi d'analisi sotto forma di workflow, e quindi la suddivisione del processo in componenti interconnesse, ciascuna delle quali può essere svolta da un preciso software,
- la creazione di portali "user-friendly" per l'utilizzo dei workflow da parte dei ricercatori.

Sulla base di queste caratteristiche, sono già stati sviluppati alcuni workflow management system. In tabella 1 sono elencati i principali con alcune delle loro caratteristiche.

Taverna Workbench⁶ è probabilmente il workflow management system più noto e utilizzato (4). È un software open source sviluppato nell'ambito del progetto myGrid presso l'Università di Manchester e l'EBI. Taverna consente di costruire workflow per analisi complesse, accedere a processori sia remoti che locali, eseguire i workflow, visualizzare i risultati in diversi formati, descrivere i dati bioinformatici tramite un'ontologia, interfacciarsi con molti sistemi, sia remoti (tramite WSDL, Soaplab, BioMOBY, Rshell) che locali.

Tab. 1 - Alcuni dei principali workflow management system e le loro caratteristiche. Si noti la variabilità dei linguaggi XML utilizzati per la codifica dei workflow.

Software	Tipologia	Linguaggio XML	Disponibilità	URL
Taverna	Stand-alone	XScufl	Open source	http://taverna.sourceforge.net/Workbench
Biopipe	Libreria software	Pipeline XML	Open source	http://www.gmod.org/biopipe/
ProGenGrid	Stand-alone	NA	NA	http://datadog.unile.it/progen
DiscoveryNet	Stand-alone	DPML	Commercial	http://www.discovery-on-the.net/
Kepler	Stand-alone	MoML	Open source	http://kepler-project.org/
GPipe	Interfaccia Web, servizi locali	GPipe XML	Open source	http://if-web1.imb.uq.edu.au/Pise/5.a/gpipe.html
EGene	Stand-alone	NA	Open source	http://www.ibm.fmvz.usp.br/egene/
BioWMS	Interfaccia Web, servizi remoti	XPDL	Public use	http://litbio.unicam.it:8080/biowms/
BioWEP	Portale	XScufl / XPDL	Open source	http://bioinformatics.istge.it/biowep/
BioWBI	Interfaccia Web, servizi locali	Proprietary	Commerciale	http://www.alphaworks.ibm.com/tech/biowbi
Pegasys	Stand-alone	Pegasys DAG	Open source	http://bioinformatics.ubc.ca/pegasys/
Wildfire	Stand-alone	GEL	Open source	http://wildfire.bii.a-star.edu.sg/wildfire/
Triana	Stand-alone	Triana Workflow Language	Open source	http://www.trianacode.org/
Pipeline Pilot	Stand-alone	Proprietary	Commercial	http://www.scitegic.com/
FreeFluo	Libreria software	WSFL e XScufl	Open source	http://freefluo.sourceforge.net/
Biomake	Libreria software	NA	Open source	http://skam.sourceforge.net/

⁶Si veda <http://taverna.sourceforge.net/>

Due strumenti di estrema utilità, complementari rispetto a Taverna, sono BioCatalogue (5), un catalogo annotato dei Web Services di interesse biologico, e myExperiment (6), un sito basato su tecniche di social networking che comprende anche un archivio annotato di workflow.

Una delle principali limitazioni di Taverna consiste nel fatto che richiede competenze specifiche per la composizione dei workflow. L'utente, oltre a saper utilizzare il software, deve conoscere i Web Services disponibili e le modalità per accedervi e deve anche avere competenze base di programmazione. Da qui deriva l'esigenza di sviluppare portali "*user-friendly*". Il Workflow Enactment Portal for Bioinformatics (biowep)⁷ (7) è un portale nato con l'obiettivo di mettere a disposizione di ricercatori non esperti un insieme predefinito di workflow testati, validati, annotati e mantenuti funzionanti. Biowep consente di ricercare e selezionare i workflow sulla base del tipo di analisi che essi svolgono: Consente inoltre di eseguire interattivamente i workflow selezionati, nonché di archiviare i risultati e conservarli per poterli riutilizzare in tempi successivi.

I workflow sono creati da un amministratore, che li annota sulla base di un'ontologia delle analisi bioinformatiche (dominio applicativo, tipo di elaborazione, dati di input e output). Gli utenti accedono al sistema in remoto, sono autenticati tramite procedure di accesso controllato, lavorano in un proprio spazio dati dove possono conservare i risultati di maggiore interesse.

L'integrazione dei significati: ontologie e semantic web

Una modalità alternativa per l'integrazione dei dati si basa sulla descrizione semantica dei contenuti delle banche dati.

In passato, gli identificatori univoci dei record, come ad esempio gli Accession Number delle principali banche dati di biologia molecolare, sono stati utilizzati per collegare tra loro i record delle diverse banche dati di biologia. In sostanza, questi identificatori venivano inseriti nella descrizione di un record per indicare una relazione con il record identificato dall'ID.

Questo tipo di collegamento presenta due problemi principali: da un lato, è molto oneroso da mantenere aggiornato perché l'associazione può essere solo manuale, e, dall'altro, non consente di associare al collegamento tra i record una relazione semantica, cioè una descrizione della motivazione per la quale i due record sono collegati. In particolare, mancando quest'ultima informazione, l'interpretazione del collegamento può unicamente essere effettuata da un ricercatore.

Questi due problemi possono essere superati dall'utilizzo esteso di strumenti semantici che consentano di definire sia le informazioni gestite, sia le relazioni tra di esse, sulla base di concetti condivisi e ben definiti e strutturati. In quest'ottica, sono state definite le ontologie biologiche.

Un'ontologia è, per definizione, una "specifica formale esplicita di una concettualizzazione condivisa". In quanto specifica formale ed esplicita, un'ontologia si presta all'elaborazione automatica tramite software. Inoltre, è fondamentale che

⁷Si veda <http://bioinformatics.istge.it/biowep/>

sia condivisa, perché questo ne consente l'adozione da parte di fornitori di dati, ricercatori e comunità scientifiche.

In sostanza, un'ontologia si compone di due parti: i concetti che sono descritti in dettaglio anche tramite i loro attributi e le relazioni tra di loro. Le ontologie biologiche si prestano a vari impieghi. Consentono di definire concetti base di ambiti scientifici anche molto specifici e possono essere prese a riferimento per un uso condiviso di termini di riferimento. Possono essere utilizzate per annotare, cioè aggiungere informazioni complementari, in maniera uniforme le banche dati. Possono essere infine utilizzate per connotare i campi informativi dei database per precisarne il senso e il contenuto.

Alcune ontologie biologiche sono ormai molto note e utilizzate. La Gene Ontology (GO) (8) definisce in dettaglio i geni e la loro produzione sulla base di tre caratterizzazioni ortogonali: quella cellulare che indica il luogo fisico dove può svolgersi l'azione descritta, quella del processo biologico al quale prende parte l'azione, e quella della specifica funzione molecolare svolta. Molte ontologie biologiche sono sviluppate nell'ambito di una iniziativa collaborativa, la Open Biological and Biomedical Ontologies Foundry⁸ (9), per lo sviluppo di ontologie interoperanti in grado di coprire il più ampio campo di applicazioni possibile.

Questo sforzo di integrazione semantica si avvale anche di alcune tecnologie legate a una nuova visione della rete Internet, il Semantic Web. Berners-Lee et al. (10) hanno dato questa definizione del Semantic Web: "The Semantic Web is not a separate Web, but an extension of the current one, in which information is given well-defined meaning, better enabling computers and people to work in cooperation". Alla base del Semantic Web stanno alcune tecnologie definite dal World-Wide-Web Consortium (W3C), l'ente che presiede da sempre agli sviluppi tecnologici della rete Internet.

La tecnologia base per la rappresentazione dei dati è il Resource Description Framework (RDF)⁹ che, concettualmente, può essere fatto derivare dalla definizione di entità e relazioni tra di esse che è tipico del database relazionale. In una tabella relazionale, le colonne definiscono le proprietà di una certa entità, mentre le righe ne definiscono gli elementi reali (soggetti). Le singole celle corrispondono al valore di una proprietà per un dato soggetto. In RDF, questi tre elementi sono collegati tra loro da una 'tripla' formata da soggetto, proprietà e valore. Le triple così composte costituiscono la struttura chiave per definire tutti i dati disponibili e l'insieme delle triple costituisce l'archivio RDF.

La caratterizzazione RDF dei dati prescinde dal formato utilizzato per rappresentarli. Per poterli gestire, però, è necessario strutturarli secondo un formato definito. Questa procedura è detta serializzazione. I formati più utilizzati sono l'XML, rigoroso, e N3 o turtle, facile da scrivere e leggere. Per l'archiviazione dei dati RDF sono stati sviluppati software specifici, denominati triple store, che consentono una gestione efficace delle triple per quanto riguarda sia lo spazio occupato, sia i tempi di accesso e ricerca.

⁸<http://www.obofoundry.org/>

⁹<http://www.w3.org/RDF/>

Nella visione RDF, all'interno di una tripla il soggetto e la proprietà devono essere resi universali, cioè condivisi da tutti gli utenti della rete, mentre il valore associato mantiene la sua caratteristica di dato e va esplicitato come tale. A soggetto e proprietà vanno quindi assegnati indirizzi univoci, tramite un Uniform Resource Identifier (URI), in maniera che la loro definizione sia anch'essa univoca. Ai soggetti verranno fatti corrispondere dei concetti, alle proprietà dei tipi di relazione. Tipicamente, gli URI corrispondono a elementi di ontologie. OWL (Ontology Web Language) definisce lo standard W3C per la rappresentazione di ontologie. L'altra tecnologia fondamentale per il Semantic Web è quella che consente di effettuare ricerche negli archivi RDF. SPARQL (SPARQL Protocol and RDF Query Language)¹⁰ è l'equivalente per gli archivi RDF di SQL (Structured Query Language), il linguaggio d'interrogazione per database relazionali. La principale differenza consiste nel fatto che l'interrogazione SPARQL non fa riferimento a nessun dato di struttura del sistema interrogato, come il nome delle tabelle o dei singoli campi, ma alle relazioni e agli URI che, per natura, devono essere universali. In sostanza, quindi, SPARQL prescinde dalla conoscenza della struttura dati e rende facilmente accessibili anche archivi dei quali non si conoscono queste informazioni, purché, ovviamente, la strutturazione RDF dei dati sia stata fatta in maniera adeguata, adottando gli standard e le ontologie comuni del dominio. Un'altra grande differenza delle interrogazioni in ambiente Semantic Web rispetto a quelle tradizionali è che il Semantic Web è per sua natura un 'open world', un ambiente, cioè, dove si sa che non tutti i dati sono disponibili. La conseguenza di questa assunzione è che i risultati di una ricerca non possono essere conclusivi e, in particolare, che se un particolare dato non viene trovato questo non significa che non esista.

Le potenzialità insite in queste tecnologie sono molto promettenti e non è un caso che esistano già molte implementazioni RDF pronte per il Semantic Web. Vanno in particolare evidenziati due sistemi, il ben noto database UniProtKB e il sistema Bio2RDF. UniProtKB è integralmente basato su RDF. Tutti i collegamenti esterni, diretti verso più di 120 database, sono strutturati come URI, utilizzando uno schema specifico uniforme basato su PURL (Persistent Uniform Resource Locator) e quindi in grado di stabilire un link costantemente aggiornato e corretto alle risorse coinvolte. Inoltre, il database è monitorato utilizzando appositi 'reasoner', cioè software in grado di validare la correttezza di una base di dati RDF evidenziando eventuali incongruenze, e di inferire nuove triple, esplicitando così nuove relazioni (Figura 3).

Bio2RDF, sviluppato dalla University of Laval, Canada, si pone l'obiettivo di fornire l'accesso integrato al maggior numero possibile di database bioinformatici utilizzando le tecnologie RDF per l'archiviazione dei dati e SPARQL per la ricerca (11). A questo scopo, molti database bioinformatici sono stati convertiti in un formato RDF uniforme. I principali risultati conseguiti sono un'interfaccia unica¹¹, un'ontologia condivisa, alcuni RDFizer (script per convertire i database

¹⁰<http://www.w3.org/TR/rdf-sparql-query/>

¹¹<http://bio2rdf.org/>

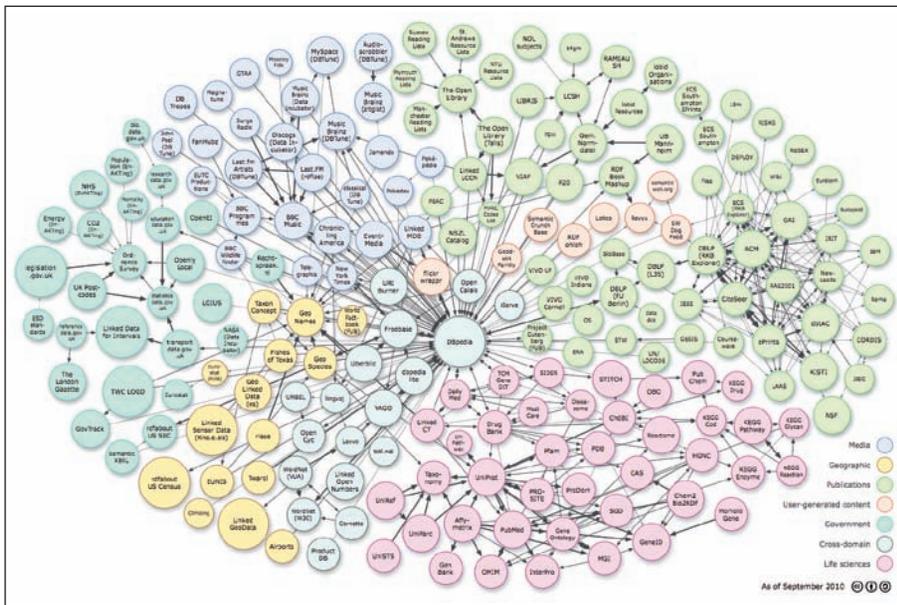


Fig. 3 - Linking Open Data cloud diagram, by Richard Cyganiak and Anja Jentzsch.
Source <http://lod-cloud.net/>

in RDF) e una proposta di schema URI uniforme per superare le disomogeneità nella loro definizione. La lista dei database inclusi in questo sforzo è troppo lunga per essere inclusa in questo contributo. Basti sapere che sono compresi tutti i maggiori database genomici, proteomici, molecolari, di reti, tassonomici, e anche alcuni clinici, come OMIM, bibliografici, come Medline, e le principali ontologie biologiche.

Il Semantic Web è anche stato definito “Web of Data”. Si tratta quindi di un web basato sui dati dove ogni indirizzo corrisponde a un dato. Questo si contrappone al web attuale basato sui documenti. Questa visione ha dato origine alla tecnologia “Linked Open Data” (LOD). L’obiettivo del LOD è la pubblicazione on-line di dati pubblici interconnessi e gestiti tramite le tecnologie del Semantic Web, principalmente RDF, OWL, e SPARQL. Nel momento in cui i maggiori database biomedici avranno un’interfaccia LOD, sarà possibile integrare in maniera completamente trasparente i loro contenuti. Allo stato attuale, grazie soprattutto alle iniziative appena descritte, i dati biologici costituiscono una parte importante dei dati disponibili tramite LOD. In figura 3 è presentato il diagramma del Linked Open Data.

L’integrazione della conoscenza: wiki biologici

I siti wiki sono uno strumento di lavoro collaborativo in grado di stimolare gli utenti della rete a collaborare per la realizzazione di un insieme di documenti in comune, da un semplice testo, a un ipertesto, sino a una vera base di conoscenza

enciclopedica. Alcuni sistemi ben noti, come ad esempio Wikipedia¹², hanno concretamente dimostrato questa potenzialità. Anche in biologia i sistemi wiki possono contribuire offrendo specifici e concreti vantaggi per la gestione dei dati e delle informazioni e per la loro integrazione. Ad esempio, per lo sviluppo di una conoscenza condivisa in rete su un tema specifico, per l'annotazione collaborativa dei contenuti di database biologici e anche per la creazione di nuovi database. In effetti, l'interesse e la competenza su argomenti scientifici specifici sono spesso distribuiti tra più gruppi di ricerca, geograficamente anche molto lontani tra loro e quasi mai si trovano concentrati in un unico Istituto o gruppo di ricerca. Questo effetto si nota tanto più quando l'argomento è specifico e specialistico. Lo sviluppo collaborativo di documentazione e conoscenza consente quindi a comunità disperse di ricercatori di proporre, commentare, discutere, e raggiungere un consenso su procedure, dati, esperienze e altre informazioni specialistiche che sono messe a disposizione in maniera molto semplice di tutti i ricercatori e le persone interessate.

L'annotazione collaborativa delle informazioni contenute nei database biologici desta sempre maggiore interesse perché, a causa della dimensione attuale delle informazioni, il processo di annotazione è estremamente oneroso, sia in termini economici, che di tempo. L'annotazione dei contenuti dei database che può essere effettuata da larghe comunità di ricercatori, in maniera indipendente dall'organizzazione che gestisce il database stesso, che contribuiscono sulla base della loro esperienza e competenza settoriale, va molto al di là di quanto potrebbe fare un gruppo ristretto di annotatori professionisti. In questo contesto, sebbene i contenuti del database siano annotati collaborativamente, i contenuti stessi non sono modificati.

Lo sviluppo collaborativo di nuovi database da parte di una comunità scientifica specialistica può definire in tempi molto rapidi le strutture dati adeguate a descrivere le informazioni relative ad domini scientifici emergenti, colmando così una grossa lacuna tra le discussioni preliminari che normalmente si sviluppano tramite forum o liste di discussione e la realizzazione di database assestati che richiedono tempi di realizzazione più lunghi. Inserendosi tempestivamente nel momento in cui il nuovo dominio informativo si forma e definisce, queste forme di collaborazione consentono anche di limitare la tendenza a sviluppare numerosi sistemi informativi indipendenti che, successivamente, devono essere poi riconciliati.

Attualmente, sono stati sviluppati wiki destinati a diversi ambiti di ricerca biologica¹³. Molti di questi sistemi sono stati presentati al workshop NETTAB/BBCC 2011 su 'Biological Wikis' (12). Alcuni di questi saranno brevemente illustrati in seguito.

I sistemi basati su wiki sono quindi destinati a svolgere un ruolo importante nella gestione e integrazione delle informazioni biomediche. Prima che questo avven-

¹²<http://en.wikipedia.org/>

¹³Una lista di wiki attivi è disponibile alla URL http://www.bioinformatics.org/wiki/BioWiki#tab=BioWiki_Table

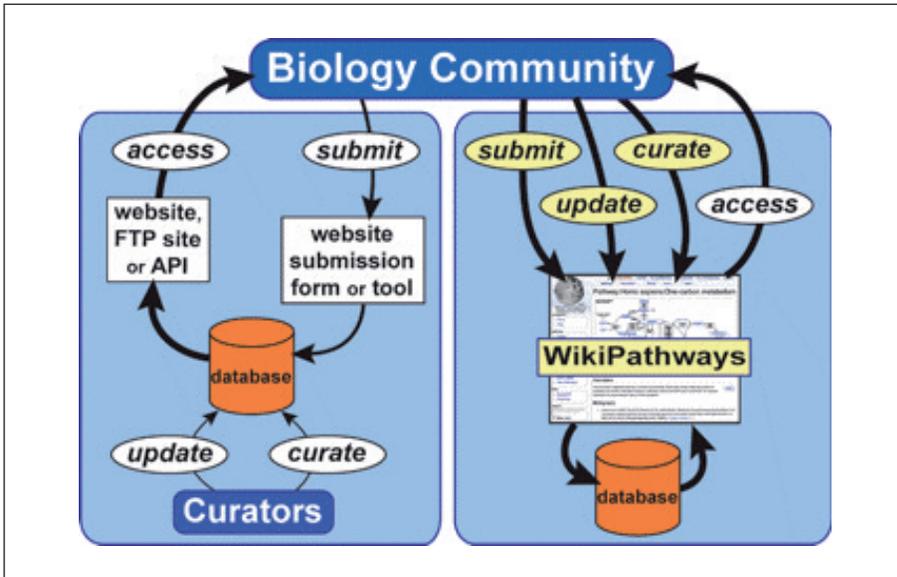


Fig. 4 - Confronto tra processi di annotazione in un database e in un sistema wiki.
Source: Pico et al., PLoS Biology 2008 (16).

ga, vanno però affrontati e risolti molti aspetti peculiari di questo ambito e fondamentali per il successo dei wiki.

La qualità dei contributi, intesa come correttezza e appropriatezza scientifica delle informazioni, è ovviamente un aspetto fondamentale. È necessario trovare delle modalità attraverso le quali questa possa essere controllata sin dall'inizio e costantemente verificata. Un secondo aspetto molto importante riguarda il formato attraverso i quali i contributi devono essere sottomessi dai ricercatori, anche alla luce della necessità che questi possano successivamente essere inseriti nei database da annotare. Sono quindi necessarie delle procedure che consentano di valutare la qualità dei contributi degli utenti, estrarre dati, possibilmente strutturati, dalle annotazioni e introdurre i dati originali nel database opportuno.

L'autorevolezza degli autori è essenziale per valutare la qualità dei contributi. Quando questi sono introdotti da utenti non noti o sporadici, la qualità dell'informazione sottomessa non è normalmente considerata adeguata in confronto a quella che può essere fornita da annotatori professionisti. D'altronde, sistemi come Wikipedia si basano su contributi di questo tipo.

È necessario comprendere se questo approccio può essere considerato valido anche nell'ambito della biologia o se è necessario identificare alternative. D'altronde, la ricerca si è da tempo organizzata intorno al concetto del peer-review per valutare la qualità dei contributi. Ci si può domandare se questo approccio possa essere adottato anche per i sistemi wiki, e quindi se sia possibile affidare a un sistema di peer-review l'analisi dei contributi in wiki biologici e quanto questo sia concretamente gestibile.

Va sottolineato che la qualità dei contributi e la partecipazione di ricercatori qualificati è stimolata dalle riviste scientifiche tramite la loro immagine e alcuni fattori di qualità, quali il fatto che sia indicizzata da molti indici bibliografici e abbia un, possibilmente elevato, Impact Factor (IF). Analogamente, i sistemi wiki devono creare dei meccanismi che stimolino la partecipazione da parte di ricercatori qualificati. Tra questi, vanno considerati il riconoscimento della proprietà del contributo scientifico sottomesso, in maniera che il contributo dei singoli non venga disperso in un contesto indistinto e gli autori dei migliori contributi possano avere un riconoscimento formale.

È opportuno valutare le specificità delle informazioni biologiche e dei formati relativi. L'informazione testuale è infatti solo una piccola parte dei dati biologici, mentre in questo contesto prevalgono immagini, diagrammi, plot. È quindi necessario trovare forme adatte a gestire (sottomettere, archiviare, collegare tra loro e con altri dati, visualizzare) queste informazioni.

Infine, non va dimenticata l'importanza di consentire il collegamento tra i wiki biologici. Appare infatti evidente che, anche se i wiki biologici sono destinati a occuparsi di interessi specifici e specialistici, molte delle informazioni che essi potranno contenere saranno di interesse generale e potranno essere utilmente trasferite ad altri wiki. Inoltre, dovranno essere evitate sovrapposizioni e stimolata la possibilità di trasferire dati tra wiki.

Gene Wiki (13, 14)¹⁴ è stato realizzato nell'ottica di razionalizzare i contributi relativi ai geni e presenti in Wikipedia, del quale costituisce una sezione specializzata. Questa scelta consente di sfruttare la popolarità di Wikipedia e la relativa facilità di reperirne i contenuti tramite Google. L'obiettivo di Gene Wiki è quello di fornire un testo di qualità elevata per ogni gene umano. Si compone di più di 9,000 pagine che sono state costruite con il contributo di una larga base di utenti. È stato calcolato che l'86% delle pagine di Gene Wiki appare nella prima pagina dei risultati di una ricerca su Google del rispettivo simbolo di gene.

WikiGenes (15)¹⁵ è un sistema wiki concepito per lo sviluppo collaborativo di articoli scientifici che tiene in dovuto conto, e valorizza, il contributo dei singoli ricercatori. In ciascun testo, ogni contributo, non importa quanto grande o significativo, viene collegato al suo autore. Inoltre, a ciascun autore è associata una pagina che elenca le sue competenze, pubblicazioni e, appunto, contributi a WikiGenes. Gli autori possono quindi essere valutati dai colleghi nell'ottica del peer-review. WikiGenes include anche una funzione che consente di aggiungere annotazioni e link a vari siti web, compresi PubChem dell'NCBI per i composti chimici, NCBI Gene, Uniprot e altri per i geni, Pubmed per gli articoli scientifici.

WikiPathways (16)¹⁶ è un sistema collaborativo complementare ad alcuni dei principali database di pathway metabolici (KEGG, Reactome, Pathway Commons). La comunità allargata dei ricercatori può svolgere compiti di manutenzione, annotazione e peer-review sui pathway archiviati. I gestori dei database

¹⁴http://en.wikipedia.org/wiki/Gene_Wiki ; http://en.wikipedia.org/wiki/Portal:Gene_Wiki

¹⁵<http://www.wikigenes.org/>

¹⁶<http://www.wikipathways.org/>

possono trarre vantaggio da queste annotazioni ed eventualmente aggiornare o correggere i propri database. WikiPathways include una pagina per ogni pathway comprendente il suo diagramma, una descrizione, i riferimenti bibliografici, i suoi componenti e la cronistoria degli aggiornamenti. WikiPathways include anche un editor grafico per modificare il diagramma. La ricerca dei pathway può essere svolta per nome dei componenti e a testo libero nelle descrizioni e nelle annotazioni. È anche possibile la navigazione per specie e per categoria ontologica. I pathway possono anche essere scaricati in vari formati standard.

WikiProteins (17)¹⁷ adotta un approccio differente che si basa sul “Concept Web”. Milioni di ‘concetti’ biomedici sono stati estratti da vari database e tesauri di riferimento, compresi UMLS, UniProtKB, IntAct, Gene Ontology. Questi concetti e le relazioni tra di essi sono stati archiviati utilizzando una tecnologia, definita ‘knowlet’ (unità minima di conoscenza). L’insieme dei knowlet costituisce il ‘concept space’ o spazio concettuale. Lo spazio concettuale può essere mostrato a diversi livelli utilizzando dei filtri basati su concetti semantici o stringenza delle relazioni. Il concept space può anche essere convertito in RDF e quindi ricercato utilizzando SPARQL.

WikiProteins comprende quindi una pagina per ciascun concetto del Concept Web. In questa pagina sono presentati tutti i dati ad esso collegati, derivandoli dal ‘concept space’. Tutti i concetti presenti nella pagina sono evidenziati. Le relazioni esistenti tra concetti sono alla base anche dei collegamenti tra pagine del wiki e ne consentono quindi la navigazione. Agli utenti registrati è consentito modificare le pagine wiki: le modifiche sono valutate dai gestori del sistema e possono essere incorporate nel ‘concept space’.

Bibliografia

1. The 1000 Genomes Consortium. A map of human genome variation from population scale sequencing. *Nature*. 2010; 467 (7319): 1061-1073.
2. Galperin MY, Cochrane GR. The 2011 nucleic acids research database issue and the online molecular biology database collection. *Nucleic Acids Research* 2011; 39 (Database Issue): D1-D6.
3. Romano P. Automation of in-silico data analysis processes through workflow management systems, *Briefings in bioinformatics*. 2008; 9 (1): 57-68.
4. Hull D, Wolstencroft K, Stevens R, Goble C, Pocock M, Li P, Oinn T. Taverna. a tool for building and running workflows of services. *Nucleic Acids Research* 2006; 34 (Web Server issue), W729-W732.
5. Bhagat J, Tanoh F, Nzuobontane E, Laurent T, Orlowski J, Roos M, Wolstencroft K, Aleksejevs S, Stevens R, Pettifer S, Lopez R, Goble CA. BioCatalogue: a universal catalogue of web services for the life sciences. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38 (Web Server issue): W689-W694.

¹⁷<http://www.wikiprofessional.org/>

6. Goble CA, Bhagat J, Aleksejevs S, Cruickshank D, Michaelides D, Newman D, Borkum M, Bechhofer S, Roos M, Li P, De Roure D. myExperiment: a repository and social network for the sharing of bioinformatics workflows. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38 (Web Server issue): W677-W682.
7. Romano P, Bartocci E, Bertolini G, De Paoli F, Marra D, Mauri G, Merelli E, Milanese L. Biowep: a workflow enactment portal for bioinformatics applications. *BMC Bioinformatics.* 2007; 8 (Suppl 1): S19.
8. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000; 25 (1): 25-9.
9. Smith B, Ashburner M, Rosse C, Bard J, Bug W, Ceusters W, Goldberg LJ, Eilbeck K, Ireland A, Mungall CJ, The OBI Consortium, Leontis N, Rocca-Serra P, Ruttenberg A, Sansone S-A, Scheuermann RH, Shah N, Whetzel PL, Lewis S. The OBO Foundry: coordinated evolution of ontologies to support biomedical data integration. *Nature Biotechnology.* 2007; 25: 1251-1255.
10. Berners-Lee T, Hendler J, Lassila O. The Semantic Web. *Scientific American Magazine*, May 1, 2001.
11. Belleau F, Nolin M-A, Tourigny N, Rigault P, Morissette J. Bio2RDF: towards a mashup to build bioinformatics knowledge systems. *Journal of Biomedical Informatics.* 2008; 41 (5): 706-716.
12. Facchiano A, Romano P, eds., *Network Tools and Applications in Biology NETTAB-BBCC 2010 Biological Wikis*, November 29 - December 1, 2010, Napoli, Italy. Aracne editrice S.r.l., Roma, Italy, November 2010. ISBN 978-88-548-3658-7. Online bookshop: <http://store.aracneeditrice.com/it/index.php>
13. Huss JW, Lindenbaum P, Martone M, Roberts D, Pizarro A, Valafar F, Hogenesch JB, Su AI. The gene Wiki: community intelligence applied to human gene annotation. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38 (Database issue): D633-639.
14. Huss JW III, Orozco C, Goodale J, Wu C, Batalov S, et al. A gene Wiki for community annotation of gene function. *PLoS Biol.* 2008; 6 (7): e175.
15. Hoffmann R. A wiki for the life sciences where authorship matters. *Nature Genetics.* 2008; 40: 1047-1051.
16. Pico AR, Kelder T, van Iersel MP, Hanspers K, Conklin BR, Evelo C. WikiPathways: pathway editing for the people. *PLoS Biology* 6 (7): e184.
17. Mons B, Ashburner M, Chichester C, van Mulligen E, Weeber M, den Dunnen J, van Ommen G-J, Musen M, Cockerill M, Hermjakob H, Mons A, Packer A, Pacheco R, Lewis S, Berkeley A, Melton W, Barris N, Wales J, Meijssen G, Moeller E, Roes PJ, Borner K, Bairoch A. Calling on a million minds for community annotation in WikiProteins. *Genome Biology.* 2008; 9: R89.

Knowledge-based data analysis and information retrieval

Blaž Zupan

Faculty of Computer and Information Science, University of Ljubljana, Slovenia

Introduction

Many of the recent advances in computer science were sparked by and complemented the revolution we are witnessing in biomedical research. New high-throughput biomedical technologies, such as DNA sequencing, cDNA and oligonucleotide microarrays for gene expression studies, protein microarrays and platforms for high-throughput mutant studies, to name a few, all require substantial investments in IT infrastructure, and development of dedicated servers and elaborate web-based access interfaces.

Many of the largest open-access repositories on the web serve biomedical community and are maintained by large organizations such as European Bioinformatics Institute in Europe and National Center for Biotechnology Information in the U.S. Free availability of data from these large repositories have sparked the research in many areas of computer science, and most profoundly in the area of development of information infrastructures, data mining, visualization, formal methods for organization of knowledge (e.g., ontologies) and its inference from available experimental data.

Interestingly, the field of data mining, methods of which are essential when trying to answer the question of what to do with all these repositories of data and knowledge, first concentrated on treatment of experimental data of a single type. Much of the data mining research in the past 10 years was focused on dealing with the curse of dimensionality problem in microarray data analysis. It took us a while to find that while clustering, feature selection, principal component analysis and other dimensionality reduction techniques may help (1), what is really needed for inference of robust hypothesis and prediction models is integration with other data and knowledge resources.

In microarray data analysis, early attempts in this area came from Bayesian integration of hypothesis coming from different modeling techniques. This was soon upgraded with approaches that attempt to integrate different knowledge sources within the same model (2). Interestingly, today the prevailing approach for genome-wide microarray data analysis is not clustering or some other machine learning technique, but a gene set enrichment that uses the knowledge on sup-

posedly jointly regulated or expressed genes from pathway and gene annotation data bases to cope with intrinsically noisy data and deal with thousands of features in the space with considerably, orders-of-magnitudes fewer experimental samples.

By and large, it is the advancement in biomedicine that is pushing today's data mining from approaches that deal with spreadsheets and data matrices to approaches that try to integrate available data and knowledge sources in order to increase robustness, deal with noise, and provide information-rich hypothesis to experimental scientists. It is the biomedicine that is transforming the area from pure number-crunching to a science of knowledge-based analysis and integration (3-5).

Integration of knowledge and data is not new to computer science. In fact, principal ideas in this area were crafted when computer engineering and informatics was at its infancy. Then, artificial intelligence aimed at constructing systems that would store the available information (knowledge) on a particular domain, interact with experts to gain new knowledge and data, propose a hypothesis based on the data provided, and correct or improve itself once given the feedback.

While the area of expert systems - computer platforms that were supposed to implement all these functions - is seemingly over, this is exactly where the current field of bioinformatics is heading. The ground is now, though, very much different than in the 1970s and 80s. Then, the data acquisition included a painful process of gathering and retyping some written notes to a computer-stored table. Knowledge was supposed to be obtained from domain experts (so called knowledge-acquisition), but with often unclear immediate goals and much reluctance of the experts the failure of the whole endeavor became known as a Feigenbaum's bottleneck. Today, most of essential data resources for bioinformaticians are freely and electronically available. Protocols, such as NCBI's e-utils, are already crafted to make programmatic access to information in these repositories as easy as possible. And as for knowledge, the community has a wide range of initiatives to organize various aspects of current body of biomedical knowledge within systematical frameworks, most often represented as ontologies (see, for instance, the Open Biomedical Ontologies web site at <http://www.obofoundry.org> currently listing over 60 projects of this kind). At the most "unstructured" end of the spectrum is a repository of biomedical abstracts and papers, but even for these research in text mining has found means to organize and extract the information from (6). Even for such seemingly unstructured repositories the community strives to provide a structure: PubMed reference data base, for one, indexes every paper with a set of terms from MeSH ontology (<http://www.nlm.nih.gov/mesh>), allowing computer scientists and text miners to additionally rely on curated document labels.

Challenges

Openly available data and knowledge repositories in biomedicine and bioinformatics are today readily available to be used in current research. This is to say that

computer science, as a field, is now expected to craft methods that would jointly use these resources to support experimentalists and biomedical researchers. The principal challenges in this area are:

- How to craft the methods that would complement one's own biomedical research and experimental data to gain both in predictive power and interpretability of *in silico* generated hypothesis?
- How to selectively use the heterogeneous resources available for a given problem? Data and knowledge integration should be about integration of information that is most relevant to the given problem.
- How to communicate the results of data and knowledge analysis in an interpretable way?
- How to use one's own data and available information sources for experiment planning?
- How to craft software tools that are both elaborate in trying to address most of the issues above, flexible (easily extendable once new types of problems emerge), and easy to use, both for a bioinformatician and a domain expert?

Current approaches

Precursors to the emergence of knowledge-base data analysis in bioinformatics are quite abundant. Even in the earliest analysis of gene expression data the results of clustering were annotated with functional labels of already characterized genes (7). This, rather manual approach, was later superseded with gene set enrichment analysis techniques (8), a principal tool in the hands of biologists to report on common features for a selected set of genes or proteins. The approach, of course, relies on the existing library of gene sets most commonly derived from pathway repositories such as KEGG or annotation sources such as GO.

A central idea behind gene set enrichment analysis is that functionally related genes are known to be co-expressed. Under the assumption of similar expression, the explorative data analysis can instead of differential expression of a single-gene report on coordinated expression change of genes within some predefined gene set. The results of the gene-set based analysis are expected to be more robust, as they rely on observation of a group of genes where noise in some of the measurements should be canceled-out when considering a group as a whole. To this end, various gene set analysis methods have been developed (9). Because the analysis reports on set of genes where a significant number of genes within the set have expression that is characteristic for a target phenotype, the methods are often also referred to as gene set enrichment analysis. Gene set enrichment analysis results from different studies of the same cancer types were:

- 1) reportedly found to be consistent, thus proving the robustness of the approach;
- 2) highly interpretable, as researchers being able to well relate the identified gene sets with pathways of interest.

Enrichment analysis is a technique that can be easily extended and used in integrative, knowledge-based bioinformatics.

While clustering provides the means to organize the data for further exploration,

the predictive modeling is a domain of supervised data mining. The simplest tasks these tools address were in the past decade exemplified in tumor type prediction and analysis of cancer disease progression (10). Data instances (cases) described through genome-wide gene expression data were additionally labeled with the class values, e.g. tumor type, and the task was to infer the model that, given the expression data from an uncharacterized sample, predicts the class. In the earliest application of supervised data mining this additional information on sample's class was referred to as knowledge-based analysis (11), perhaps particularly to distinguish it from clustering where the class labels were not considered when developing the model.

Consideration of gene or sample labels is probably the simplest utility of knowledge in the data analysis processes. Biological processes are, by their nature, complex and it is unlikely we would infer them from a single data source. Therefore, we could either stem our analysis from existing knowledge of the structure and components of the model, or integrate results of the analysis of various different data sets that could either provide gains in robustness through increased number of experiments or reveal parts of the models from different perspective. While this classification of knowledge-based approaches looks crisp, in practice, the current approaches employ various combinations of these techniques.

For instance, the data-knowledge integration can be very specific, directing the construction towards identification of particular set of interactions. Approaches for the reconstruction of gene regulation networks from gene expression data can substantially gain from inclusion of information on transcription factor binding (12), the later being considered as background knowledge. On the other hand, there are many current approaches that associate genes using whatever data and information is available. Excellent examples of toolboxes that implement such methods are bioPixie (2) and GeneMania (13), which both use a common representation mechanism, a gene network, to display gene associations that are either derived from the data (e.g., gene coexpression), gene interaction experiments (e.g., information on synthetic lethality of double mutants (14)), protein-protein interactions, and any other sources.

In principle, a branch of knowledge-based data analysis is also model and data integration. Model integration is achieved through inference of models from the same data set but through the utility of different modeling techniques, or even using the same technique but run with different parameter sets. Consensus clustering, ensembling of classifiers, or even blending of recommendation systems are examples of such approaches. The caveat of these approaches is that they blur the relation between the inferred model components and the data. In biomedicine, it is essential to know which experiments and why led to formation of a hypothesis, and while model blending may provide gains in accuracy, it may not be the approach of choice when trying to understand the underlying mechanisms of the system under study. Another means of integrative data analysis derives models from different data sets, and then integrates them into a common system (15). This is very much like the assembly of gene associations in gene networks, but it could, in principle, be used for other applications and prediction systems as well.

Future directions

At present, biomedical data analysis is already a science of knowledge and data integration (4). Approaches range from very specific, where a particular knowledge base is hand-picked to best complement the target experimental data set, to very broad where every possible piece of information is blended under some common representation framework. We have yet to see how machines and algorithms can help us in selection and integration of only the most informative sources. We have to integrate them so that the users, biomedical scientists, can clearly see how different pieces have been put together and why. Present approaches probably have too strong focus on accuracy, often disregarding understanding, the much desired or perhaps even central quality of the useful models in biomedicine. Current association-based approaches that overall perform well within *in silico* testing have most likely uncovered only the “low-hanging-fruit” (4). Next stages in biomedical data analytics would need to be more specific and better guided. A means from this guidance should come from existing knowledge.

References

1. Toh H, Horimoto K. Inference of a genetic network by a combined approach of cluster analysis and graphical Gaussian modeling. *Bioinformatics*. 2002; 18: 287-297.
2. Myers CL, Robson D, Wible A, et al. Discovery of biological networks from diverse functional genomic data. *Genome Biol*. 2005; 6: R114.
3. Butte AJ. Translational bioinformatics: coming of age. *J Am Med Inform Assoc*. 2008; 15: 709-714.
4. Ochs MF. Knowledge-based data analysis comes of age. *Brief Bioinform*. 2010; 11: 30-39.
5. Bellazzi R, Zupan B. Towards knowledge-based gene expression data mining. *J Biomed Inform*. 2007; 40: 787-802.
6. Feldman, Sanger. *The text mining handbook: advanced approaches in analyzing unstructured data*. Cambridge; New York: Cambridge University Press; 2007.
7. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 14863-14868.
8. Nam D, Kim SY. Gene-set approach for expression pattern analysis. *Brief Bioinform*. 2008; 9: 189-197.
9. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 15545-15550.
10. Simon R, Radmacher MD, Dobbin K, McShane LM. Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95: 14-18.

11. Brown MP, Grundy WN, Lin D, et al. Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 262-267.
12. Lee TI, Rinaldi NJ, Robert F, et al. Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 2002; 298: 799-804.
13. Mostafavi S, Ray D, Warde-Farley D, Grouios C, Morris Q. GeneMANIA: a real-time multiple association network integration algorithm for predicting gene function. *Genome Biol*. 2008; 9 (Suppl 1): S4.
14. Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, et al. The genetic landscape of a cell. *Science*. 2010; 327: 425-431.
15. Myers CL, Chiriac C, Troyanskaya OG. Discovering biological networks from diverse functional genomic data. *Methods Mol Biol*. 2009; 563: 157-175.

Il progetto ONCO-i2b2: integrazione di biobanche e dati clinici a supporto della ricerca traslazionale in oncologia

Riccardo Bellazzi^{1,2}, Daniele Segagni¹, Valentina Tibollo¹, Arianna Dagliati³, Leonardo Perinati¹, Alberto Zambelli¹, Silvia Priori¹

¹IRCCS Fondazione S. Maugeri, Pavia;

²Dipartimento di Informatica e Sistemistica, Università di Pavia;

³Istituto Universitario di Studi Superiori, Pavia

Onco-i2b2 è un progetto finanziato dalla Regione Lombardia, che mira a sostenere la ricerca traslazionale in oncologia. Il progetto sfrutta le soluzioni software realizzate dal centro di ricerca “Integrating Biology and the Bedside (i2b2)”, un’iniziativa finanziata dal NIH Roadmap National Centers for Biomedical Computing e guidata dal Partners Health Care Center di Boston (1). Il progetto i2b2 ha sviluppato un data warehouse e una serie di soluzioni software che si basano su un’architettura chiamata “alveare”. L’alveare ha diverse “celle” software dedicate all’estrazione, la manipolazione o all’analisi dei dati (2). Il software è stato sviluppato in Java e sfrutta i web services per la comunicazione tra le celle.

Nell’ambito del progetto Onco-i2b2, l’Università di Pavia e l’IRCCS Fondazione S. Maugeri (FSM) di Pavia hanno integrato l’infrastruttura di i2b2 con il sistema informativo ospedaliero (SIO) della FSM e con una biobanca oncologica che gestisce sia plasma sia tessuti. L’integrazione con il SIO fornisce l’accesso a tutte le cartelle cliniche elettroniche dei pazienti oncologici. La maggior parte dei dati raccolti nel SIO della FSM è rappresentata da dati in formato testuale. È stato quindi necessario sviluppare e integrare all’interno dell’architettura software un modulo di Natural Language Processing (NLP) che fosse in grado di estrarre le informazioni più importanti e i risultati di test clinici, quali i referti istologici dei pazienti (3). Ogni campione presente in biobanca è stato ottenuto tramite il consenso informato sia di soggetti sani sia di pazienti oncologici.

Lo scopo di questo lavoro è descrivere i passaggi fondamentali del processo di integrazione, e presentare lo stato attuale del progetto Onco-i2b2.

Metodi

Il software Onco-i2b2, implementato presso l’ospedale FSM, è stato progettato per integrare i dati da fonti diverse e raccolti per scopi diversi, al fine di permettere ai ricercatori di interrogare e analizzare coerentemente la grande quantità di

informazioni provenienti dalla pratica clinica. Le principali fonti che sono state integrate nel data warehouse di i2b2 sono: l'unità di anatomia patologica, la biobanca e il SIO. Nel seguito verranno descritti i dettagli del processo di integrazione.

L'unità di anatomia patologica della FSM e la Biobanca

I dati associati ai campioni stoccati all'interno della biobanca sono memorizzati in modo semi-automatico in un'apposita banca dati, grazie ad una procedura che trasferisce le informazioni nella base dati direttamente dal software di gestione dell'unità di anatomia patologica della FSM. Grazie a questa procedura viene diminuito il tempo di inserimento e ridotta la possibilità di errore umano. Ogni campione della biobanca è anonimizzato grazie alla creazione di un codice a barre bidimensionale, che non include alcun riferimento diretto al paziente donatore. I tessuti o i campioni plasmatici sono selezionati dai ricercatori e posti in nuove provette etichettate con il nuovo codice a barre. Gli utenti autorizzati possono recuperare le informazioni relative ai donatori attraverso uno speciale software che mostra anche le informazioni relative al consenso informato del paziente.

Il database biobanca è sincronizzato periodicamente (più volte durante il giorno) al fine di mantenere le informazioni sui campioni costantemente aggiornate. La tabella 1 mostra il numero di pazienti e di campioni biologici che sono attualmente disponibili nella biobanca, divisi per tipo e reparto in cui il campione è stato raccolto.

Le informazioni sui campioni biologici contenute nella biobanca vengono successivamente trasferite nel data warehouse di i2b2 mediante una serie di operazioni di ETL (acronimo di Extract, Transform, Load) che coinvolgono l'estrazione dei dati, la loro elaborazione e la creazione delle corrispondenze necessarie alla rappresentazione dei dati in i2b2 (4). Le attività di ETL vengono effettuate grazie al software KETTLE (5) sviluppato nell'ambito del progetto Pentaho (6).

Il Sistema Informativo Ospedaliero della FSM

Analogamente a quanto realizzato per la biobanca, anche le informazioni raccolte nel SIO della FSM sono integrate nel data warehouse di i2b2 mediante un processo ETL, che trasforma le informazioni di interesse, in modo da consentirne un rapido recupero da parte dei ricercatori. Per effettuare questa operazione è necessario definire un'ontologia, ovvero un vocabolario di concetti con cui interrogare il data warehouse. Alcuni dei concetti di maggiore interesse sono contenuti nei referti di anatomia patologica, che vengono però registrati in formato testuale.

Tab. 1 - I campioni raccolti nella biobanca divisi per reparto di raccolta e tipologia. I dati sono relativi al periodo 1/12/2009 - 15/01/2011.

Reparto	Pazienti	Tessuti	Plasma
Senologia	237	729	729
Chirurgia	75	567	243
TOTALE	312	1296	972

È stato pertanto realizzato un modulo software di Natural Language Processing che ha lo scopo di estrarre le informazioni di interesse dal SIO della FSM per ciascun paziente oncologico che abbia almeno un campione biologico stoccato nella biobanca. Il modulo di NLP è stato opportunamente configurato, in modo da analizzare testi scritti in italiano e i concetti medici relativi all'ontologia di interesse. In particolare, dato che i report testuali contengono informazioni sui codici SNO-MED dei campioni, così come informazioni numeriche riguardanti il campione stesso, il modulo NLP, basato sul software GATE (7), è stato configurato per recuperare informazioni in modo efficiente ed affidabile su questo insieme limitato di concetti. Il software è stato validato internamente dai medici coinvolti nello studio su un sotto-insieme di 100 casi, con un'accuratezza del 100%.

Il sistema integrato: i2b2

Il data warehouse i2b2, chiamato Clinical Research Chart (CRC), è progettato per gestire dati di clinical trials, cartelle cliniche elettroniche, dati di laboratorio, così come altre tipologie di dati clinici da sorgenti eterogenee (6). Il CRC memorizza queste informazioni in tre tabelle della base dati, la tabella "paziente", la tabella "visita" e la tabella "osservazioni". Le tre tabelle, congiuntamente ad altre due tabelle di appoggio (contenenti informazioni su concetti e fornitori), sono le componenti principali dello schema "a stella" del data warehouse. L'aspetto più importante dello schema a stella è identificare cos'è un "fatto". In sanità, un "fatto" è un'osservazione su un paziente. Al "fatto" vengono associate più dimensioni. Le tabelle delle dimensioni contengono informazioni di tipo descrittivo e analitico sugli elementi della tabella dei fatti. Una tabella delle dimensioni contiene le informazioni su come alcuni dati sono organizzati, così come una gerarchia che può essere usata per categorizzare o sintetizzare i dati. Nel nostro caso le dimensioni sono le visite e i pazienti.

L'infrastruttura software i2b2, installata presso la FSM, fornisce un accesso web-based a tutti i dati descritti nell'articolo. Le informazioni estratte possono essere analizzate mediante l'i2b2 web client con plug-ins configurati opportunamente (9, 10).

Risultati

L'infrastruttura software descritta in questo articolo è stata installata nel Dicembre 2010 ed è attualmente operativa presso la FSM. Il progetto ha quindi ottenuto i seguenti risultati tecnici:

- la realizzazione di software specifico per l'integrazione della biobanca con l'anatomia patologica;
- la generazione di un nuovo sistema di barcodes a supporto della biobanca;
- il progetto e lo sviluppo di un modulo software di NLP per estrarre informazioni da referti non strutturati di anatomia patologica che riguardano pazienti oncologici;
- la realizzazione di moduli ETL per il popolamento del data warehouse.

La figura 1 mostra i diversi passi del processo di integrazione. Il passo 1 è l'estra-

zione semi-automatica dal sistema di gestione dell'anatomia patologica, il passo 2 descrive il processo di anonimizzazione che coinvolge i campioni prima che vengano stoccati nella biobanca. Il passo 3 mostra il data warehouse i2b2 in cui vengono raccolti i dati da diverse sorgenti mediante trasformazioni ETL. Il passo 4 mostra come anche le informazioni provenienti dal SIO vengano integrate.

Attualmente, il data warehouse installato presso la FSM ha informazioni riguardanti 2.214 pazienti (di cui 312 nella biobanca), 25.826 visite, 163 concetti (26 dei quali legati alle diagnosi, 24 alle misure cliniche e 31 ai referti istologici) e 93.680 osservazioni.

Discussione

La nuova architettura software realizzata presso la FSM è un esempio concreto di come l'integrazione di diverse informazioni relative a un paziente, che provengono da sorgenti eterogenee, possa essere correttamente implementata e messa a disposizione della ricerca scientifica. Attualmente, stiamo implementando nuove

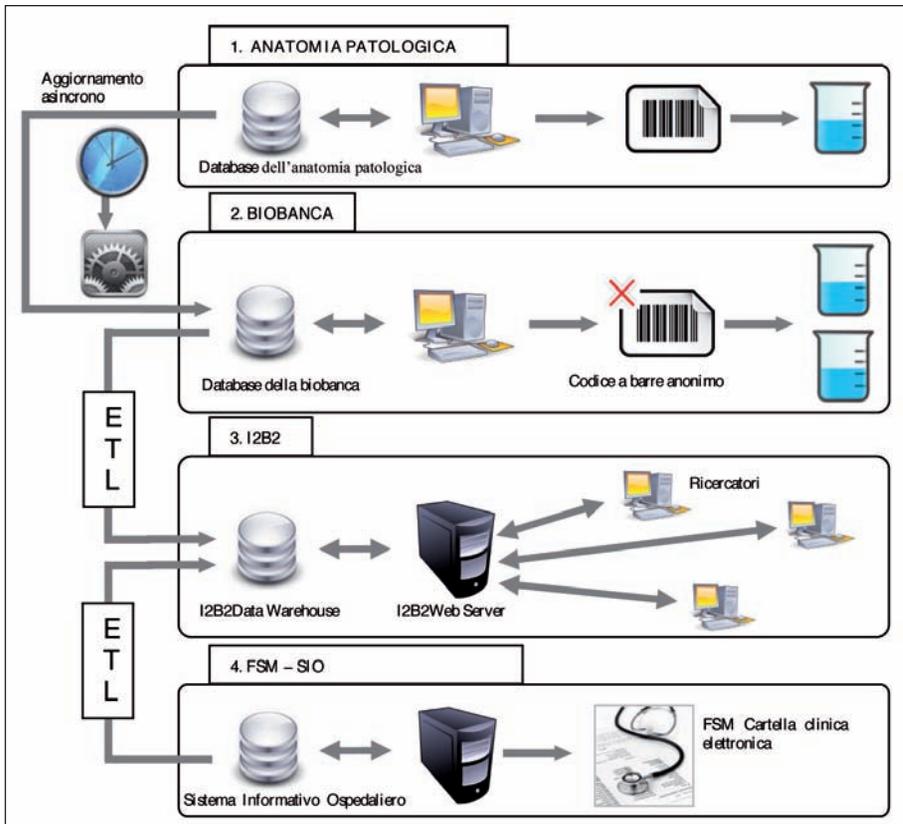


Fig. 1 - L'architettura IT progettata per integrare le informazioni nell'ambito del progetto Onco-i2b2.

funzioni per migliorare la facilità d'uso di i2b2 per i ricercatori ospedalieri; in particolare abbiamo aggiunto nuovi plug-in per l'i2b2 web client in modo da permettere l'export dei dati e l'esplorazione dinamica delle informazioni fenotipiche (11). Lo sviluppo software segue completamente le linee guida fornite dalla comunità di programmatori di i2b2, così che tutto il codice realizzato può essere messo a disposizione della comunità scientifica.

Sfruttando le potenzialità della nostra architettura IT, i prossimi passi del progetto riguarderanno l'estensione del data set importato dal SIO, così come la gestione di un maggior numero di dati di laboratorio. Continueremo inoltre ad estendere le funzionalità di analisi dei dati del sistema, aggiungendo in particolare nuovi metodi di temporal-query sulla base dati. Infine, un altro aspetto importante del progetto, riguarderà l'integrazione di dati di genotipo dei pazienti, fattore che richiederà un'attenta valutazione sia in termini di rappresentazione e memorizzazione dei dati, sia di gestione della sicurezza informatica e di tutela della privacy.

Ringraziamenti. Questo articolo descrive il progetto ONCO-i2b2, finanziato dalla Regione Lombardia. Ringraziamo inoltre il Prof. Carlo Bernasconi ed il Collegio Ghislieri per il loro supporto.

Bibliografia

1. Murphy SN, Mendis M, Hackett K, et al. Architecture of the open-source clinical research chart from Informatics for Integrating Biology and the Bedside, AMIA Annu Symp Proc. 2007; 548-52.
2. Murphy SN, Weber G, Mendis M, et al. Serving the enterprise and beyond with informatics for integrating biology and the bedside (i2b2), J Am Med Inform Assoc. 2010; 124-30.
3. Jurafsky D and Martin JH. Speech and language processing, an introduction to natural language processing, computational linguistics, and speech recognition. Second Edition, Prentice Hall. 2008.
4. Kimball R, Ross M, Thornthwaite W, Mundy J, Becker B. The data warehouse ETL toolkit (2nd edition), 2008.
5. Pentaho Corporation, Pentaho Data Integration Kettle Documentation (<http://kettle.pentaho.com>). 2011.
6. R. Bouman, J. van Dongen. Pentaho Solutions, Wiley. 2009.
7. The University of Sheffield, GATE software (<http://gate.ac.uk/sale/tao/split.html>). 2011.
8. Partners HealthCare Systems, I2B2 software (v.1.5) documentation. 2008.
9. Mendis M, Wattanasin N, Kuttan R, et al. Integration of Hive and cell software in the i2b2 architecture, AMIA Annu Symp Proc. 2007; 1048.
10. Murphy SN, Churchill S, Bry L, et al. Instrumenting the health care enterprise for discovery research in the genomic era. Genome Res. 2009; 1675-81.
11. Bellazzi R, Segagni D, et al. R engine cell: integrating R into the i2b2 software infrastructure. J Am Med Inform Assoc. 2011.

**ARGOMENTI
DI GENOMICA MEDICA**

Genomica medica e pratica clinica

Carlo Bernasconi

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia
Consulente Ematologo presso l'IRCCS Fondazione "Salvatore Maugeri", Pavia

I maggiori investimenti nella ricerca scientifica di base operati negli ultimi decenni hanno creato l'opportunità per significativi progressi nella medicina clinica. Al riguardo è da osservare che la ricerca genetica ha portato alla scoperta di centinaia di geni che possono presentare variazioni concorrenti all'insorgenza di malattie nell'uomo, ha identificato un'evidente variabilità genetica nella risposta dei pazienti a parecchi trattamenti, ha incominciato ad identificare le cause molecolari di alcune malattie.

Inoltre, sono state sviluppate tecniche diagnostiche basate sulla genetica o altri meccanismi molecolari per meglio predire la risposta dei pazienti a terapie mirate, e quindi poter attuare trattamenti personalizzati. Da disciplina di base la genomica sta quindi rapidamente guadagnando una posizione centrale nella pratica clinica.

Genoma umano e variabilità genetica

Il genoma umano è formato da una sequenza di circa 3,2 miliardi di copie di basi azotate del DNA (adenina, citosina, timina, guanina - A, C, T, G - con cui vengono codificate le informazioni genetiche) ed è composto da 46 distinti cromosomi (22 paia di autosomi, più 2 cromosomi determinanti il sesso). Ogni cromosoma contiene centinaia di geni, separati da regioni intergenetiche. Le regioni intergenetiche contengono sequenze regolatrici e DNA non codificante.

Nell'ottobre 1990 ha avuto inizio presso i National Institutes of Health degli USA il Progetto Genoma Umano (*Human Genome Project, HGP*), sotto la guida di James Watson e successivamente di Francis Collins, con l'obiettivo di determinare la sequenza delle copie di basi che formano il DNA e di mappare i geni del genoma umano identificandoli dal punto di vista fisico e funzionale. Pressochè nello stesso periodo ha lavorato al medesimo progetto anche un gruppo di ricerca privato costituito dalla *Celera Genomics*, una compagnia biotecnologica guidata da Craig Venter. Una prima bozza del genoma umano è stata pubblicata nel 2001; le analisi sono poi proseguite ed attualmente è disponibile la sequenza del DNA pressochè completa (*The National Human Genome Research Institute*, <http://www.genome.gov/>).

È da sottolineare che il Progetto Genoma Umano originariamente aveva l'obiettivo di sequenziare i nucleotidi contenuti in un genoma umano aploide di riferimento. Nel portare avanti il progetto si è lavorato sul DNA ottenuto da un certo numero di donatori selezionati con criteri di rappresentatività statistica. Ma il genoma di qualsiasi individuo (tranne quello dei gemelli monozigoti) è "unico", quindi in realtà mappare il genoma umano significa fare anche il sequenziamento delle variazioni multiple di ciascun gene.

I risultati più importanti dell'enorme lavoro di sequenziamento e identificazione del genoma umano possono venir così riassunti:

1. il numero dei geni codificanti proteine nell'uomo è circa 25.000, nettamente inferiore rispetto a quello che si presumeva sino ad una decina di anni fa, e rappresenta solo l'1,5% del DNA totale. In media ogni gene consiste di 3.000 copie di basi, ma a tal riguardo esiste una grande variabilità. I geni sono distribuiti in modo non uniforme lungo i cromosomi; ogni cromosoma contiene regioni ricche e regioni povere di geni, che sembrano correlare con le bande cromosomiche ed il contenuto in GC. Il maggior numero di geni è contenuto nel cromosoma 1 (oltre 3.000), mentre il cromosoma Y ne contiene solo 344;
2. la maggioranza dei geni umani codificanti proteine sono in grado di produrre da un singolo gene più proteine (in genere 2 o 3); questo fenomeno avviene attraverso meccanismi diversi, fra i quali il più importante è quello definito come *splicing* alternativo, un processo di maturazione del trascritto primario che può portare a più di un tipo di mRNA;
3. il genoma umano contiene molte differenti sequenze regolatrici, che sono cruciali per controllare l'espressione dei geni. Queste sono di solito brevi sequenze di DNA situate in prossimità dei geni. Solo ora, anche attraverso studi di genomica comparata, si sta realizzando una conoscenza sistematica di queste sequenze regolatrici e di come assieme agiscano in una rete regolatrice genica;
4. Oltre ai geni e alle sequenze regolatrici, il genoma umano contiene ampie regioni di DNA, la cui reale funzione rimane oggi in gran parte ignota. Queste regioni costituiscono la maggior parte del genoma umano (secondo alcuni ricercatori il 97% circa) e comprendono elementi ripetuti, trasposoni, pseudogeni e altro DNA. Nel loro complesso sono state erroneamente indicate in passato come "DNA spazzatura"; tuttavia, studi recenti sembrano attribuire ad alcune sequenze interne a queste regioni un significato funzionale ancora da definire.

La variabilità genetica umana contribuisce in modo sostanziale a generare le variazioni che si osservano fra i vari individui. Le due più importanti componenti della variabilità genetica umana sono i *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs) e le *copy-number variants* (CNVs). SNPs sono copie di basi nucleotidiche di un singolo DNA che differiscono lungo la sequenza di un DNA individuale (ad esempio, un individuo ha un A-T in una posizione specifica della sequenza DNA aploide, mentre un altro individuo ha un C-G). CNVs sono invece più ampi blocchi contigui di sequenze di DNA (usualmente più di 1000 basi) che variano in numero di copie fra i singoli individui (ad esempio, un blocco di DNA potrebbe essere duplicato in una persona e deletato in un'altra).

Milioni di SNPs sono stati scoperti nell'uomo, e a livello di singoli nucleotidi due individui differiscono per 1 su 1.000 basi circa (Sachidanandam et al., 2001). Le CNVs, che comprendono segmenti più lunghi di DNA, sono meno frequenti, e contribuiscono ad una addizionale differenza dello 0,4% di differenza nella sequenza del DNA fra due individui (Redon et al., 2006).

Ogni due soggetti umani dovrebbero essere identici circa per il 99,5 % nella sequenza del DNA, fenomeno che riflette una relativamente recente origine comune delle razze umane, con differenze raziali geneticamente insignificanti. Gli uomini hanno circa la metà del numero di variazioni genetiche che si osservano negli scimpanzé e nei gorilla; questo fatto, nonostante la dimensione ben più vasta della nostra popolazione attuale, probabilmente riflette strettoie preistoriche nella dimensione della popolazione umana (Amos W e Hoffman JI, 2009).

Malattie monogeniche rare

Nel corso del 20° secolo l'associazione di osservazioni cliniche e ricerche genetiche ha chiarito l'ereditarietà di condizioni patologiche derivate da un singolo gene o monogeniche, definite anche "malattie mendeliane" poiché trasmesse in modo conforme con le leggi di Mendel. Migliaia di condizioni causate da mutazioni in singoli geni sono state identificate e catalogate in un volume (McKusick, 1998), e successivamente in un compendio informatico noto come OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*).

Delle singole malattie sono state precisate le modalità di trasmissione ereditaria: autosomica dominante, autosomica recessiva, legata al sesso. Negli ultimi anni sono stati poi descritti altri meccanismi per l'eredità monogenica, quali l'ereditarietà mitocondriale, l'*imprinting* e la disomia uniparentale.

Le malattie monogeniche sono quasi sempre malattie rare. Anche le più frequenti, come l'emocromatosi ereditaria (incidenza approssimativa 1:300 persone), la fibrosi cistica (incidenza approssimativa 1:3000), la deficienza di alfa₁-antitripsina (incidenza approssimativa 1:1700) o la neurofibromatosi (incidenza approssimativa 1:3000) colpiscono non più di 1 su parecchie centinaia di individui in Europa e nel Nord America.

Tuttavia, l'effetto totale delle malattie monogeniche è importante, riguardando non solo il singolo paziente ma anche informazioni per la salute della popolazione in generale.

Infatti, la comprensione dei meccanismi attraverso i quali fattori genetici possono causare malattie monogeniche ha fornito importanti informazioni su processi fisiopatologici basali, che sottostanno a disordini correlati e che si osservano con maggior frequenza rispetto alla malattia genetica. Per esempio, le conoscenze riguardanti l'ipercolesterolemia familiare, una malattia genetica che nella nostra popolazione colpisce all'incirca solo 1 su 500 individui, sono state fondamentali per capire la patogenesi dell'arteriosclerosi, che colpisce un'elevata percentuale di persone; inoltre, le stesse conoscenze hanno portato allo sviluppo di nuovi farmaci (le statine), che sono fra i medicinali oggi più ampiamente prescritti (Goldstein et al., 2001).

Fattori di rischio genetici delle malattie comuni

Sino ad oggi la maggior parte dei geni coinvolti nei meccanismi di insorgenza di malattie comuni e complesse (quali il diabete mellito, l'ipertensione, l'asma, le neoplasie, ecc.) sono stati identificati grazie alla loro alta penetranza. Alcuni esempi sono le mutazioni in *BRCA1* e *BCRA2* (aumentato rischio di carcinoma della mammella e dell'ovaio; Nathanson et al., 2001), *HNPCC* (aumentato rischio di carcinoma del colon-retto senza poliposi ereditaria; Lynch, 1999), *MODY 1*, *MODY 2* e *MODY 3* (aumentato rischio di diabete mellito; Froguel e Velho, 1999) e nel gene per l' α -sinucleina (correlata alla malattia di Parkinson; Mouradian, 2002). Se un individuo possiede una di queste mutazioni, la probabilità di sviluppare la malattia corrispondente è elevata. Tuttavia, si deve osservare che ciascuna di queste mutazioni altamente penetranti associate a malattie comuni ha una prevalenza nella popolazione generale solo di uno su parecchie centinaia o alcune migliaia di individui.

Dal punto di vista della salute pubblica, geni con mutazioni meno penetranti ma molto più prevalenti hanno un maggior effetto sulla popolazione rispetto a geni che sono altamente penetranti ma poco frequenti. Mutazioni di questo tipo sono state segnalate in geni quali l'*APC* (che aumenta il rischio del carcinoma del colon-retto; Fearnhead et al., 2001) e il fattore V Leiden (che aumenta il rischio di trombosi; Major et al., 2000).

Un esempio del raffronto fra gli effetti di mutazioni rare altamente penetranti verso mutazioni frequenti meno penetranti è fornito dalla malattia di Alzheimer. Mutazioni rare in geni di presenilina 1, presenilina 2 o precursore proteico di β -amiloide sono cause altamente penetranti di malattia di Alzheimer ad esordio precoce; infatti, la malattia di Alzheimer si sviluppa attorno ai 60 anni nella maggior parte delle persone eterozigote per una mutazione in uno di questi geni (Campion et al., 1999); tuttavia, siccome molto poche sono gli individui che mostrano mutazioni di questi geni, esse svolgono un ruolo solo in meno dell'1% di tutti i casi di Alzheimer.

Al contrario, l'allele $\epsilon 4$ dell'apolipoproteina E, che aumenta il rischio della malattia di Alzheimer ad esordio tardivo, agisce in modo più subdolo. Uno studio finlandese ha trovato che la malattia di Alzheimer si sviluppa fra i 70 e gli 80 anni in circa il 21% delle persone che sono omozigote per l'allele $\epsilon 4$, nell'8% di quelle che sono eterozigote, e solo nel 3% di quelle senza l'allele $\epsilon 4$ (Kuusisto et al., 1994). Siccome il 26% circa della popolazione è eterozigote e il 2% è omozigote per l'allele $\epsilon 4$ dell'apolipoproteina (Roses, 1998), questo fattore genetico svolge un ruolo causale in molti più ammalati di Alzheimer rispetto alle mutazioni dei geni per la presenilina 1, presenilina 2 e precursore proteico di β -amiloide, considerate complessivamente (Guttmacher e Collins, 2002).

Riguardo all'intervento di fattori genetici nell'insorgenza di malattie comuni e complesse bisogna poi sottolineare che informazioni importanti potranno in futuro derivare dalle indagini sistematiche condotte su SNPs e CNVs. Infatti, studi di associazione (cioè l'analisi di persone ammalate verso soggetti controllo) potranno portare all'identificazione di fattori genetici in malattie comuni e complesse,

come gli studi di familiarità sono stati importanti per l'identificazione dei geni coinvolti nelle malattie monogeniche.

Impatto della genomica in oncologia

Le nuove conoscenze di genomica medica nell'ultimo decennio hanno stimolato la ricerca oncologica in molteplici direzioni. L'identificazione in modo pressoché completo dell'insieme dei geni che codificano per le proteine, completata con la scoperta di nuovi elementi trascritti come i microRNAs, ha portato a numerose indagini (condotte con l'impiego di procedure *array*) su modelli di espressione genica in parecchi tipi di tumore. Inoltre, lo sviluppo di approcci sistematici all'identificazione di mutazioni somatiche ha suggerito analisi esaustive delle modificazioni nei genomi tumorali, inclusi cambiamenti del numero di copie di basi, riarrangiamenti, piccole inserzioni e delezioni, mutazioni puntiformi (Stratton et al., 2009). Recentemente tutto questo sforzo di ricerca ha portato al sequenziamento dell'intero genoma di tumore umano, fornendo un catalogo completo delle mutazioni (Pleasance et al., 2010). Questi studi possono dare indicazioni sui geni che contribuiscono alla trasformazione neoplastica cellulare.

Contemporaneamente la caratterizzazione della variabilità ereditaria nella popolazione umana ha suscitato una serie di indagini sulla predisposizione ai tumori, puntando soprattutto sulle varianti di DNA che sono comuni nella popolazione generale e che conferiscono un piccolo incremento del rischio neoplastico. Infine, è stata sviluppata tutta una serie di reagenti biologici che interferiscono con le funzioni dei geni nelle cellule viventi; i più usati in tal senso sono piccole molecole di RNA. Queste sono state utilizzate per parecchi scopi; ad esempio, per determinare sistematicamente quali geni sono richiesti per la sopravvivenza cellulare e quali geni conferiscono sensibilità a determinati farmaci.

Alcuni risultati di queste ricerche sono già stati incorporati nell'oncologia clinica. In particolare, sono di grande interesse gli effetti che l'approccio genomico sta avendo sulla classificazione dei tumori, marcatori prognostici, indicatori predittivi di risposta ai farmaci, sviluppo di nuove terapie mirate, strategie per monitorare una malattia neoplastica o per trattare la predisposizione a un tumore (McDermott et al., 2011).

Bibliografia

1. Amos W, Hoffman JI. Evidence that two main bottleneck events shaped modern human genetic diversity. *Proc Biol Sc.* 2009; 277: 131.
2. Champion D, Dumanchin C, Mannequin D, et al. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet.* 1999; 65: 664.
3. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet.* 2001; 721: 2001.
4. Froguel P, Velho G. Molecular genetics of maturity-onset diabetes of the young. *Trends Endocrinol Metab.* 1999; 10: 142.

5. Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS, et al. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beauder AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited diseases. 8th ed. Vol 2. McGraw-Hill, New York, 2001.
6. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine - A primer. *N Engl J Med.* 2002; 347, 1512.
7. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature:* 2001; 9: 860.
8. Kuusisto J, Koivisto K, Kervinen K, et al. Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population base study. *Brit Med J.* 1994; 309: 636.
9. Lynch HT. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cytogenet Cell Genet.* 1999; 86: 130.
10. Major DA, Sane DC, Harrington D.M. Cardiovascular implications of the factor V Leiden mutation. *Am Heart J.* 2000; 140: 189.
11. McDermott U, Downing JR, Stratton MR. Genomics and continuum of cancer care. *N Engl J Med.* 2011; 364: 340.
12. Mouradian MM. Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurology.* 2002; 58: 179.
13. Nathanson KN, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat Med.* 2001; 7: 552.
14. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM™. Baltimore: McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University, 2000. (Accessed October 15, 2002, at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>)
15. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature.* 2010; 463: 191.
16. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006; 444: 444.
17. Roses AD. Alzheimer diseases: a model of gene mutations and susceptibility polymorphisms for complex psychiatric diseases. *Am J Med Genet.* 1998; 81: 49.
18. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001; 409: 928.
19. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature.* 2009; 458: 719.

Profilo genico, prognosi e terapia dei tumori

Alberto Zambelli, Anna Pagani

U.O. Oncologia Medica 1, IRCCS Fondazione S. Maugeri, Pavia

È ormai noto da decenni che il cancro rappresenta “una malattia del genoma” caratterizzata da una costellazione di alterazioni strutturali geniche che ne condizionano il comportamento clinico e la risposta ai trattamenti. La diagnosi e la classificazione dei tumori basata sull’analisi istologica di sezioni tissutali rimane ancora oggi il cardine fondamentale della pratica clinica nonostante il crescente interesse e studio delle alterazioni geniche che caratterizzano il tumore.

Le innovazioni degli ultimi anni hanno permesso di determinare con costi e tempi relativamente contenuti bassi, i livelli di espressione di migliaia di trascritti di mRNA grazie ai profili basati su tecnologia microarray (1).

L’attuale interesse nei confronti dell’analisi dei profili di espressione genica di campioni tumorali è rivolto ad una migliore definizione di alcuni aspetti dell’outcome del paziente, in particolare il rischio di recidiva e della risposta ai trattamenti farmacologici.

In tale ottica le cosiddette “firme” geniche assumono un’importante valore prognostico e terapeutico.

Per esempio, nel tumore mammario la caratterizzazione dei profili di espressione ha contribuito alla classificazione in sottotipi molecolari (luminal A, luminal B, HER2 positivi e basallike), che possiedono differenti caratteristiche cliniche e biologiche ed un corrispettivo valore prognostico (2, 3). Tale nuova classificazione molecolare intrinseca ha in parte sfidato la più diffusa definizione di carcinoma mammario basata sulle caratteristiche patologiche definite dalle tecniche di immunohistochimica.

In particolare nel caso del tumore della mammella sono state identificate tre “firme” di espressione che si sono dimostrate importanti per definire il rischio di recidiva in pazienti con malattia in fase precoce e che sono ormai entrate nella pratica clinica: il Mammaprint, l’Oncotypedx e la “firma” di Rotterdam (4).

Il Mammaprint, profilo composto da 70 geni, approvato dalla Food and Drug Administration, è attualmente oggetto di studio nel trial MINDACT nel quale vengono valutati pazienti con malattia in fase precoce (linfonodi negativi o da 1 a 3 linfonodi positivi) e viene assegnato il trattamento medico precauzionale anche in base alle caratteristiche molecolari (5).

L’Oncotype DX, profilo composto da 21 geni, è stato incluso a partire dal 2007 nelle linee-guida dell’American Society of Clinical Oncology, per la valutazione

di pazienti che presentano una malattia con recettori ormonali positivi e linfoni negativi. In questo modo vengono identificate coloro che possono beneficiare maggiormente della terapia ormonale con tamoxifene e per le quali non è richiesto un trattamento chemioterapico adiuvante (6).

Il terzo ed ultimo profilo identificato per il cancro mammario è rappresentato dalla signature di Rotterdam composta da 76 geni e che ha ottenuto validazione di efficacia prognostica su dataset indipendenti ma che non è ancora commercializzato per l'analisi di pazienti su larga scala.

Similmente anche per il cancro del colon è stato identificato un profilo di 12 geni come fattore prognostico indipendente di rischio di recidiva in pazienti con malattia in stadio II.

Questo profilo genico dovrebbe permettere di identificare coloro che non beneficiano di un trattamento chemioterapico adiuvante (7) e per i quali è possibile evitare la terapia medico, risolvendo uno dei più dibattuti argomenti dell'oncologia medica che riguarda proprio la stratificazione del rischio di recidiva nel tumore del colon retto in stadio precoce (st I e II).

Naturalmente ciò che vale per i tumori solidi vale anche per le neoplasie ematologiche. In particolare nel caso della leucemia mieloide cronica con cariotipo normale (LMC) è stato identificato un profilo di espressione di 133 geni che possiede valore come fattore prognostico indipendente (8). Un analogo profilo di espressione per il linfoma a grandi cellule B permette una migliore discriminazione fra questo e il linfoma di Burkitt (9).

Nonostante le evidenze emerse, tuttavia l'utilizzo di queste firme geniche nella pratica clinica come indicatori prognostici e predittivi non è ancora del tutto condiviso e i risultati degli studi clinici in corso (MINDACT, TAILORx) sono attesi per ottenere la conferma della loro utilità.

Grazie alle conoscenze di farmacogenomica il paradigma di sviluppo dei farmaci antitumorali è profondamente mutato nel corso dell'ultimo decennio.

A partire dall'evidenza, ormai consolidata, che solo un sottogruppo di pazienti beneficia di un determinato trattamento, la ricerca in ambito oncologico si è concentrata nello sviluppo di agenti terapeutici la cui azione si esplica verso i prodotti di geni coinvolti in pathways cellulari importanti per la proliferazione e la sopravvivenza della cellula.

I geni coinvolti in questi pathways appaiono nel cancro frequentemente mutati, come conseguenza di alterazioni somatiche note come mutazioni attivanti. È ormai noto come la presenza o l'assenza di determinate mutazioni geniche rivesta un ruolo predittivo di risposta ad una specifica terapia target (10, 11).

Il primo esempio di terapia target è rappresentato dall'imatinib mesilato per la cura della leucemia mieloide cronica e del GIST; successivamente sono stati sviluppati altri importanti agenti che si sono dimostrati attivi in tumori con particolari mutazioni geniche (12-16).

Spesso la ricerca di nuove terapie farmacologiche ha come target le proteine codificate dai geni mutati, soprattutto se si tratta di enzimi come le chinasi che risultano costitutivamente attive a seguito della mutazione avvenuta nel tumore (11, 17, 18).

In altri casi lo sviluppo in vitro di farmaci diretti contro un gene mutato non ha avuto successo e solo grazie all'introduzione di librerie di small interfering RNA è stato possibile studiare le interazioni del gene mutato con chinasi necessarie per la sopravvivenza della cellula mutata e rivolgere quindi la ricerca farmacologica verso questi nuovi targets (19, 20).

Recenti studi di sequenziamento effettuati sui tumori solidi hanno dimostrato che molte mutazioni geniche legate allo sviluppo del cancro sono presenti in meno del 10% dei tumori.

In quest'ottica diventa necessaria una batteria di test diagnostici genetici sempre più ampia per ciascun tumore per un utilizzo più mirato ed efficace dei nuovi agenti a bersaglio molecolare.

Il crescente e sistematico sequenziamento del genoma del tumore negli ultimi anni ha permesso di identificare numerose nuove mutazioni geniche.

Le nuove tecnologie che presto permetteranno l'intero sequenziamento del genoma del cancro potranno permettere di identificare fin dall'esordio della malattia le mutazioni presenti in un piccolo sub-clone di cellule che sono alla base in un tempo successivo della comparsa di resistenze acquisite (21). Grazie a questi progressi sarà possibile effettuare up-front una strategia di trattamento di combinazione in modo da minimizzare l'espansione di cloni resistenti presenti nella popolazione tumorale.

È ormai prassi comune per la cura di molte neoplasie ematologiche decidere il trattamento in base ai livelli di determinate alterazioni geniche presenti nel circolo periferico; tale rilievo è effettuato con saggi di DNA che contengono il riarrangiamento specifico, mediante amplificazione con PCR.

Nella LMC per esempio una riduzione quantitativa dei livelli di trascritti di BCR-ABL dopo il trattamento con imatinib correla con una duratura risposta alla terapia mentre un incremento di tali livelli è indice di una rapida crescita tumorale e di fallimento della terapia (22).

Questo tipo di valutazione della crescita tumorale con l'analisi di campioni di sangue non è ancora applicabile nella gestione terapeutica dei pazienti con tumori solidi dal momento che non sono noti tutti i riarrangiamenti o le traslocazioni geniche ricorrenti.

Tuttavia alcuni passi avanti sono stati fatti. In particolare, si è cercato di correlare i livelli di determinate mutazioni puntiformi di DNA evidenziabili nel sangue periferico con la recidiva del cancro del colon retto e la comparsa di mutazioni secondarie responsabili della resistenza alla terapia nel carcinoma polmonare non a piccole cellule trattato con inibitori dell'EGFR (23-25).

La scoperta di piccoli frammenti di DNA circolanti portatori di mutazioni puntiformi è tecnicamente impegnativa e pertanto è difficile implementare questa strategia nella pratica clinica.

In futuro la catalogazione per molti tumori della maggior parte delle mutazioni somatiche ricorrenti, grazie a tecniche di sequenziamento simultaneo di multiple aree di genoma rapidamente e a basso costo, renderà possibile anche per i tumori solidi, rilevare il DNA tumorale circolante i cui livelli potrebbero correlare con la crescita tumorale (26, 27).

Il recente sequenziamento del genoma umano ha permesso di catalogare le più comuni varianti di DNA presente nella popolazione normale (28). Attraverso studi che hanno comparato la prevalenza di centinaia di migliaia di varianti di DNA in soggetti malati e soggetti sani, sono stati identificate molte nuove varianti di DNA che conferiscono suscettibilità a differenti tipi di tumori.

La prima identificazione di questo tipo risale a prima del 2000 con la scoperta che la mutazione ereditata nel gene BRCA1 e BRCA2 conferisce un aumentato rischio di sviluppare un neoplasia mammaria e/o ovarica.

In generale però queste nuove varianti di suscettibilità sono presenti in gran parte della popolazione e conferiscono un aumento molto limitato del rischio di sviluppare una neoplasia; ne deriva pertanto che la loro utilità clinica sia limitata all'identificazione di soggetti che devono eseguire programmi di screening per determinate patologie.

Nei prossimi anni sono attese i risultati di 2 grandi progetti definiti International Cancer Genome Consortium e il Cancer Genome Atlas che hanno come obiettivo lo studio su larga scala del genoma del cancro per generare 25.000 differenti genomi del cancro e un catalogo completo delle mutazioni geniche. Queste mutazioni saranno oggetto di studio per lo sviluppo di nuovi agenti biologici e sarà necessario effettuare nei trial clinici l'analisi del genoma per scoprire nuovi predittori prognostici e di responsività ai farmaci.

L'idea di base che guida i nuovi progetti di farmaco genomica risiede nell'ipotesi che le mutazioni attivanti su geni critici possano guidare i processi di cancerogenesi indipendentemente dal tipo di neoplasia e indipendentemente dalla sede di origine del tumore.

Inoltre è possibile che i nuovi trattamenti farmacologici, mirati su specifici pathways molecolari, ottengano efficacia prescindano dalle classiche valutazioni istopatologiche e di organo d'origine che sino ad oggi hanno dominato il quadro dello sviluppo farmacologico. Queste ipotesi hanno già ottenuto importanti evidenze scientifiche, dal momento che tumori molto differenti tra loro vengono oggi curati con terapie a bersaglio molecolare specifico. È il caso del trattamento con Imatinib per la LMC e per il GIST, oppure il caso del trattamento con Trastuzumab del carcinoma mammario e del carcinoma gastrico HER2pos o ancora il trattamento con antiEGFR del carcinoma del colon e del carcinoma squamoso della regione testa/collo. In tutti questi casi, ciò che risulta decisivo per la predizione di risposta al trattamento non è rappresentato dai classici parametri della tassonomia oncologica (i.e. istologia, sede di origine) quanto piuttosto dall'evidenza di specifiche alterazioni molecolari che offrono vantaggio proliferativo per le cellule che ne sono portatrici e che possono essere modulate dall'attività farmacologica.

Allo stato attuale è necessario disegnare trial clinici in cui la popolazione oggetto di studio sia selezionata per un set di mutazioni geniche in grado di guidare la scelta farmacologica. Queste mutazioni dovrebbero essere valutate regolarmente all'atto della diagnosi di neoplasia ma anche nei casi di comparsa di metastasi dal momento che i cloni cellulari emergenti potrebbero esprimere un'eterogeneità e un'instabilità molecolare che li può differenziare dal genotipo iniziale.

Bibliografia

1. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med.* 2009; 360: 790-800.
2. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 10869-10874.
3. van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002; 347: 1999-2009.
4. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002; 415: 530-536.
5. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet.* 2005; 365: 671-679.
6. Lo SS, Mumby PB, Norton J, et al. Prospective multicenter study of the impact of the 21-gene recurrence score assay on medical oncologist and patient adjuvant breast cancer treatment selection. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 1671-1676.
7. Kerr D, Gray R, Quirke P, et al. A quantitative multigene RT-PCR assay for prediction of recurrence in stage II colon cancer: selection of the genes in four large studies and results of the independent, prospectively designed QUASAR validation study. *J Clin Oncol.* 2009; 27: Suppl: 169s-169s.
8. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002; 346: 1937-1947.
9. Dave SS, Fu K, Wright GW, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med.* 2006; 354: 2431-2442.
10. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2129-2139.
11. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004; 304: 1497-1500.
12. Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science.* 1960; 132: 1497-1497.
13. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003; 348: 994-1004.
14. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2006; 355: 2408-2417.
15. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 1998; 279: 577-580.
16. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med.* 2002; 347: 472-480.

17. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004; 304: 554-554.
18. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417: 949-954.
19. Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature*. 2009; 462: 108-112.
20. Scholl C, Frohling S, Dunn IF, et al. Synthetic lethal interaction between oncogenic KRAS dependency and STK33 suppression in human cancer cells. *Cell*. 2009; 137: 821-834.
21. Engelman JA, Settleman J. Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev*. 2008; 18: 73-79.
22. Press RD, Love Z, Tronnes AA, et al. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood*. 2006; 107: 4250-4256.
23. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer - a survey. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775: 181-232.
24. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008; 14: 985-990.
25. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med*. 2008; 359: 366-377.
26. McBride DJ, Orpana AK, Sotiriou C, et al. Use of cancer-specific genomic rearrangements to quantify disease burden in plasma from patients with solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010; 49: 1062-1069.
27. Leary RJ, Kinde I, Diehl F, et al. Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. *Sci Transl Med* 2010; 2: 20ra14-20ra14Kwak EL, Camidge DR, Clark J, et al. Clinical activity observed in a phase I dose escalation trial of an oral c-met and ALK inhibitor, PF-02341066. *J Clin Oncol*. 2009; 27: Suppl: 148s-148s.
28. Durbin RM, Abecasis GR, Altshuler DL, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010; 467: 1061-1073.

La centralità dell'RNA in biologia e medicina

Angelo Nicolin

Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica "E. Trabucchi",
Università di Milano

Il dogma centrale DNA-RNA-Proteina costituisce l'asse portante della vita. La semplicità concettuale insieme alla razionalità funzionale ed alla logica sperimentale hanno determinato un'egemonia culturale del DNA che ha oscurato il ruolo dell'RNA quale struttura rilevante nella moderna medicina e farmacologia molecolare.

Una serie di caratteristiche e di funzioni vedono oggi l'RNA al centro di molti sistemi diagnostici, di processi patogenetici e di target ottimale per interventi terapeutici.

Infatti le alterazioni del DNA all'origine di molte malattie inclusi i tumori trovano esatta corrispondenza nell'RNA, localizzato nel citoplasma, facilmente regolabile perché a singola elica, con breve emivita e già finemente regolato per via endogena da proteine e da brevi RNA non codificanti. Alla lenta, poco precisa e ridondante trascrizione, l'RNA non presenta i limiti descritti ed è inoltre all'origine di patologie non riscontrabile nel DNA.

La struttura dell'RNA

L'RNA messaggero viene utilizzato in Medicina a scopo diagnostico. In realtà, oltre alla regione codificante ORF (Open Reading Frame) l'mRNA è costituito da una sequenza complessa che prevede la regione 5' UTR (Untranslated Region) e la regione 3' UTR. La prima regola prevalentemente i processi di traduzione e ha la capacità di rilevare condizioni cellulari, la seconda regola il metabolismo dell'mRNA stesso, in particolare i processi di degradazione e la localizzazione. Domains in 5' UTR come IRES (internal ribosome entry site) oppure le uORF (upstream open reading frame) sono sensori - per metaboliti cellulari o brevi peptidi - che regolano la traduzione.

Accanto alle caratteristiche di sequenza l'mRNA presenta, diversamente dal DNA, strutture secondarie e terziarie. Le secondarie consentono di stabilire legami molto specifici e stabili con proteine mentre le strutture terziarie consentono il legame con ioni che conferiscono proprietà enzimatiche.

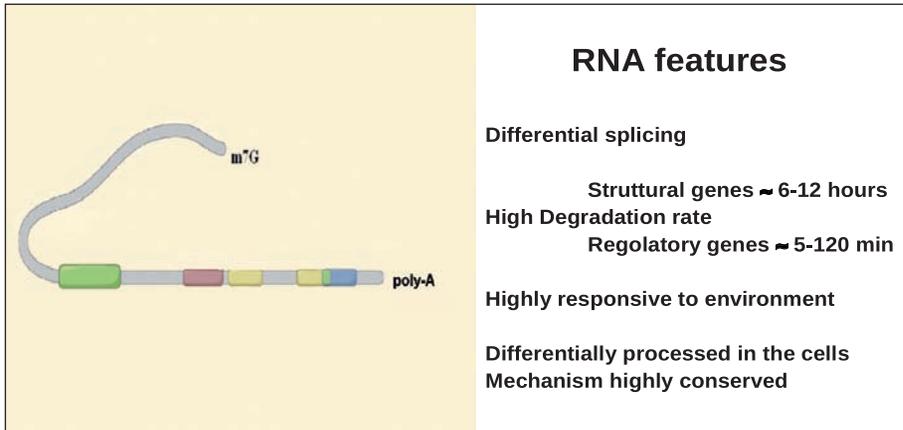


Fig. 1

Le funzioni dell'RNA

Non considerando le funzioni dell'RNA ribosomale e transfer, l'RNA ha essenzialmente funzioni codificanti (mRNA) e funzioni regolatorie (RNA interference-RNAi). Accanto a queste più note funzioni codificanti-regolatorie della sintesi proteica, l'RNA funge da template per le telomerasi. Le capacità autocatalitiche gli assegnano il ruolo di molecola primordiale con proprietà di memoria ed effettive la cui portata negli organismi superiori non è ancora ben definita.

I processi metabolici rappresentano i passaggi fondamentali che determinano i tempi e l'esatta espressione genica, costituiscono inoltre un rilevante momento di patogenesi e suggeriscono le modalità di intervento farmacologico.

Lo splicing alternativo consente l'espressione di proteine diverse codificate da un

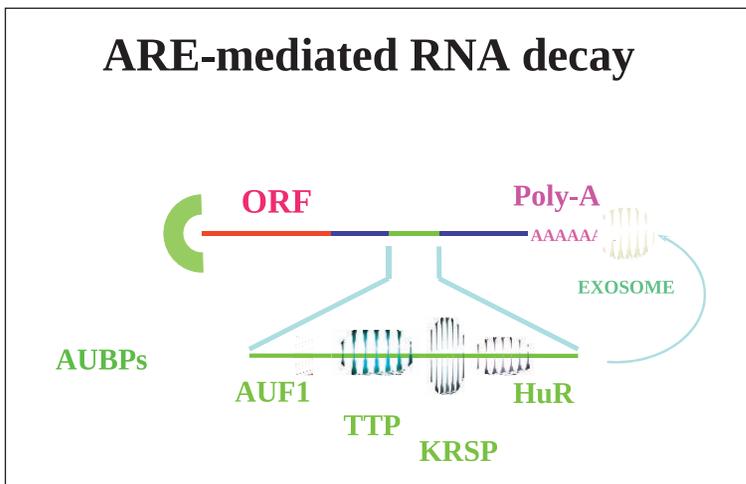


Fig. 2

unico gene ampliando significativamente la plasticità e le funzioni proteiche. È d'altro canto ben nota l'origine di numerose e importanti patologie da un errato splicing.

Non meno importante è la localizzazione dell'mRNA e dell'RNAi. Accanto al ribosoma, l'mRNA si localizza in siti definiti, i Processing Bodies (PBs) ove viene stoccato, controllato, degradato oppure liberato nel ribosoma per la sintesi. La degradazione è il processo che più di altri regola l'espressione genica e risponde con prontezza agli stress-stimoli. Considerando che la trascrizione è un processo ridondante e poco accurato, la degradazione provvede a controllare la quantità e la qualità dell'mRNA. Sequenze ARE (Adenine-uridine Rich Elements) gene-specifiche anche se con definiti algoritmi localizzate in 3' UTR sono i sensori ed i siti consenso per regolare il processo di degradazione. Proteine AUBPs (Adenine Uridine Binding Proteins) legano le sequenze consenso ed attivano l'exosoma, un complesso esonucleasico che opera la degradazione a partire da 3' UTR.

Patologie RNA dipendenti

Tutte le mutazioni nella sequenza genica all'origine di numerose patologie sono riscontrabili nell'mRNA. Inoltre, una serie non meno numerosa ed importante di alterazioni post-trascrizionali sono presenti nel solo RNA. Le alterazioni riguardano principalmente alterazioni nello splicing, mutazioni di sequenze non codificanti, localizzazioni ectopiche, quantità non fisiologiche, alterate risposte a stimoli cellulari.

Splicing alterato è all'origine di fibrosi cistica, anemia falciforme, distrofia muscolare di Duchenne, alcune forme di autismo, numerose malattie neuromuscolari. Alterazioni nelle sequenze non codificanti sono all'origine di alterata espressione genica alla base di malattie autoimmuni o trasformazioni neoplastiche dipendenti da alterata espressione di oncogeni o oncosoppressori. Alterazioni nei telomeri sono causa di invecchiamento o di alterata apoptosi e quindi cancro. Altre alterazioni riguardano messaggeri dei mitocondri con una serie di altre patologie associate.

RNA target farmacologico

L'era dell'RNA quale bersaglio farmacologico si è aperta da quasi 25 anni ed oggi è principalmente perseguita con gli siRNA. L'azione farmacologica basata sulla specificità di sequenza è adottata in tutti i laboratori di ricerca biomedica ed è allo studio in numerosissime sperimentazioni cliniche. L'attività di queste molecole, facili da produrre, precise nell'azione e poco costose, è attualmente molto utilizzata in sistemi cellulari in vitro. Ancora critica la situazione in vivo a causa della difficoltà da parte degli oligonucleotidi e siRNA di superare le membrane cellulari. In campo preclinico viene facilmente modificata o corretta l'espressione genica con agenti che ibridizzano l'RNA citoplasmatico. In campo clinico le numerose sperimentazioni in corso si avvalgono di veicolazioni che facilitino

l'uptake cellulare. Sono in molti a preconizzare una nuova era per la prevenzione e la cura di importanti malattie oggi prive di efficaci strumenti terapeutici. Le malattie emato-oncologiche, le infezioni virali, la degenerazione maculare sono le indicazioni prevalenti.

Bibliografia

1. Sharp PA. The centrality of RNA. *Cell*. 2009; 136 (4): 577-80.
2. Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, Nicolin A. Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol*. 2003; 195 (3): 356-72. Review.
3. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*. 2009; 457 (7228): 426-33. Review.
4. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9 (10): 775-89. Review.
5. Rossi JJ. New hope for a microRNA therapy for liver cancer. *Cell*. 2009; 137 (6): 990-2.
6. Neely RD, Bassendine MF. Antisense technology to lower LDL cholesterol. *Lancet*. 2010; 375 (9719): 959-61.

**TARGETED THERAPIES:
ALCUNI MECCANISMI D'AZIONE**

Inibizione terapeutica del proteasoma

Paolo Milani, Giampaolo Merlini

Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche, Servizio di Analisi Chimico Cliniche, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Dipartimento di Biochimica, Università di Pavia

Il ruolo dell'inibizione del proteasoma nella terapia del cancro è emerso come possibile approccio clinico nello scorso decennio.) Il sistema ubiquitina-proteasoma è in grado di degradare più dell'80% delle proteine cellulari. In particolare, la proteolisi ha un ruolo essenziale nella funzione di regolazione di tutti i processi cellulari come ad esempio la progressione delle fasi del ciclo vitale, la differenziazione, la trasduzione del segnale, l'apoptosi, l'espressione genica o la processazione antigenica).

Il complesso enzimatico del proteasoma è controllato da un elevato numero di regolatori endogeni e ha un ruolo primario nella degradazione della proteine cellulari eucariotiche (4). Il proteasoma è un grande complesso proteasico di forma cilindrica composto da 44 polipeptidi (circa 2.5 mDa) (2) Il centro del cilindro è ricoperto da uno o due complessi regolatori di 890 kDa che svolgono le proteine globulari poliubiquitinate e le iniettano nel cilindro previa dissociazione delle molecole di ubiquitina.

Il cilindro è composto da due anelli alfa esterni e due beta mediali. Gli anelli alfa formano uno stretto canale che richiede la linearizzazione delle proteine globulari. Il complesso è in grado di degradare le proteine tramite due fasi successive. Nella prima, il substrato è modificato da un legame covalente con una catena di poliubiquitina, che rende la proteina riconoscibile dal proteasoma. In seguito, la proteina è degradata dal proteasoma (5).

Il sito attivo del proteasoma è formato da treonine attive appartenenti ad alcune subunità β degli anelli centrali, queste treonine sono responsabili del taglio proteolitico. Le tre attività che regolano la proteolisi sono la chimotripsina-simile, la tripsina-simile e la caspasi-simile, anche note come $\beta 5$, $\beta 2$ e $\beta 1$. Tutte queste subunità sono contenute nel sito del proteasoma 20S (6-8). I prodotti finali della proteolisi sono piccoli peptidi di 6-7 residui.

Nell'uomo l'alterata regolazione del proteasoma è implicata in diverse patologie quali il cancro, le malattie autoimmuni, neurodegenerative e le infezioni virali (9) Per questo, è stato studiato il ruolo dell'inibizione del proteasoma come possibile bersaglio terapeutico.

In particolare, la prima molecola che ha un'azione d'inibizione del proteasoma, e che oggi è utilizzata nella pratica clinica è il bortezomib. Questo farmaco è stato

approvato per la terapia del mieloma multiplo e del linfoma mantellare negli Stati Uniti nel 2003 e in Europa nel 2004. Negli ultimi anni, sono state studiate altre molecole con attività inibitoria sul proteasoma, che potrebbero avere un possibile impatto terapeutico.

Meccanismo di azione

Sono noti numerosi inibitori del proteasoma, naturali e di sintesi. Le molecole che hanno una funzione d'inibizione del proteasoma legano questo in modo reversibile o irreversibile, primariamente al sito enzimatico della sub-unità 20S, in particolare nel sito chimotripsino-simile, che perde la sua funzione proteolitica. Sono state identificate cinque differenti classi di molecole che comprendono le aldeidi, i peptidi vinil-solfoni, i peptidi boronati, gli epossichetoni (epoximycin e epynomycin) e i β -lattoni (lactacystin e derivati) (8, 10). I principali effetti di tali inibitori comprendono:

- a) l'inibizione del sistema NF- κ B attraverso la prevenzione della degradazione del suo inibitore I κ B, con una conseguente ridotta espressione di proteine anti-apoptotiche;
- b) la stabilizzazione e l'accumulo di p53;
- c) la deregolazione del turnover delle cicline e la distruzione dell'attività chinasi-ciclina-dipendente;
- d) effetti sulla stabilità delle proteine della famiglia cdc25, KIP1 e WAF1;
- e) la stabilizzazione di JNK, l'aumentata fosforilazione di c-Jun con up-regolazione di Fas;
- f) la citotossicità e l'induzione dell'apoptosi attraverso l'alterazione della stabilità di molti regolatori positivi o negativi della proliferazione cellulare, ad esempio il segnale pro-apoptotico TRAIL;
- g) la chemio-sensibilizzazione ai farmaci;
- h) l'alterazione della risposta immunitaria, che può avere un ruolo nel trattamento delle malattie autoimmuni o *graft versus host disease*;
- i) l'induzione dell'apoptosi attraverso un eccessivo stress del reticolo endoplasmatico con attivazione della "unfolded protein response" terminale;
- j) l'annullamento dell'effetto anti-apoptotico di IL-6 e di IGF-1;
- k) la riduzione della capacità migratoria delle cellule mielomatose in risposta al VEGF;
- l) l'effetto anti-angiogenico;
- m) infine, è stato dimostrato un possibile effetto immunomodulatore del bortezomib attraverso l'inibizione della funzione delle cellule dendritiche (11-14).

Solo alcune delle molecole che sono state studiate negli ultimi anni, hanno avuto un'evoluzione verso un utilizzo clinico a causa di una loro instabilità metabolica e di una potenziale perdita di specificità. La figura 1 e la tabella 1 riportano alcune delle principali molecole attualmente in studio.

Bortezomib (PR-341 o Velcade®)

Dopo avere mostrato un'importante efficacia negli studi in vitro (16), bortezomib

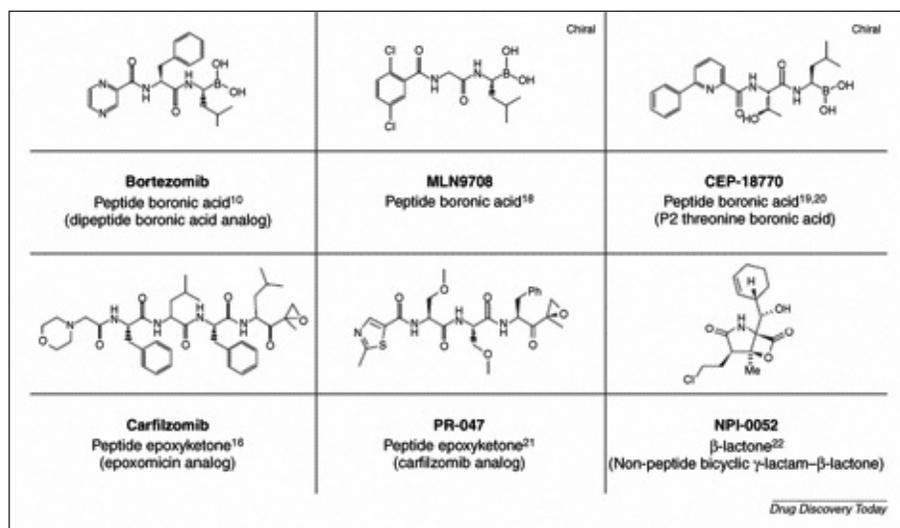


Fig. 1 - Struttura chimica del bortezomib e degli inibitori del proteasoma di seconda generazione. (Dick et al. 2010) (15).

Tab. 1 - Principali caratteristiche del bortezomib e degli inibitori del proteasoma di seconda generazione. MM mieloma multiplo; MCL linfoma mantellare (modificata da Dick et al. 2010) (15).

Inibitore del proteasoma	Stadio di sviluppo clinico	Via di somministrazione
Bortezomib	Approvato in Europa per il MM e MCL	Endovena
MLN9708	Fase I	Endovena, efficace anche per os
CEP-18770	Fase I	Endovena e orale
Carfilzomib	Fase II	Endovena
PR-047	Studi pre-clinici	Orale
NPI-0052	Fase I	Endovena

è il primo farmaco ad azione inibitoria sul proteasoma approvato nell'uso clinico nel mieloma multiplo e nel linfoma mantellare (10). Sono stati valutati i possibili usi di tale farmaco nel trattamento di altri tumori, sia come singolo farmaco che in combinazione con altri farmaci e questo ha portato allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche (17).

Recentemente è stato anche confermato il ruolo del bortezomib nel trattamento dell'amiloidosi da catene leggere immunoglobuliniche (AL) (18, 19). Il farmaco presenta una significativa tossicità che si esprime principalmente con profonda astenia, polineuropatia, che può divenire rapidamente invalidante, diarrea, trombocitopenia e riattivazione di infezione erpetica. Questi effetti collaterali sono in genere ben controllabili con opportune riduzioni del dosaggio e della frequenza di somministrazione del bortezomib.

Negli ultimi anni è continuata una intensa ricerca per lo sviluppo di nuove molecole con un migliore profilo tossicologico e somministrabili oralmente, più agevoli per la gestione ambulatoriale dei pazienti.

MLN9708 (MLN2238)

MLN9708 è un peptide boronico, e la sua formulazione consente la somministrazione orale.

Si tratta di un pro-farmaco che subisce un'idrolisi nel plasma nella sua forma attiva, MLN2238. Studi di farmacocinetica e farmacodinamica hanno dimostrato il potenziale ruolo di questo farmaco in clinica (20). Sono attualmente in via di preparazione ed attuazione trial clinici di fase I.

CEP-18770

CEP-18770 è un peptide boronico come il bortezomib, ed ha dimostrato un'attività di inibizione del sistema NF- κ B e nell'induzione dell'apoptosi tramite l'attivazione delle caspasi in linee cellulari di mieloma multiplo (21). È stata anche dimostrata una possibile attività in combinazione con la doxorubicina ed il melphalan in modelli murini affetti da mieloma, con un miglioramento della sopravvivenza rispetto all'uso del solo melphalan (22). Attualmente è in corso un trial clinico di fase I, che valuta il possibile utilizzo di questo farmaco nel trattamento dei linfomi non Hodgkin avanzati.

Carfilzomib (PR-171)

Carfilzomib appartiene alla famiglia dei peptidi epossichetoni, ed è l'inibitore del proteasoma in fase più avanzata di sviluppo in clinica di questa famiglia di molecole (23, 24).

In particolare sono stati effettuati studi clinici di fase I (25) e sono in corso specifici studi clinici di fase II (24). Questo farmaco è in grado di inibire in modo selettivo sia il complesso β 5 del proteasoma che il β 5i nell'immuno-proteasoma ed ha dimostrato una potente attività anti-tumorale in linee cellulari di mieloma multiplo e di linfomi non Hodgkin (26).

PR-047

PR-047 è un epossichetone, ed è un equivalente di carfilzomib che potrebbe essere somministrato per via orale. Questa molecola è in grado di inibire in modo irreversibile la subunità β 5, ed ha dimostrato efficacia in modelli animali affetti da linfomi non-Hodgkin e carcinoma del colon retto (27).

Marizomib (NPI-0052; salinosporamide A)

Marizomib appartiene alla famiglia dei β -lattoni, deriva dal batterio marino *Salinospora tropica* ed è in grado di inibire in modo irreversibile la subunità β 5 del proteasoma (28, 29).

Studi pre-clinici hanno dimostrato l'efficacia di marizomib nel trattamento di linee cellulari di mieloma multiplo, linfoma di Hodgkin, linfomi non-Hodgkin, macroglobulinemia di Waldenström e cellule leucemiche (30, 31). È stata anche osservata una possibile azione di superamento della resistenza al bortezomib e un'azione sinergica con questo (32).

Sono in corso le valutazioni per un possibile uso terapeutico di questa molecola, e la definizione di specifici trials clinici (33).

I flavonoidi

Alcuni flavonoidi sono in grado di inibire il proteasoma (34). In particolare l'epigallocatechingallato, che è un polifenolo contenuto nelle foglie di tè verde, è in grado di inibire l'attività del proteasoma in vitro e su linee cellulari tumorali (35). È noto che i flavonoidi sono antiossidanti cellulari naturali, ma non è stata osservata un'evidenza sperimentale della possibile attività anti-tumorale di queste molecole (36).

Curiosamente, i flavonoidi sono in grado di inibire selettivamente l'effetto anti-tumorale del bortezomib e di altri derivati boronici, probabilmente tramite un'interazione chimica diretta.

Per questo, è importante consigliare ai pazienti che fanno uso di farmaci come il bortezomib, di non assumere anche flavonoidi (37, 38).

Conclusioni

È ormai confermato che l'inibizione terapeutica del proteasoma ha un ruolo importante nel trattamento dei tumori.

Lo sviluppo di nuove molecole, dovrebbe essere considerato come importante obiettivo (39). In particolare, lo studio di nuove molecole dovrebbe essere finalizzato a identificare farmaci che possano essere usati anche in tumori solidi, e superare i problemi di resistenza e gli effetti collaterali che sono stati osservati nell'uso diffuso del bortezomib in diversi ambiti clinici.

Come abbiamo descritto, la possibilità di somministrare *per os* un analogo del bortezomib come l'MLN9708, faciliterà molto la sua applicazione in ambito ambulatoriale.

Infine, sono in corso studi che identificano le diverse molecole implicate nella formazione del proteasoma all'interno delle cellule, e che valutano le diverse fasi di formazione di questo complesso.

Un possibile futuro target terapeutico di inibizione, potrebbe infatti comprendere una delle diverse molecole che mediano l'assemblaggio delle diverse subunità del proteasoma (40).

Bibliografia

1. Orłowski RZ, Kuhn DJ. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res.* 2008; 14 (6): 1649-57.
2. Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev.* 2003; 29 (Suppl 1): 3-9.
3. Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science.* 2007; 315 (5809): 201-5.
4. Konstantinova IM, Tsimokha AS, Mittenberg AG. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2008; 267: 59-124.
5. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68: 1015-68.
6. Arendt CS, Hochstrasser M. Identification of the yeast 20S proteasome cat-

- alytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94 (14): 7156-61.
7. Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, et al. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem*. 1997; 272 (40): 25200-9.
 8. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol*. 2001; 8 (8): 739-58.
 9. de Bettignies G, Coux O. Proteasome inhibitors: Dozens of molecules and still counting. *Biochimie*. 2010; 92 (11): 1530-45.
 10. Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*. 2004; 5 (5): 417-21.
 11. Nencioni A, Grunebach F, Patrone F, et al. Proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond. *Leukemia*. 2007; 21 (1): 30-6.
 12. Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, et al. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood*. 2003; 101 (6): 2377-80.
 13. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99 (22): 14374-9.
 14. Nencioni A, Grunebach F, Patrone F, et al. The proteasome and its inhibitors in immune regulation and immune disorders. *Crit Rev Immunol*. 2006; 26 (6): 487-98.
 15. Dick LR, Fleming PE. Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2010; 15 (5-6): 243-9.
 16. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*. 2001; 61 (7): 3071-6.
 17. Shah JJ, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009; 23 (11): 1964-79.
 18. Kastritis E, Wechalekar AD, Dimopoulos MA, et al. Bortezomib with or without dexamethasone in primary systemic (light chain) amyloidosis. *J Clin Oncol*. 2010; 28 (6): 1031-7.
 19. Reece DL, Sanchawala V, Hegenbart U, et al. Phase I/II study of bortezomib in patients with systemic AL-amyloidosis. *J Clin Oncol*. 2007; 25 (Part I): No 18S; 8050 (Abstract).
 20. Kupperman E, Lee EC, Cao Y, et al. Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer Res*. 2010; 70 (5): 1970-80.
 21. Piva R, Ruggeri B, Williams M, et al. CEP-18770: A novel, orally active proteasome inhibitor with a tumor-selective pharmacologic profile competitive with bortezomib. *Blood*. 2008; 111 (5): 2765-75.
 22. Sanchez E, Li M, Steinberg JA, et al. The proteasome inhibitor CEP-18770 enhances the anti-myeloma activity of bortezomib and melphalan. *Br J Haematol*. 2010; 148 (4): 569-81.

23. Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA, et al. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res.* 2007; 67 (13): 6383-91.
24. Kuhn DJ, Orłowski RZ, Bjorklund CC. Second generation proteasome inhibitors: Carfilzomib and immunoproteasome-specific inhibitors (IPSI). *Curr Cancer Drug Targets.* 2011; 11 (3): 285-95.
25. O'Connor OA, Stewart AK, Vallone M, et al. A phase 1 dose escalation study of the safety and pharmacokinetics of the novel proteasome inhibitor carfilzomib (PR-171) in patients with hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 2009; 15 (22): 7085-91.
26. Parlati F, Lee SJ, Aujay M, et al. Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Blood.* 2009; 114 (16): 3439-47.
27. Zhou HJ, Aujay MA, Bennett MK, et al. Design and synthesis of an orally bioavailable and selective peptide epoxyketone proteasome inhibitor (PR-047). *J Med Chem.* 2009; 52 (9): 3028-38.
28. Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, et al. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus salinospora. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2003; 42 (3): 355-7.
29. Tsueng G, Teisan S, Lam KS. Defined salt formulations for the growth of *Salinispora tropica* strain NPS21184 and the production of salinosporamide A (NPI-0052) and related analogs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008; 78 (5): 827-32.
30. Miller CP, Ban K, Dujka ME, et al. NPI-0052, a novel proteasome inhibitor, induces caspase-8 and ROS-dependent apoptosis alone and in combination with HDAC inhibitors in leukemia cells. *Blood.* 2007; 110 (1): 267-77.
31. Roccaro AM, Leleu X, Sacco A, et al. Dual targeting of the proteasome regulates survival and homing in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood.* 2008; 111 (9): 4752-63.
32. Chauhan D, Singh A, Brahmandam M, et al. Combination of proteasome inhibitors bortezomib and NPI-0052 trigger in vivo synergistic cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood.* 2008; 111 (3): 1654-64.
33. Potts BC, Albitar MX, Anderson KC, et al. Marizomib, a proteasome inhibitor for all seasons: preclinical profile and a framework for clinical trials. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011; 11 (3): 254-84.
34. Nam S, Smith DM, Dou QP. Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2001; 276 (16): 13322-30.
35. Smith DM, Daniel KG, Wang Z, et al. Docking studies and model development of tea polyphenol proteasome inhibitors: applications to rational drug design. *Proteins.* 2004; 54 (1): 58-70.
36. Chen D, Wan SB, Yang H, et al. EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment. *Adv Clin Chem.* 2011; 53: 155-77.
37. Golden EB, Lam PY, Kardosh A, et al. Green tea polyphenols block the anti-

- cancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors. *Blood*. 2009; 113 (23): 5927-37.
38. Kim TY, Park J, Oh B, et al. Natural polyphenols antagonize the antimyeloma activity of proteasome inhibitor bortezomib by direct chemical interaction. *Br J Haematol*. 2009; 146 (3): 270-81.
39. Basse N, Montes M, Marechal X, et al. Novel organic proteasome inhibitors identified by virtual and in vitro screening. *J Med Chem*. 2010; 53 (1): 509-13.
40. Izumikawa M, Hashimoto J, Hirokawa T, et al. JBIR-22, an inhibitor for protein-protein interaction of the homodimer of proteasome assembly factor 3. *J Nat Prod*. 2010; 73 (4): 628-31.

Inibizione dei processi di metilazione del DNA

Valeria Santini, Alessandro Sanna

SOD di Ematologia, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

Le neoplasie solide ed ematologiche sono caratterizzate da alterazione dell'espressione e della funzione genica. Questa disregolazione è dovuta al concorrere di cause genetiche, quali alterazioni cromosomiche o mutazioni puntiformi, ma vi è crescente evidenza che le anomalie epigenetiche giocano un ruolo fondamentale.

L'eucromatina è quello stato della cromatina accessibile e disponibile ai fattori di trascrizione, nell'eterocromatina, invece il filamento di DNA è strettamente avvolto intorno al nucleo istonico, impedendo quindi la trascrizione del DNA. I due stati della cromatina sono regolati da una complessa serie di alterazioni chimiche, appunto epigenetiche.

Le modificazioni epigenetiche sono alterazioni del DNA e della cromatina, potenzialmente reversibili, trasmesse da una cellula alla sua progenie. Tra le modificazioni epigenetiche troviamo acetilazione, metilazione, fosforilazione e ubiquitinazione degli istoni, metilazione del DNA. Queste modificazioni sono in grado di alterare l'espressione genica, senza modificare la sequenza del DNA e senza aggiungere o rimuovere alcuna informazione genica.

La metilazione del DNA consiste nell'aggiunta di un gruppo CH₃ al carbonio in posizione 5 della citosina posta nella sequenza 5'-CpG-3'. I dinucleotidi CpG sono raggruppati nelle regioni promotrici del 50% dei geni umani. La metilazione di queste zone, dette isole CpG, determina il silenziamento genico. Questa alterazione epigenetica interviene in molti processi fisiologici, quali l'embriogenesi, la differenziazione, l'inattivazione X e l'invecchiamento, ma anche nella trasformazione tumorale.

Le alterazioni della metilazione del DNA nei tumori consistono in una ipometilazione globale del DNA ed una ipermetilazione aberrante localizzata delle isole CpG di alcuni specifici loci critici per il differenziamento cellulare.

Le DNA metiltransferasi (DNMT1, e 3) sono iperesprese nelle cellule neoplastiche. Tali proteine svolgono un ruolo attivo nella metilazione del DNA e nel reclutamento locale di cofattori, che richiamano proteine come le istone-deacetilasi (HDAC), che determineranno modificazioni di tipo epigenetico direttamente sul DNA prossimo alla zona ipermetilata. Queste modificazioni determinano un

assetto del DNA che lo rende inaccessibile alla trascrizione e portano a silenziamento genico.

La terapia epigenetica si basa sull'utilizzo di farmaci inibenti le istonedeacetilasi, molecole facenti parte dei complessi corepressivi, ma molto più impiegati in clinica sono gli inibitori delle DNMT, che bloccano questi enzimi, "intrappolandoli" in situ, senza rimuoverli dal nucleo. Una volta impedita l'attività delle DNMT, zone di DNA risulteranno nuovamente accessibili a fattori di trascrizione e a molecole co-attivatrici, ripristinando l'espressione genica.

I farmaci inibitori delle DNA metiltransferasi (DNMTi) sono stati sintetizzati negli anni '70 come farmaci citotossici da utilizzare in regimi chemioterapici (Santini 2001). Sono analoghi della citidina, in cui il residuo 5 del anello pirimidinico è stato sostituito con una molecola di azoto o di fluoro. Come analoghi pirimidinici vengono normalmente integrati nel filamento di DNA, ma la sostituzione ne impedisce la metilazione. Quando il filamento di DNA si replica, le DNMT dovrebbero metilare le citidine nel nuovo filamento, ma il residuo sostituito in posizione 5 ne blocca l'azione. Il nuovo filamento risulterà di conseguenza non metilato. La citosina arabinoside, non possedendo tale sostituzione, non è dotata di proprietà ipometilanti.

Gli inibitori delle DNA metiltransferasi sono attualmente approvati nella terapia della sindromi mielodisplastiche (SMD) e nelle leucemie acute pauciblastiche. Sono in corso numerosi studi per valutare l'efficacia e la sicurezza di questi farmaci in altre neoplasie ematologiche (mieloma multiplo, leucemia linfatica cronica ecc.) e non (tumore delle prostata, melanoma, tumore mammario et al.) I farmaci attualmente impiegati nella clinica sono analoghi azotati: 5-azacitidina e la 5-aza-deossicitidina.

Questi due farmaci sono stati approvati dal FDA nella terapia delle mielodisplasie di ogni livello di rischio. 5-azacitidina è inoltre approvata dall'EMA dal 2009 nel trattamento delle mielodisplasie a rischio IPSS INT-2 e alto e per le leucemie acute mieloide fino al 30% di blasti.

Nonostante siano farmaci analoghi ed agiscono entrambi inibendo le DNMT, questi due agenti hanno uno spettro e un meccanismo di azione differente. La 5-azacitidina si integra, infatti, prima nel RNA e poi nel DNA, la decitabina invece si integra solo e direttamente nel DNA. Questi farmaci hanno anche un effetto citotossico, ma quando sono stati utilizzati a dosaggi più elevati con intento aplastizzante, non hanno dimostrato una maggior efficacia rispetto alla citosina arabinoside, ma solo una maggior tossicità (Santini 2001).

È molto importante capire i cambiamenti nella regolazione genica indotti dagli agenti demetilanti in quanto il meccanismo di azione di questi farmaci è relativamente aspecifico e coinvolge probabilmente complessi effetti sui programmi trascrizionali che vanno ben oltre la loro azione sui singoli bersagli. Pertanto, l'obiettivo della terapia epigenetica è quello di sbloccare alcuni repressori trascrizionali, liberando sequenze promotrici o sequenze enhancer che siano pesantemente metilate nei cellule neoplastiche (Gore 2009, Das 2004).

A questo proposito, sono stati identificati numerosi geni oncosoppressori i cui livelli sono diminuiti nelle sindromi mielodisplastiche e vengono specificatamen-

te indotti dalla terapia ipometilante. Per esempio, è stato riscontrato che il trattamento con decitabina determina uno specifico aumento dell'espressione del CD9 nelle cellule CD 34+ mielodisplastiche. Da segnalare che l'espressione di questo gene è diminuita anche in numerosi tumori solidi e sembrerebbe correlare con una cattiva prognosi (Ghiachelia 2010).

È stata recentemente investigata la combinazione tra decitabina e la tricostatina A, un inibitore delle iston deacetilasi, per lo screening di geni sovraespressi in cellule di linea umana AML193. Gli autori di questo studio hanno identificato 7 geni consistentemente upregolati dalla terapia di associazione, fra cui 4 membri della famiglia delle metallotioneine (MT1H, MT1E, MT2A e MT1G). Questi geni sono considerati come importanti mediatori della detossificazione cellulare e sono indotti anche dall'intossicazione da metalli pesanti, radiazioni UV e ROS. Questi dati sono stati confermati anche da altri studi su cellule di pazienti affetti da leucemia acuta e su controlli non leucemici. Questi geni erano ipermetilati nei pazienti affetti da leucemia acuta, ma costantemente non metilati nei controlli sani. Questi dati suggeriscono che la metilazione di questi geni siano coinvolte nella patogenesi delle LAM (Scott 2009).

Recentemente è stato osservato che azacitidina e decitabina in cellule tumorali di linea derivate da carcinoma del colon e da leucemia acuta alterano la trascrizione del protooncogene cMet (una tirosin chinasi transmembrana recettore di *hepatocyte growth factor*). La terapia demetilante indurrebbe l'attivazione del promotore antisense di Line-1 che è presente all'interno del secondo introne del gene cMet. Questo provocherebbe un trascritto di fusione fra Line-1 e il protooncogene cMet (L1-cMet). L'aumento della trascrizione di L1-cMet provocherebbe una diminuzione dell'espressione di cMet e quindi in una riduzione del segnale del protooncogene (Weber 2010).

In letteratura, in effetti, sono stati tuttavia studiati pochi geni ipermetilati come marcatori, sia nelle sindromi mielodisplastiche (SMD) e in altre patologie ematologiche (P15INK4b; DAPkinasi; SOCS1; E-caderina; calcitonina) (Voso 2004, Teofili 2003) considerati indicativi per la prognosi e parzialmente per la risposta alla terapia. Certamente, il promotore di P15INK è ipermetilato in alta percentuale di pazienti affetti da SMD, per questo viene utilizzato come marker di ipermetilazione e, anche se rimane ancora dubbia la sua affidabilità, di risposta biologica. In pazienti affetti da SMD ad alto rischio, leucemia mielomonocitica cronica e leucemie acute mieloidi con displasia trattati con 5-azacitidina è stata valutata la metilazione del promotore di P15INK4b e di E-caderina. La durata della remissione completa non correlava con la metilazione di P15, ma l'ipermetilazione di E-caderina era significativamente associata ad una bassa percentuale di remissioni, ricadute precoci e sopravvivenza limitata (Grovdal 2010).

Recentemente è stato identificato il gene PI-PLCbeta1 come possibile precoce marcatore di risposta ai farmaci ipometilanti. È stato dimostrato infatti che il promotore di questo gene è ipermetilato in numerosi pazienti affetti da SMD, e che in campioni di sangue di pazienti trattati, la sua ipometilazione e l'aumento della concentrazione del mRNA di PI-PLCbeta1 correla strettamente con la risposta clinica ai farmaci ipometilanti (Follo 2009, Follo 2010).

In un recente studio, è stata valutata la metilazione del DNA in relazione alla prognosi. I pazienti con livelli di metilazione del DNA più elevati mostravano più corta sia la sopravvivenza che la sopravvivenza libera da malattia. Inoltre, la metilazione basale non correlava con la risposta alla terapia (con decitabina), ma è stato osservata una correlazione significativa tra la riduzione della metilazione e la risposta clinica (Shen 2010).

Sicuramente, la regolazione epigenetica dell'espressione genica in corso di neoplasie sia ematologiche che di altra origine, deve ancora essere ulteriormente chiarita, affinché si possano applicare con maggior successo terapie mirate a modificarla e a restaurare il fenotipo cellulare normale. Gli studi effettuati sulle alterazioni indotte dai farmaci inibitori delle DNMT non hanno ancora portato a certezze tali da permetterci di predire la sensibilità clinica a tali agenti, né hanno indicato dei marcatori di risposta applicabili in larga scala. Il meccanismo di azione di tali farmaci, infatti, presenta ancora molti aspetti da delucidare, non ultima la loro presunta sinergia con altre molecole, quali gli inibitori delle istonedeacetilasi, che contribuiscono al riassetto cromatinico, ma che in clinica non hanno dato gli effetti attesi sulla base biologica teorica.

Bibliografia

1. Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med.* 2001; 134: 573-586.
2. Gore SD. In vitro basis for treatment with hypomethylating agents and histone deacetylase inhibitors: can epigenetic changes be used to monitor treatment? *Leuk Res* 2009; 33 (Suppl 2): S2-6.
3. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 4632-42.
4. Giachelia M, D'Alo F, Fabiani E, et al. Gene expression profiling of myelodysplastic CD34+ hematopoietic stem cells treated in vitro with decitabine. *Leuk Res*: published online 23 September 2010, doi:10.1016/j.leukres.2010.07.022.
5. Scott SA, Pearson DS, Bainbridge MN, et al. cDNA Microarray Analysis of genes up-regulated by treatment with 5-AZA-2 β -Deoxycytidine in combination with trichostatin identifies aberrant metallothionein 1h promoter methylation at a high frequency in human AML. *ASH Annual Meeting Abstracts.* *Blood.* 2009; 104: 2036.
6. Weber B, Kimhi S, Howard G, et al. Demethylation of a LINE-1 antisense promoter in the cMet locus impairs Met signalling through induction of illegitimate transcription. *Oncogene.* 2010; 29: 5775-84.
7. Voso Mt, Scardocci A, Guidi F, et al. Aberrant methylation of DAP-kinase in therapy related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2004; 103: 698-700.
8. Teofili L, Martini M, Luongo M, et al. Hypermethylation of CpG Island in the promoter region of p15(INK4b) in acute promyelocytic leukemia represses

- p15(INK4b) expression and correlates with poor prognosis. *Leukemia*. 2003; 17: 919-924.
9. Grovdal M, Karimi M, Khan R, et al. Maintenance treatment with azacytidine for patients with high-risk myelodysplastic syndromes (MDS) or acute myeloid leukaemia following MDS in complete remission after induction chemotherapy. *Br J Haematol*. 2010; 150: 293-302.
 10. Follo MY, Finelli C, Mongiorgi S, Clissa C, Bosi C, Testoni N, Chiarini F, Ramazzotti G, Baccarani M, Martelli AM, Manzoli L, Martinelli G, Cocco L. Reduction of phosphoinositide-phospholipase C beta1 methylation predicts the responsiveness to azacitidine in high-risk MDS. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106 (39): 16811-6. Epub 2009 Sep 10.
 11. Follo MY, Mongiorgi S, Clissa C, et al. Epigenetic regulation of lipid signaling pathways in low-risk mds patients during azacitidine treatment. *ASH Annual Meeting Abstracts*. *Blood*. 2010; 116: 233.
 12. Shen L, Kantarjian H, Guo Y, et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2010; 28 (18): 3098.

Farmaci anti-angiogenici: come predire la risposta e ottimizzare la terapia

Francesco Bertolini

Laboratorio di Emato-Oncologia, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

La terapia anti-angiogenica del cancro inizia a offrire risultati clinicamente significativi. Studi clinici randomizzati hanno infatti dimostrato che i farmaci anti-VEGF, da soli o più spesso in associazione alla chemioterapia, possono migliorare la sopravvivenza o la sopravvivenza libera da malattia nei pazienti affetti da tumori del polmone, del colon-retto, della mammella, del rene e del sistema nervoso centrale (Kerbel, NEJM 2009) Tuttavia, i meccanismi che governano la genesi e la stabilizzazione dei vasi tumorali sono estremamente complessi e - con ogni probabilità finemente regolati con importanti differenze tra paziente e paziente. Per questi motivi - e per la necessità di ottimizzare la spesa sanitaria - appare sempre più necessario individuare il farmaco più appropriato per ogni singolo paziente.

Nel campo della terapia anti-angiogenica la strategia per risolvere la necessità di trattamenti “personalizzati” deve affrontare un problema nuovo. Nell’era dei trattamenti chemioterapici, infatti, la dose ottimale dei farmaci veniva cercata ed identificata mediante la formula della “dose massima tollerabile”, e la risposta alla terapia veniva valutata mediante la quantificazione diretta delle dimensioni del tumore. Con i farmaci anti-angiogenici, invece, entrambi questi concetti devono essere riconsiderati. Lo scopo della terapia, infatti, può non essere necessariamente la riduzione del tumore, ma la sua stabilizzazione, e comunque il blocco di un eventuale processo di metastatizzazione. Questi nuovi farmaci, inoltre, hanno significativamente meno effetti collaterali rispetto ai chemioterapici, quindi va ricercata quella che viene oggi chiamata la “dose biologica ottimale”. Quest’ultimo obiettivo, tuttavia, richiede la disponibilità di un test standardizzato e riproducibile in grado di misurare l’attività anti-angiogenica di un farmaco.

In laboratorio le proprietà anti-angiogeniche delle molecole vengono di norma valutate in saggi complessi (e comunque non riproducibili nei pazienti) quali - per esempio - la formazione in vitro di strutture tubulari da parte delle cellule endoteliali. A livello preclinico sono stati sviluppati saggi differenti (come la generazione di vasi nella cornea dopo impianto di pellet di fattori di crescita angiogenici) ma comunque assolutamente non applicabili allo scenario clinico.

I primi tentativi di misurare l’efficacia della terapia anti-angiogenica nei pazienti sono stati basati sulla misurazione mediante microscopia ottica della densità dei

vasi nel tessuto tumorale (microvessel density). Questa misura è tuttavia basata sul rapporto tra cellule endoteliali e cellule tumorali, ed appare inadatta a quantificare in modo standardizzato e riproducibile l'efficacia della terapia, in primo luogo perché la lettura è manuale e legata a variabili soggettive, in secondo luogo perché il rapporto tra cellule endoteliali e cellule tumorali appare significativamente diverso in diverse aree tumorali, in terzo luogo perché una cinetica diversa di riduzione quantitativa tra le cellule endoteliali e quelle tumorali può offrire risultati paradossi come l'innalzamento della densità dei vasi nei tumori che rispondono brillantemente alla terapia anti-angiogenica con una veloce riduzione del numero delle cellule tumorali (vedi a questo proposito la review di Hlatky Et al. "Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us" su *J Natl Cancer Inst* 2002).

Sono stati inoltre misurati i livelli circolanti di diversi fattori di crescita ad attività pro-angiogenica quali VEGF, b-FGF, HGF, IL-8, etc. In diverse patologie i livelli alla diagnosi di uno o più di questi fattori di crescita sono in grado di predire la sopravvivenza, ma nessuno studio ha sino ad ora dimostrato in modo convincente la possibilità di misurare queste molecole per validare l'attività anti-angiogenica di un farmaco.

Vi sono oggi due tecniche che si candidano a predire con efficacia l'attività anti-angiogenica dei farmaci. La prima è basata sulla risonanza magnetica a contrasto dinamico, un sistema di imaging in grado di offrire importanti informazioni sul microambiente tumorale. Questo metodo permette di misurare il flusso ematico, la permeabilità dei microvasi, le loro dimensioni, l'ossigenazione dei tessuti ed il loro metabolismo. Questa tecnica è già stata utilizzata per confermare l'attività anti-angiogenica di diversi farmaci studiati in trials di fase I o II. È necessario tuttavia disporre di apparecchi estremamente sofisticati che sono oggi utilizzati in pochissimi centri di ricerca.

Un'altra tecnica in corso di definitiva validazione si basa sulla misurazione mediante citofluorimetria a flusso delle cellule endoteliali circolanti (CEC) e/o dei progenitori endoteliali circolanti (PEC). Alcuni anni fa è stato infatti osservato che nel sangue periferico sono presenti minute popolazioni di PEC, progenitori del sistema endoteliali/vascolare (normalmente risiedenti nel midollo osseo) e cellule endoteliali mature (CEC). Si tratta di due popolazioni morfologicamente, fenotipicamente e funzionalmente distinte. Le CEC appaiono derivare - nei soggetti sani - dai fenomeni di turnover vascolare, e sono per lo più apoptotiche. I PEC sono invece coinvolti nei fenomeni di riparazione vascolare.

Il nostro laboratorio ha osservato che le CEC sono significativamente aumentate (e meno apoptotiche) nei pazienti affetti da patologie neoplastiche, e che il loro numero ritorna a livelli di normalità dopo la rimozione chirurgica del tumore o dopo la guarigione mediante chemioterapia. La valutazione delle CEC e PEC nei modelli preclinici, inoltre, ha permesso di osservare che la cinetica di crescita di queste cellule è parallela a quella dei tumori, e che la somministrazione di farmaci ad attività anti-angiogenica si associa a significative variazioni nel numero e nella vitalità delle CEC e dei PEC (Bertolini et al., *Nature Reviews Cancer* 2006; Mancuso e coll, *Clin Cancer Res* 2009). Un studio collaborativo con la Università

di Toronto ha identificato una significativa correlazione tra il numero di CEC e PEC e risultati dei saggi preclinici “classici” (come la densità vascolare indotta nella cornea), ed ha dimostrato come CEC e PEC possano essere utilizzate nei modelli preclinici per definire la dose ottimale di una serie di farmaci ad attività anti-angiogenica (Shaked et al., *Cancer Cell* 2005). La misurazione di CEC e PEC in una serie di trials clinici di fase II e III ha recentemente confermato il potenziale di questa misurazione come marcatore surrogato di angiogenesi e risposta alla terapia anti-angiogenica (Dellapasqua e coll, *JCO* 2008; Calleri e coll, *Clin Cancer Res* 2009; Roodhart et al., *Neoplasia* 2010). Sono attualmente in corso alcuni studi collaborativi internazionali per definire un protocollo standardizzato per la misurazione di CEC e PEC negli studi preclinici e nei trials clinici.

Bibliografia

1. Kerbel RS. Tumor angiogenesis, *New Engl J Med*. 2008; 358: 2039-49.
2. Jain RK, Duda DG, Willett CG, Sahani DV, Zhu AX, Loeffler JS, Batchelor TT, Sorensen AG. Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy, *Nat Rev Clin Oncol*. 2009; 6: 327-38.
3. Murukesh N, Dive C, Jayson GC. Biomarkers of angiogenesis and their role in the development of VEGF inhibitors, *Br J Cancer*. 2010; 102: 8-18.
4. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target, *Nature*. 2005; 438: 967-74.
5. Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer?, *Science*. 2006; 312: 1171-5.
6. Bergers G., Hanahan D. Models of resistance of anti-angiogenic therapy, *Nat Rev Cancer*. 2008; 8: 592-603.
7. Bertolini F, Mancuso P, Braidotti P, Shaked Y, Kerbel RS. The multiple personality disorder phenotype(s) of circulating endothelial cells in cancer, *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1796: 27-32.
8. Shaked Y, Voest EE. Bone marrow derived cells in tumor angiogenesis and growth: are they the good, the bad or the evil?, *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1796: 1-4.
9. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us, *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94: 883-93.
10. Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM, Haubitz M, Hebbel RP, Lip GY, Mancuso P, Sampol J, Solovey A, Dignat-George F. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease, *Thromb Haemost*. 2005; 93: 228-35.
11. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification, *Nat Rev Cancer*. 2006; 6: 835-45.
12. Mancuso P, Antoniotti P, Quarna J, Calleri A, Rabascio C, Tacchetti C, Braidotti P, Wu HK, Zurita AJ, Saronni L, Cheng JB, Shalinsky DR, Heymach

- JV, Bertolini F. Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses, *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 267-73.
13. Seandel M, Butler J, Lyden D, Rafii S. A catalytic role for proangiogenic marrow-derived cells in tumor neovascularization, *Cancer Cell.* 2008; 13: 181-183.
 14. Calleri A, Bono A, Bagnardi V, Quarna J, Mancuso P, Rabascio C, Dellapasqua S, Campagnoli E, Shaked Y, Goldhirsch A, Colleoni M, Bertolini F. Predictive Potential of Angiogenic Growth Factors and Circulating Endothelial Cells in Breast Cancer Patients Receiving Metronomic Chemotherapy Plus Bevacizumab, *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 7652-7.
 15. Dellapasqua S, Bertolini F, Bagnardi V, Campagnoli E, Scarano E, Torrisi R, Shaked Y, Mancuso P, Goldhirsch A, Rocca A, Pietri E, Colleoni M. Metronomic cyclophosphamide and capecitabine combined with bevacizumab in advanced breast cancer, *J Clin Oncol.* 2008; 26: 4899-905.
 16. Mancuso P, Colleoni M, Calleri A, Orlando L, Maisonneuve P, Pruneri G, Agliano A, Goldhirsch A, Shaked Y, Kerbel RS, Bertolini F. Circulating endothelial cell kinetics and viability predict survival in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapy, *Blood.* 2006; 108: 452-9.
 17. Roodhart JM, Langenberg MH, Vermaat JS, Lolkema MP, Baars A, Giles RH, Witteveen EO, Voest EE. Late release of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells after chemotherapy predicts response and survival in cancer patients, *Neoplasia.* 2010; 12: 87-94.

Targeted therapies con anticorpi monoclonali

Marino Clavio, Marco Gobbi

Clinica Ematologica, Università di Genova

Sono ormai trascorsi più di 35 anni dalla introduzione della tecnologia degli anticorpi monoclonali da parte di Kohler e Milstein, che per questo ricevettero il premio Nobel nel 1984.

L'impatto dei nuovi reagenti è stato determinante nella diagnostica delle malattie linfoproliferative ed essenziale è stato il contributo nello studio della fisiopatologia del sistema immunitario. La classificazione dei linfomi WHO è stata resa possibile proprio dalla applicazione degli anticorpi monoclonali allo studio di queste malattie.

La prima forma di utilizzo terapeutico risale a "OKT 3" nel rigetto acuto degli organi trapiantati approvato dall'FDA nel 1986.

L'uso in vivo di un anticorpo murino provocava tuttavia una reazione immunitaria importante, e la conseguente impossibilità di intraprendere trattamenti con somministrazioni ripetute. La manipolazione biologica di queste molecole (ingegnerizzazione) ha permesso di superare molti ostacoli e di ottenere una serie di prodotti capaci di esercitare attività biologica a livello terapeutico. In questa review ci soffermeremo sui prodotti di interesse ematologico tralasciando la vasta platea di quelli dedicati alla oncologia solida.

Al momento attuale le principali categorie di anticorpi monoclonali terapeutici sono le seguenti:

- 1) Anticorpi umanizzati dove solo la regione ipervariabile rimane murina e tutto il resto è umano; una seconda generazione ha aumentato la porzione umana lasciando dell'originale murino solo pochi elementi del sito combinatorio. Questi prodotti svolgono la loro attività attraverso i meccanismi fisiologici propri della risposta immunitaria anticorpale (citotossicità complemento mediata e ADCC, citotossicità cellulo mediata anticorpo dipendente).
- 2) Anticorpi bi-specifici dove i 2 siti combinatori della molecola riconoscono due differenti target antigenici; numerosi sono gli esempi e le applicazioni di questa tecnologia che nell'ultimo periodo sembra aver finalmente generato prodotti terapeuticamente rilevanti. Tra le varie possibilità, una delle più esplorate è quella di portare a contatto del target, riconosciuto da una parte della molecola, una cellula effettrice (linfocita T) legata al sito combinatorio dell'altra metà.

- 3) Anticorpi come vettori di sostanze tossiche, immunotossine, oppure farmaci antitumorali. In questo caso l'anticorpo veicola la sostanza tossica sulla superficie della cellula target e ne favorisce la penetrazione all'interno.
- 4) Anticorpi vettori di radioisotopi per ottenere una radioterapia a livello cellulare. Con lo stesso meccanismo il radioisotopo non solo raggiunge la cellula target, ma produce effetti anche nel microambiente circostante per un raggio di alcuni millimetri.

Parleremo quindi degli anticorpi monoclonali utilizzati nella terapia dei linfomi e delle sindromi linfoproliferative (Rituximab, Ofatumumab, Zevalin, Bexxar, Campath, ed altri) e del gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg).

La lista degli anticorpi monoclonali utilizzati nella terapia delle sindromi linfoproliferative di origine B cellulare è molto lunga. Il CD20 è il target di rituximab, di anticorpi umanizzati o umani, il CD23 è il target di Lumiliximab, il CD22 il target dell'lepratumumab, il CD80 del galiximab, il CD74 del milatumumab, il CD40 di SGN40, il VEGF è target del bevacizumab, il DRD è il target di anti-TRAIL ma la lista di monoclonali in fase preclinica o già in sperimentazione clinica sarebbe molto più lunga. Il bersaglio antigenico ideale, come ben noto dovrebbe essere limitato alle cellule neoplastiche, avere una sufficiente espressione per permettere il legame con l'anticorpo, non dovrebbe né internalizzare né essere solubile in modo da permettere che l'anticorpo raggiunga la cellula tumorale.

I primi anticorpi monoclonali utilizzati per pazienti con linfomi B erano diretti all'idiotipo, la regione ipervariabile dell'immunoglobulina, l'unico marker clonale davvero specifico. Nonostante l'osservazione di una buona efficacia clinica questo approccio è stato abbandonato per motivi economici (era necessario produrre un anticorpo specifico per ogni paziente), per la comparsa di risposte immuni contro l'anticorpo e per l'emergenza di cellule neoplastiche idiotope-negative alla progressione della malattia (1, 2).

Il CD20 rappresenta un target ideale in quanto è espresso in modo stabile sulla maggioranza delle cellule B. La maggior parte delle cellule B tumorali esprime l'antigene di superficie CD20 ma i livelli di espressione variano in base al sottotipo di linfoma. L'espressione di CD20 inizia fin dagli stadi precoci dello sviluppo dei linfociti (pre-B), viene ampiamente persa nel corso del differenziamento cellulare ed è assente su cellule staminali ematopoietiche e sulle plasmacellule. Il Rituximab è un anticorpo monoclonale chimerico diretto contro il CD20, composto da una porzione variabile murina (derivante dall'anticorpo 2B8) legata ad una componente Fc umana. È stato approvato inizialmente dall'FDA sulla base di uno studio su 166 pazienti con NHL indolente refrattario e ricaduto in cui circa la metà dei pazienti ottennero una risposta clinica, spesso di lunga durata (3). Numerosi studi randomizzati in cui rituximab è stato associato a diversi schemi chemioterapici hanno mostrato sia un incremento delle risposte complete sia un incremento della sopravvivenza, rispetto alla sola chemioterapia, aprendo la strada all'utilizzo in prima linea (4, 5). Altri studi hanno dimostrato poi la grande efficacia del farmaco in altri istotipi di linfoma indolente (linfoma della zona marginale, malattia di Waldenström, SLL) (6, 7). Venne successivamente messa a punto una terapia di mantenimento in grado di prolungare la durata della risposta e,

forse, la sopravvivenza, almeno nei pazienti pretrattati (8). Dato che in monoterapia rituximab induce risposte di breve durata in un terzo circa dei pazienti con linfoma diffuso B a grandi cellule il farmaco venne associato a CHOP o protocolli simili. Sono ben noti i risultati dello studio del gruppo GELA nei pazienti anziani con linfoma diffuso a grandi cellule che riportarono con l'associazione di R un incremento di risposte complete, EFS ed OS rispetto al braccio CHOP (9), risultati che sono poi stati confermati recentemente con un follow up di dieci anni (10) ed in altri studi, in pazienti giovani e di età più avanzata (11, 12). Attualmente l'associazione R-CHOP rappresenta la terapia standard per i linfomi diffusi a grandi cellule e sembra anche essere in grado di superare il valore prognostico negativo che gli studi di gene expression profile hanno attribuito al sottotipo activated B-cell (13), sebbene su questo aspetto il dibattito sia ancora aperto.

Sono attualmente in commercio due radioimmunocongiugati specifici per il CD20: ibritumomab tiuxetan legato ad yttrio 90 (Zevalin) e tositumomab, legato a iodio-131 (Bexxar) approvati per la terapia dei pazienti con linfoma follicolare ricaduto-refrattario. Circa l'80% dei pazienti con linfomi follicolari o a basso grado rispondono al trattamento con ibritumomab tiuxetan, con circa il 20-30% di risposte complete ed una durata media della risposta di circa un anno (14-16). In uno studio due terzi dei pazienti refrattari alla chemioterapia ottennero risposta (completa nel 20%). La percentuale di risposte a tositumomab legato a iodio-131 fra i pazienti refrattari a rituximab è stata del 63%, con il 29% di risposte complete (17, 18). In uno studio il 95% dei pazienti con NHL non pretrattati ottennero una risposta a 131I-labeled tositumomab, con il 75% di risposte complete (19).

La ricerca sta cercando di migliorare la molecola di rituximab introducendo modifiche che permettano il legame ad un miglior epitopo, che consentano un legame più forte al CD20, con successiva migliore attivazione della citotossicità cellulare anticorpo dipendente e più efficiente attivazione dell'apoptosi.

In questa linea appare molto interessante l'ofatumumab (HuMax-CD20, Genmab), un anticorpo monoclonale totalmente umano di tipo IgG1 κ che è diretto verso un nuovo epitopo del CD20. Nel CD20 sono presenti infatti 2 anse extracellulari alle quali possono legarsi gli anticorpi monoclonali, una più ampia (cui si lega il rituximab) ed una più piccola (cui si lega ofatumumab). Gli studi pre-clinici indicano che, rispetto a rituximab, ofatumumab mostra un'augmentata capacità di legame al CD20 ed induce una più elevata citotossicità complemento-dipendente, probabilmente perché si dissocia meno dall'antigene ed interagisce meglio con la componente complementare C1q. Ofatumumab elimina più efficacemente di rituximab le cellule con bassa densità di superficie di CD20, come ad esempio le cellule di B-CLL e sembra essere attivo anche su cellule resistenti a rituximab.

Nei trials clinici i pazienti con linfoma follicolare e CLL hanno ottenuto risposte cliniche caratterizzate da profonda deplezione di cellule CD19+CD5+, con un profilo di tossicità simile a quello del rituximab (20,21). Wierda et al. hanno riportato i risultati di uno studio clinico internazionale per valutare l'efficacia e la sicurezza di ofatumumab in 138 pazienti affetti da CLL, refrattari a fludarabina e

alemtuzumab o con linfadenomegalie bulky refrattarie (LF). I pazienti hanno ricevuto 8 infusioni settimanali di ofatumumab seguite da 4 infusioni mensili in un periodo di trattamento di 24 mesi (prima dose 300 mg, dosi successive, 2000 mg). Il response rate globale è stato del 5% e del 47% nei gruppi fludarabina-alemtuzumab e LF, rispettivamente, con una mediana di PFS di 5.7 e 5.9 mesi (22). GA101 è un anticorpo umanizzato che ha subito modifiche del frammento Fc tali da migliorare l'interazione con FcγR e, pertanto incrementare l'ADCC. Dopo le prime promettenti sperimentazioni in vitro il farmaco è entrato nella sperimentazione clinica per il trattamento di LLC e linfomi B cellulari, ricaduti, refrattari a rituximab e sono state riportate risposte cliniche variabili dal 30 al 63%. Il response rate era correlato con la percentuale di pazienti refrattari a rituximab, con il numero di linee precedenti di trattamento e con la dose di GA101 (23, 24).

Un altro anticorpo umanizzato, hA20 (IMMU-106), è in grado di indurre apoptosi di cellule B in vitro e citotossicità cellulare anticorpo dipendente e complemento dipendente (25). I primi studi clinici sembrano documentare interessanti risposte cliniche a questo anticorpo (25, 26). Nonostante siano trascorsi quasi trent'anni dalla scoperta di CD20 e di tositumomab molto rimane ancora da indagare sui meccanismi effettori che hanno come bersaglio il CD20 (ad esempio il ruolo del complemento e dei recettori FcγR sulle cellule effettrici) e sui meccanismi che stanno alla base della resistenza a rituximab.

Di fronte alla notevole quantità di nuovi prodotti che sono entrati nella sperimentazione clinica è necessario un atteggiamento critico che ci consenta di discernere quali rappresentino un reale progresso terapeutico, sia per efficacia, sia per tossicità, rispetto a rituximab (27).

Alemtuzumab è un anticorpo monoclonale umanizzato anti-CD52 che è stato approvato per il trattamento della CLL. Circa il 30% dei pazienti in progressione dopo alchilanti e fludarabina ha ottenuto una risposta ad alemtuzumab (28, 29). Quando il farmaco è utilizzato come terapia iniziale la percentuale di risposte sale al 90% (30). La somministrazione sottocutanea è gravata da minori effetti collaterali ed è attualmente quella più ampiamente utilizzata (31). Lo studio di Hillmen ha dimostrato la superiorità di alemtuzumab nei pazienti con anomalie genetiche; a questo riguardo alemtuzumab è risultato particolarmente attivo in presenza di mutazioni di p53 e delezioni 17p (30). Vi sono esperienze cliniche che indicano che l'utilizzo di alemtuzumab come consolidamento riduce la malattia minima residua e migliora l'outcome a lungo termine (33-35) ma l'utilizzo in questo setting non è raccomandato per il rischio di immunosoppressione.

La molecola CD80 ha effetto costimolatorio ed è presente sulle cellule B. Galiximab (Biogen Idec) è un monoclonale chimerico anti-CD80 con documentata attività antilinfomatosa in vivo. Circa il 15% dei pazienti con NHL follicolare ricaduto sembra rispondere a galiximab, con alcune risposte ottenute dopo prolungato trattamento (36). Il farmaco appare ben tollerato. Sulla base dei dati pre-clinici indicanti una sinergia il farmaco è stato associato al rituximab: i primi risultati sembrano indicare una maggiore efficacia della terapia di combinazione rispetto a galiximab in monoterapia (37). Il gruppo CALGB ha testato la combi-

nazione di galiximab e rituximab come terapia iniziale in pazienti con linfoma follicolare, riportando un response rate del 69% (RC 41%) (38).

Il CD22 è ampiamente espresso su cellule B e può essere importante nell'attivazione B linfocitaria, nella modulazione del signaling antigene-recettore e nel ricircolo sulla superficie cellulare dei recettori. Epratuzumab (Immunomedics), è un anticorpo monoclonale umanizzato IgG1 anti-CD22 che ha indotto risposte nel 24% dei pazienti con linfoma follicolare e nel 15% dei pazienti linfoma DLBC ricaduto, senza importanti effetti collaterali (39-40) Sembra promettente l'associazione con rituximab (41) ed è in corso uno studio randomizzato.

Il lumiliximab (Biogen Idec), un monoclonale chimerico macaco-umano anti CD23 lega il complemento ed è in grado di mediare citotossicità cellulare anti-corpo-dipendente. Nella CLL sembra avere una limitata efficacia in monoterapia ma dati in vitro suggeriscono un effetto sinergico con fludarabina e rituximab.(42). Se associato alla combinazione fludarabina, ciclofosfamide e rituximab lumiliximab sembra indurre un incremento delle risposte complete (43).

Il blinatumomab (MT103) è un monoclonale bispecifico con specificità per CD19 e CD3, che appartiene alla classe dei T-cell engager (BiTE: bispecific T cell engager) (44). Esistono numerose evidenze sperimentali che i linfociti T citotossici autologhi possono svolgere un importante ruolo nel controllo delle neoplasie epiteliali, ma i risultati dell'immunoterapia adottiva sono stati fino ad oggi modesti. Blinatumomab e' stato ideato con la finalità di arruolare i linfociti T per una lisi mirata dei linfociti esprimenti il CD19 e di potenziare l'attivazione dei linfociti attraverso l'interazione con la componente invariante CD3 del T cell receptor. I primi dati sull'utilizzo clinico in pazienti con NHL sono stati pubblicati nel 2008 (45) e sono stati aggiornati nell'ASH del 2010, con un totale di 62 pazienti, per lo più affetti da MCL, FL, DLBCL in stadio III-IV, con molte linee di trattamento (46). I pazienti trattati con blinatumomab in monoterapia in infusione continua per 4-8 settimane alla dose di 60 µg/m²/day hanno mostrato un response rate complessivo dell'82% (18 risposte su 22 pazienti); le risposte sono state 11/12 nei linfomi follicolari e marginali, 3/5 nei DLBCL e 4/5 nei MCL. Le risposte stanno continuando in 11/18 pazienti (61%), con una mediana di durata di circa 3 anni. In questo trial di fase I, i principali eventi avversi sono stati sintomi di tipo pseudoinfluenzale, linfopenia e tossicità reversibile a carico del SNC (tremore, encefalopatia, afasia, sintomi cerebellari, convulsioni). Per quanto concerne la leucemia acuta linfoblastica 21 pazienti con B-ALL, positivi per malattia minima residua sono stati trattati con ripetuti cicli di blinatumobab in infusione endovenosa continua per 4 settimane. Blinatumomab ha indotto una risposta molecolare completa nell'80% dei pazienti valutabili (16/20). Queste risposte furono rapide, tutte osservate dopo il primo ciclo di trattamento e sono state osservate anche in pazienti con Ph+ ALL, e ALL con t(4;11) La mediana di DFS non è stata ancora raggiunta dopo un follow up mediano di 27.5 mesi . Non è stato osservato un sostanziale aumento di infezioni (47, 48). Molto recente la segnalazione dell'ottenimento di una RC in 3 pazienti pediatriche con ricaduta post-trapianto di ALL, dopo somministrazione di blinatumomab al dosaggio di 15 µg/m²/ die per 5 settimane (49).

Sebbene non esista un'antigene specifico per la leucemia mieloide acuta, il CD33 rappresenta una molecola interessante in quanto è espressa frequentemente sulle cellule leucemiche. L'immunocongiugato gemtuzumab ozogamicin (GO) è un anticorpo monoclonale anti-CD33 coniugato con la calicheamicina, che si internalizza dopo legame con l'epitopo permettendo all'antibiotico citotossico di esercitare in modo relativamente specifico la sua azione (50). Il farmaco si è dimostrato efficace in pazienti con malattia in ricaduta sebbene i dosaggi iniziali (9 mg/m²) siano stati gravati da una importante tossicità, soprattutto epatica (51-52). Più recentemente è stato utilizzato a dosaggio inferiore (3 µg/m²), in associazione con chemioterapia di induzione e di consolidamento e anche come terapia di mantenimento (53) con buona efficacia antileucemica e ottima tollerabilità prevalentemente in pazienti di età superiore a 60 anni. Recentemente, sulla base dei risultati del trial randomizzato MRC AML15, è stato evidenziato che l'associazione di GO migliora la sopravvivenza nei pazienti con citogenetica favorevole, mentre è documentato solo un trend per una migliore sopravvivenza in quelli con cariotipo di significato intermedio; non è stato documentato viceversa nessun beneficio per i pazienti con cariotipo sfavorevole (54).

Questa breve rassegna cerca di offrire una istantanea di una realtà in movimento sempre più rapido. Gli anticorpi monoclonali stanno realizzando il progetto di curare le neoplasie ematologiche limitando l'uso di citotossici convenzionali. Per il momento osserviamo l'impressionante vantaggio terapeutico ottenuto in questi primi anni di esperienza.

Bibliografia

1. Miller RA, Maloney DG, Warnke R et al. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody. *N Engl J Med.* 1982; 306: 517-22.
2. Rankin EM, Hekman A, Somers R et al. Treatment of two patients with B cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibodies. *Blood.* 1985; 65: 1373-81.
3. McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy of relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol.* 1998; 16: 2825-33.
4. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood.* 2005; 106: 3725-32.
5. Marcus R, Imrie K, Solal-Celigny P et al. Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 4579-86.
6. Foran JM, Rohatiner AZ, Cunningham D, et al. European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly

- diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 317-24.
7. Treon SP, Agus DB, Link B, et al. CD20-directed antibody-mediated immunotherapy induces responses and facilitates hematologic recovery in patients with Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Immunother.* 2001; 24:272-9.
 8. van Oers MH, Van Glabbeke M, Giurgea L et al. Rituximab maintenance treatment of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin's lymphoma: long-term outcome of the EORTC 20981 phase III randomized intergroup study. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 2853-8.
 9. Coiffier B, Lepage E, Brière J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002; 346: 235-42.
 10. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E et al. , Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood.* 2010; 116: 2040-5.
 11. Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2006; 7: 379-91.
 12. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 3121-7.
 13. Nyman H, Adde M, Karjalainen Lindsberg ML, et al. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood.* 2007; 109: 4930-5.
 14. Wiseman GA, Gordon LI, Multani PS, et al. Ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma and mild thrombocytopenia: a phase II multicenter trial. *Blood.* 2002; 99: 4336-42.
 15. Witzig TE, White CA, Wiseman GA, et al. Phase I/II trial of IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20(+) B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 3793-803.
 16. Gordon LI, Molina A, Witzig T, et al. Durable responses after ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for CD20+ B-cell lymphoma: long-term follow-up of a phase 1/2 study. *Blood.* 2004; 103: 4429-31.
 17. Kaminski MS, Zelenetz AD, Press OW, et al. Pivotal study of iodine I 131 tositumomab for chemotherapy-refractory low grade or transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 3918-28.
 18. Horning SJ, Younes A, Jain V, et al. Efficacy and safety of tositumomab and iodine-131 tositumomab (Bexxar) in B-cell lymphoma, progressive after rituximab. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 712-9.

19. Kaminski MS, Tuck M, Estes J, et al. 131I-tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma. *N Engl J Med.* 2005; 352: 441-9.
20. Coiffier B, Lepage S, Pedersen LM, et al. Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: a phase 1-2 study. *Blood.* 2008; 111: 1094-100.
21. Coiffier B, Tilly H, Pedersen LM, et al. Significant correlation between survival endpoints and exposure to ofatumumab (HuMax-CD20) in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2006; 108: 804a-805a. abstract.
22. Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, et al. Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 1749-55.
23. Salles G, Cartron G et al. A phase I/II study of GA101 in patients with relapsed/refractory CD20+ malignant disease. *Blood.* 2008; 112 (11), abstr. 234.
24. Salles A, Morschhauser F, Thieblemont C et al. Promising efficacy with the new anti-CD20 antibody GA101 in heavily pre-treated patients: first results from a phase II study in patients with relapsed-refractory indolent NHL. *Haematologica.* 2010; 95 (Suppl 2); abstr. 558.
25. Stein R, Qu Z, Chen S, et al. Characterization of a new humanized anti-CD20 monoclonal antibody, IMMU-106, and its use in combination with the humanized anti-CD22 antibody, epratuzumab, for the therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 2868-78.
26. Morschhauser F, Leonard JP, Coiffier B, et al. Initial safety and efficacy results of a second-generation humanized anti-CD20 antibody, IMMU-106 (hA20), in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 2005; 106 (Suppl): 683a. abstract.
27. Alduaij W and Illidge TM. The future of anti-CD20 monoclonal antibodies: are we making progress? *Blood.* 2011; 117: 2993-3001.
28. Keating MJ, Flinn I, Jain V, et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood.* 2002; 99: 3554-61.
29. Rai KR, Coutre S, Rizzieri D, et al. Efficacy and safety of alemtuzumab (Campath-1H) in refractory B-CLL patients treated on a compassionate basis. *Blood.* 2001; 98: 365a. abstract.
30. Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, et al. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 5616-23.
31. Lundin J, Kimby E, Björkholm M, et al. Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood.* 2002; 100: 768-73.
32. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukaemia with p53 mutations and deletions. *Blood.* 2004; 103: 3278-81.

33. Rai KR, Byrd J C ,Peterson BL,et al.A phase II trial of fludarabine fo lloved by alemtuzumab (Campath-1H) in previously untreated chronic lymphocytic leukaemia (CLL) patients with active disease. *Cancer and Leukemia*. 2009; GroupB (CALGB) Study 199 (abstract no.772). *Blood*. 2002; 100 (Suppl. 1):.205.
34. Montillo M, Tedeschi A ,Miqueleiz S, et al. Alemtuzumab as consolidation after a response to fludarabine is effective in purging residual disease in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 2337-42.
35. Sweighofer CD, Ritgen M, Eichhorst BF,et al.Consolidation with alemtuzumab improves progression-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL) in first remission:long-term follow-up of a randomized phase III trial of the German CLLStudy Group (GCLLSG).*Br J Haematol*. 2009; 144: 95-8.
36. Czuczman MS, Thall A, Witzig TE, et.al. Phase I/II study of galiximab, an anti-CD80 antibody, for relapsed or refractory follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 4390-8.
37. Leonard JP, Friedberg JW, Younes A, et al. A phase I/II study of galiximab (an anti-CD80 monoclonal antibody) in combination with rituximab for relapsed or refractory, follicular lymphoma. *Ann Oncol*. 2007; 18: 1216-23.
38. Czuczman M, Johnson JL, Jung S-H, Cheson BD. A phase II trial of extended induction galiximab ([G] anti-CD80 monoclonal antibody) plus rituximab (R) in previously untreated follicular lymphoma (FL): initial report of CALGB study 50402. *Ann Oncol* (in press).
39. Leonard JP, Coleman M, Ketas JC, et al. Phase I/II trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 3051-9.
40. Leonard JP, Coleman M, Ketas JC, et al. Epratuzumab, a humanized anti-CD22 antibody, in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: phase I/II clinical trial results. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 5327-34.
41. Leonard JP, Coleman M, Ketas J, et al. Combination antibody therapy with epratuzumab and rituximab in relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 5044-51.
42. Pathan NI, Chu P, Hariharan K, Cheney C, Molina A, Byrd J. Mediation of apoptosis by and antitumor activity of lumiliximab in chronic lymphocytic leucemia cells and CD23+ lymphoma cell lines.*Blood*. 2008; 111: 1594-602.
43. Byrd JC, Castro J, O'Brien S, et al. Comparison of results from a phase I / II study of lumiliximab (anti-CD23) in combination with FCR for patients with relapsed CLL with published FCR results. *Blood*. 2006; 108:14a.
44. Baeuerle PA, Reinhardt C, Letsch A et al. BiTE: a new class of antibodies that recruit T-cells. *Drugs Future*. 2008; 33: 137.
45. R. Bargou, E. Leo, G. Zugmaier, et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody, *Science*. 2008; 321: 974-977.
46. Viardot A, GoebelerM, Scheele J et al. Treatment of Patients With Non-Hodgkin Lymphoma With CD19/CD3 Bispecific Antibody Blinatumomab

- (MT103): Double-Step Dose Increase to Continuous Infusion of 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{day}$ is Tolerable and Highly Effective. *Blood*. 116; 21, ASH Abstract # 2880, 2010.
47. Topp MS, Zugmaier G, Goekbuget N et al. CD19/CD3 Bispecific Antibody Blinatumomab (MT103) Is Highly Effective in Treatment of Patients with Minimal Residual Disease (MRD) from Chemotherapy-resistant B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 116; 21, ASH Abstract # 174, 2010.
 48. Topp MS, Kufer P, Goekbuget N et al. Targeted therapy with the T-cell engaging antibody blinatumomab of chemorefractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *J. Clin. Oncol.* in press, 2011.
 49. Handgretinger R, Zugmaier G, Henze G et al. Complete remission after blinatumomab-induced donor T-cell activation in three pediatric patients with post-transplant relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2011;25:181-184.
 50. Caron PC, Jurcic JG, Scott AM, et al. A phase 1B trial of humanized monoclonal antibody M195 (anti-CD33) in myeloid leukemia: Specific targeting without immunogenicity. *Blood* 1994; 83: 1760-1768.
 51. Larson RA, Boogaerts M, Estey E, et al. Antibody-targeted chemotherapy of older patients with acute myeloid leukemia in first relapse using Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin). *Leukemia*. 2002; 16: 1627-1636.
 52. Giles FJ, Kantarjian HM, Kornblau SM, et al. Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin) therapy is associated with hepatic venoocclusive disease in patients who have not received stem cell transplantation. *Cancer*. 2001; 92: 406-413.
 53. Clavio M, Vignolo L, Albarello A et al. Adding low-dose gemtuzumab ozogamicin to fludarabine, Ara-C and idarubicin (MY-FLAI) may improve disease-free and overall survival in elderly patients with non-M3 acute myeloid leukaemia: results of a prospective, pilot, multi-centre trial and comparison with a historical cohort of patients. *Br J Haematol*. 2007; 138: 186-95.
 54. Burnett AK, Hills RK, Milligan D et al. Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 369-77.

**TARGETED THERAPIES
DI ALCUNE EMOPATIE MALIGNNE
E TUMORI SOLIDI**

Leucemia mieloide acuta e sindromi mielodisplastiche

Paolo Bernasconi

Laboratorio di Citogenetica e Biologia Molecolare Ematologica, Divisione di Ematologia, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Negli ultimi vent'anni il notevole progresso compiuto nella comprensione e caratterizzazione dei meccanismi molecolari responsabili della patogenesi delle SMD e delle LAM non ha solo consentito una migliore stratificazione prognostica dei pazienti, ma ha anche permesso lo sviluppo di “molecularly targeted therapies”. Queste ultime sono terapie che mirano a colpire il difetto citogenetico/molecolare responsabile della patogenesi di uno specifico sottotipo di SMD/LAM e a ripristinare il normale funzionamento di quella particolare via di segnale o terapie che mirano a bloccare proteine che svolgono un ruolo cruciale nel “chromatin modeling” e nell’omeostasi cellulare. Proprio per questa specificità di bersaglio le “molecularly targeted therapies” dovrebbero dotate una maggiore specificità e una minore tossicità rispetto alla chemioterapia convenzionale. In questa breve trattazione esamineremo “molecularly targeted therapies” ormai entrate o in procinto di entrare nella pratica clinica.

Lenalidomide

Nei pazienti con sindrome del 5q- la regione di minima comune delezione (MCD), situata tra le bande q31 e q32, misura circa 1.5Mb. Tale regione contiene quarantaquattro geni, ma nessun di questi è in grado di determinare le caratteristiche fenotipiche della sindrome. Queste sono invece prodotte dall’aplo-insufficienza per il gene RPS14 che codifica per una proteina che è parte integrante della sub-unità ribosomiale 40S ed è necessaria al clivaggio della molecola 18SE/18S di RNA ribosomiale. La proteina RPS14 non è però il vero bersaglio della lenalidomide, l’unico farmaco in grado di eliminare la popolazione clonale 5q- positiva. La lenalidomide determina la sovra-espressione del gene SPARC, l’inibizione selettiva della crescita *in vitro* degli eritroblasti e dei mieloblasti che contengono il 5q-, e l’arresto del ciclo cellulare nella fase G2. È stato dimostrato che nei pazienti con 5q- il farmaco inibisce due fosfatasi che regolano il ciclo cellulare, la “Cell Division Cycle 25C” (Cdc25C) e la “Protein Phosphatase 2A” (PP2A), e causa un aumento del sequestro intracitoplasmatico di Cdc25C. Invece,

nei pazienti privi del 5q- la lenalidomide agisce con un meccanismo completamente diverso perché ripristina la normale eritropoiesi senza alcun effetto tossico diretto (Komrokji et al., 2010).

Lo studio di fase I/II MDS-001 è stato il primo a dimostrare l'efficacia della lenalidomide in quarantatré pazienti (la maggior parte affetti da anemia refrattaria con e senza sideroblasti ad anello ed a rischio IPSS intermedio 1) che presentavano un'anemia sintomatica e una dipendenza dalla terapia di supporto trasfusionale. Il 43% dei pazienti, dodici con 5q- come singola anomalia, presentava un cariotipo patologico (List et al., 2005). Una risposta ematologica era stata ottenuta dal 56% dei pazienti ed un'indipendenza dalla terapia di supporto trasfusionale dal 63% dei pazienti che prima della lenalidomide erano trasfusione dipendenti. Tuttavia, il risultato più rilevante raggiunto da questo studio era stata la dimostrazione che risposta ematologica e risposta citogenetica erano strettamente correlate. Infatti, un incremento dei parametri relativi alla componente eritroide era stato osservato nell'83% dei pazienti con 5q-, nel 57% dei pazienti con cariotipo normale e nel 12% dei pazienti con altri difetti cromosomici. Una risposta citogenetica era stata raggiunta da undici pazienti (55%) a cariotipo patologico, ma dall'83% dei pazienti che presentavano il 5q- come singola anomalia. Ancor più significativamente nove di questi avevano addirittura raggiunto la risposta completa. Lo studio successivo MDS-003, che aveva arruolato centoquarantotto pazienti ed aveva utilizzato la lenalidomide alla dose di 10mg al giorno per ventuno giorni consecutivi seguiti da un intervallo libero di una settimana, aveva confermato questi risultati (List et al., 2006). Un'indipendenza dalla terapia di supporto trasfusionale era stata raggiunta dal 67% dei pazienti e la durata della risposta aveva superato i due anni specie nei pazienti con 5q- isolato.

Complessivamente, una risposta citogenetica era stata ottenuta dal 77% dei pazienti (45% di risposte complete) che presentava il 5q- come singola anomalia e dal 67% dei pazienti (40% di risposte complete) che presentava il 5q- associato ad un altro difetto cromosomico. Tutti i pazienti che avevano risposto alla terapia avevano sviluppato una citopenia nelle prime otto settimane di trattamento. Pertanto, la citopenia era predittiva di remissione ematologica e citogenetica che si associavano ad un significativo allungamento della sopravvivenza.

Sulla scorta di queste osservazioni il "Groupe Franchophone de MDS" aveva utilizzato la lenalidomide allo stesso dosaggio e secondo lo stesso schema di trattamento in quarantasei SMD ad alto rischio con 5q- molto spesso associato ad altre alterazioni del cariotipo (Burcheri et al., 2007). La tossicità ematologica era stata importante (l'80% dei pazienti aveva richiesto l'ospedalizzazione); solo il 12% dei pazienti aveva ottenuto una remissione ematologica completa e solo il 19% una risposta citogenetica.

Inibitori di FLT3

Il gene "Fms-like tyrosine kinase 3" (FLT3) codifica per un recettore di classe terza appartenente alla famiglia delle tirosino chinasi che viene fisiologicamente espresso sulla superficie dei progenitori ematopoietici. Una volta avvenuta la sua

attivazione ad opera del legame con il ligando, la proteina FLT3 regola la proliferazione, la sopravvivenza e differenziazione della CSE. Il 30-35% dei pazienti affetti da LAM presenta una mutazione del gene FLT3 che causa la proliferazione e la sopravvivenza dei blasti leucemici. Nel 20-25% dei pazienti la mutazione può essere una "Internal Tandem Duplication" (ITD), mentre nel 7% dei pazienti può essere una mutazione puntiforme che interessa l'"Activation Loop" (AL). Il primo tipo di mutazione impedisce il corretto funzionamento di una sequenza repressoria situata a livello della regione iuxta-membranaria del recettore che viene perciò attivato senza che sia necessario il legame con il ligando. I pazienti con questo tipo di mutazione hanno un decorso clinico sfavorevole. Infatti, essi presentano percentuali di remissione completa (RC) uguali a quelle dei pazienti senza mutazione, ma rischi di recidiva significativamente più alti ed una sopravvivenza complessiva e libera da malattia significativamente più brevi. Recentemente, uno studio ha dimostrato che la prognosi sfavorevole dell'ITD viene ulteriormente aggravata da un elevato rapporto tra numero di alleli mutati e alleli "wild-type" (wt), dall'estensione del tratto di ITD (dimensioni maggiori prognosi peggiori) e dalla sede dell'inserzione (Gale et al., 2008). Il trattamento con antracicline ad alte dosi non sembra modificare il decorso clinico sfavorevole di questi pazienti che possono invece avvantaggiarsi del trapianto allogenico di CSE (Fernandez et al., 2009; Schlenk et al., 2008). Viceversa, la mutazione puntiforme dell'"Activation Loop" non sembra possedere alcun impatto prognostico. Recentemente, sono state sviluppate molecole che inibiscono l'attività tirosina kinasica di FLT3 perchè bloccano la trasduzione del segnale, la replicazione ed il metabolismo cellulare e determinano l'apoptosi della popolazione leucemica. Tali molecole sono poco efficaci se impiegate in monoterapia. Perciò molti studi ne stanno valutando l'efficacia in combinazione con la chemioterapia convenzionale. Gli inibitori di FLT3 più comunemente impiegati sono il Lestaurinib, la Midostaurina, il Tandutinib, Sunitinib, il Sorafenib e l'AC220.

Il Lestaurinib (CEP701) è un alcaloide indolo-carbazolico che viene somministrato per via orale. Il farmaco blocca il processo di auto-fosforilazione di FLT3 e causa l'apoptosi delle cellule che presentano la sovra-espressione di FLT3. CEP701 non è specifico per FLT3 perchè inibisce anche altre tirosino kinasi tra cui la proteina kinasi C, il "Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2). Studi *in vitro* hanno dimostrato che il Lestaurinib uccide preferenzialmente le cellule leucemiche che presentano l'"Internal Tandem Duplication". Il farmaco è stato impiegato alla dose di 60mg due volte al giorno in uno studio di fase I/II che ha arruolato quattordici pazienti con LAM refrattaria (Smith et al., 2004). Cinque pazienti hanno mostrato una riduzione dei blasti leucemici nel sangue periferico, una riduzione del fabbisogno trasfusionale e una buona tolleranza al farmaco. Uno studio successivo di fase II ha inizialmente impiegato il farmaco in monoterapia alla dose di 60 mg due volte al giorno e quindi alla dose di 80mg due volte al giorno per otto settimane in LAM non trattate in precedenza. Il 60% dei pazienti con ITD ed il 23% dei pazienti con gene wt ha mostrato una riduzione della blastosi periferica e midollare e del fabbisogno trasfusionale. La risposta clinica era raggiunta se l'inibizione dell'autofosforilazione di FLT3 era superiore

al 70%, ma la dose di farmaco necessaria a raggiungere questo obiettivo variava nei vari pazienti (Knapper et al., 2006).

La Midostaurina (PKC412) è una benzoil-staurosporina inizialmente impiegata come inibitore della protein chinasi C. La sua azione inibitoria non si esplica solamente nei confronti di FLT3 ma anche nei confronti di VEGFR-2. Blocca la proliferazione cellulare e causa l'apoptosi dei blasti leucemici. *In vivo* nel topo induce un aumento della produzione di ossido nitrico per attivazione di una sintetasi endoteliale. Uno studio iniziale che aveva arruolato pazienti con SMD/LAM resistente/refrattaria aveva utilizzato 75 mg di midostaurina per os tre volte al giorno. In quattordici pazienti la quota blastica nel sangue periferico si era ridotta del 50% ed in sei pazienti anche la quota blastica midollare si era ridotta del 50% (Stone et al., 2005). Un altro studio, che aveva arruolato pazienti con LAM di età >60 anni, aveva impiegato la midostaurina alla dose di 50 mg al giorno in combinazione con Ara-C e Daunorubicina. Una remissione completa (RC) era stata raggiunta da otto dei tredici pazienti con gene "wild-type" (wt) e da sei pazienti con gene mutato (Stone et al., 2005). Più recentemente, il farmaco è stato utilizzato in monoterapia alla dose orale di 50 mg o 100 mg due volte al giorno in novanta pazienti (60 LAM e 30 SMD). Una riduzione della blastosi midollare o periferica è stata raggiunta nel 71% dei pazienti con gene mutato e nel 42% dei pazienti con gene wt. Una remissione parziale era stata raggiunta in un solo paziente che aveva ricevuto il farmaco alla dose di 100 mg due volte al giorno (Fischer et al., 2010).

Il Tandutinib (MLN518) è un derivato della quinazolina che può essere somministrato per via orale e possiede attività inibitoria non solo nei confronti di FLT3 ma anche nei confronti di PDGFR β e di c-kit. Il farmaco ha mostrato un sinergismo con Ara-C e Daunorubicina (Schittenhelm et al., 2009). L'effetto antiproliferativo e pro-apoptotico si esplica soprattutto nei confronti dei blasti ITD positivi. Inizialmente, studi di fase I e II condotti in pazienti con SMD/LAM avevano impiegato il tandutinib in monoterapia ad una dosaggio variabile tra 50 mg e 700 mg. Il farmaco, somministrato due volte al giorno, aveva mostrato una scarsa attività antileucemica. Solo due pazienti avevano mostrato una riduzione della blastosi periferica per un breve intervallo di tempo. In uno studio di fase I/II che aveva arruolato ventinove pazienti affetti da LAM, cinque con malattia ITD positiva, il tandutinib era stato utilizzato ad una dose di 200-500 mg/m² al giorno durante l'induzione, il consolidamento e per ulteriori sei mesi (DeAngelo et al., 2006). Una RC era stata raggiunta in ventuno pazienti. L'efficacia antileucemica del tandutinib in associazione con Ara-C e Daunorubicina era stata confermata anche da un altro studio che aveva riportato una percentuale di RC del 90% (Schittenhelm et al., 2006).

Il Sunitinib (Sutent) è un composto che può essere somministrato per via orale. Non ha un'azione inibitoria solo nei confronti dell'ITD e delle mutazioni dell'"Activation Loop" di FLT3 ma anche nei confronti di c-kit, VEGFR, PDGFR. In uno studio di fase I il farmaco era stato somministrato a due dosaggi 50 mg e 75 mg per quattro settimane, seguite da due o una settimana di riposo ed era stato ben tollerato. Una risposta morfologica e parziale era stata raggiunta in

tutti i pazienti che presentavano una ITD. Lo studio aveva riportato un sinergismo con Ara-C e Daunorubicina.

Il Sorafenib (BAY-43-9006) è una piccola molecola che agisce da inibitore della Raf kinasi. Quest'ultima inquina nella via delle "Mitogen-activated Protein kinase" (MAPK). Il sorafenib è un inibitore di molte kinasi tra cui FLT3 sia in configurazione wt che mutata. Questa molecola blocca la fosforilazione di proteine situate a valle di Raf ed induce la sovra-espressione di proteine pro-apoptotiche come BIM, Bad, Bax e Bak. In uno studio di fase I il sorafenib aveva determinato un miglioramento seppur di breve durata della situazione ematologica in sei pazienti con ITD (Zhang et al., 2008). In un'altro studio randomizzato di fase I pazienti affetti da SMD e da LAM resistente/refrattaria avevano ricevuto il sorafenib per via orale per ventotto o per quattordici giorni consecutivi ogni quattro settimane. Il farmaco era stato somministrato due volte al giorno a tre dosaggi: 100mg, 200mg e 400mg (Crump et al., 2010). Una RC era stata raggiunta in un solo paziente risultato ITD positivo. Un altro studio, che aveva arruolato cinquantuno pazienti di età <65 con LAM alla diagnosi, aveva impiegato il sorafenib in associazione ad Ara-c ed idarubicina. Una RC era stata raggiunta da trentotto pazienti (75%), quattordici presentavano una ITD. Questo studio aveva dimostrato che nei pazienti con gene mutato la probabilità di ottenere la remissione completa era significativamente più alta che nei pazienti con gene wt (Ravandi et al., 2010).

L'AC220 è dotato di una maggiore attività rispetto alle molecole precedenti. Sino ad ora un solo studio di fase II ha impiegato l'AC220 in sei pazienti con LAM refrattaria. Dopo otto giorni di terapia tutti i pazienti avevano mostrato la scomparsa dei blasti dal sangue periferico e dopo quattordici giorni di terapia in tutti i pazienti il tessuto ematopoietico era per la maggior parte costituito da elementi in fase mielocitaria. L'analisi del midollo osseo e del sangue periferico dopo la prima settimana di trattamento aveva mostrato la persistenza della ITD nonostante l'assenza di cellule leucemiche. Al al ventottesimo giorno di terapia la quota di alleli mutati era identica a quella riscontrata all'inizio della terapia. La mutazione di FLT3 era presente nel DNA genomico dei neutrofili che però non esprimevano RNA messaggero codificante per FLT3 e proteina FLT3. Pertanto, l'AC220 sembra in grado di rimuovere il blocco differenziativo e sembra consentire la maturazione della cellula leucemica ITD positiva sino allo stadio di neutrofilo maturo.

Inibitori di c-Kit

Le mutazioni di questa tirosina kinasi recettoriale si osservano nel 5-10% di tutte le LAM e nel 50% circa di quelle con traslocazioni a carico del "Core Binding Factor". La mutazione colpisce più spesso l'esone 17 del dominio kinasico con sostituzione dell'Asparagina in posizione 816 con la Valina (D816V). Tra gli inibitori di c-Kit e dei suoi substrati che sono stati utilizzati con risultati incoraggianti in trials clinici bisogna ricordare l'imatinib e il dasatinib. Il primo era stato impiegato in uno studio di fase II che aveva arruolato quindici pazienti con LAM

refrattaria c-Kit mutata e BCR-ABL negativa. Il farmaco era stato utilizzato alla dose di 600 mg al giorno per un mese quindi la dose era stata aumentata a 800 mg al giorno per due mesi consecutivi. Nessun paziente aveva mostrato un miglioramento del quadro clinico. Viceversa, uno studio di fase I, che aveva utilizzato l'imatinib in associazione con Ara-C in pazienti con LAM refrattaria, aveva riportato una percentuale complessiva di risposte cliniche del 43%. Due pazienti avevano raggiunto una remissione clinica completa con normalizzazione dell'assetto citogenetica e altri due avevano raggiunto una remissione morfologica. Per quanto riguarda il dasatinib, i dati *in vitro* sino ad ora ottenuti dimostrano che il farmaco inibisce la proliferazione di linee cellulari leucemiche poiché blocca la fosforilazione di c-kit.

Inibitori di PI3K/AKT/mTOR

Si tratta di una via di segnale che svolge un ruolo cruciale in diversi processi cellulari come la progressione lungo il ciclo cellulare, la trascrizione, la differenziazione, l'apoptosi, la motilità ed il metabolismo. L'alterato funzionamento di questa via di segnale è responsabile della patogenesi di molti processi neoplastici e della resistenza alla chemioterapia. Molti modelli preclinici hanno dimostrato che l'inibizione di PI3K/Akt/mTOR induce l'apoptosi, l'arresto del ciclo cellulare ed un aumento della risposta alla chemio- ed alla radio-terapia (Martelli et al., 2010). Le fosfatidil-inositolo 3-kinasi (PI3K) sono una famiglia di enzimi capaci di fosforilare il gruppo OH in posizione 3' degli inositoli. Si conoscono tre classi di PI3K distinte sulla base delle caratteristiche strutturali e funzionali. Le PIK3 di classe I_A sono quelle maggiormente coinvolte nei processi neoplastici e sono costituite da una sub-unità regolatoria e da una sub-unità catalitica. I tre geni PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3 codificano per tre sub-unità regolatorie, p85 α , p85 β e p55; i tre geni PIK3CA, PIK3CB e PIK3CD codificano per le tre sub-unità catalitiche p110 α , p110 β e p110 δ . I geni PIK3CA e PIK3R1 sono quelli più spesso colpiti da mutazione in vari tipi di neoplasia. Le PIK3 di classe I_A sono attivate da fattori di crescita tramite tirosine kinasi recettoriali. La sub-unità p85 si lega ai residui fosfotirosinici delle tirosine kinasi o di molecole adattatorie. Questo legame libera l'attività catalitica di p110 sino ad allora bloccata da p85. Così, PI3K si localizza sulla membrana plasmatica dove risiede il suo substrato fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato [PI(4,5)P₂]. PI3K può essere attivato anche da Ras, che si lega direttamente a p110; l'unità catalica p110 β può essere attivata anche dai recettori delle proteine G. PI3K fosforila PIP2 a PIP3, evento bloccato dalla "tumor suppressor phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10" (PTEN) che defosforila PIP3 a PIP2. PIP3 si lega al "Pleckstrin homology" (PH) domain di varie proteine di segnale. In particolare, PIP3 avvicina i PH domains di due kinasi, della kinasi fosfoinositide dipendente di tipo 1 (PIDK1) e di Akt che viene fosforilato a livello della treonina 308. Vengono così promosse la crescita e la sopravvivenza cellulare.

Gli inibitori di PI3K possono essere suddivisi in inibitori isoforma specifici e pan-inibitori. Questi ultimi, che comprendono la wortmannina, il LY294002, e il PX-

886, hanno come bersaglio le classi I_A di PI3K e sono dotati di attività citotossica. La wortmannina e il LY294002 si legano all'unità catalitica p110 di PI3K. La wortmannina determina un'inibizione irreversibile e non competitiva con l'ATP, mentre LY294002 determina un'inibizione reversibile e competitiva con l'ATP. La presenza della mutazione del gene PIK3CA come pure la perdita di PTEN è predittiva di risposta a PX-886. Sinora questi composti sono stati impiegati in modelli animali che hanno sviluppato come effetto collaterale un'iperglicemia. Nella LAM Wortmannina e LY294002 sono stati utilizzati in studi preclinici. L'eccessiva citossicità e la scarsa solubilità delle due molecole ne ha precluso l'impiego clinico. I composti isoforma specifici sono capaci di inibire più efficacemente il bersaglio e sembrano essere meglio tollerati. Tra questi bisogna ricordare IC87114 che inibisce in modo selettivo l'isoforma 110δ di PI3K e sinergizza con l'etoposide.

Akt è una serina/treonina chinasi del peso molecolare di 57-kDa sotto lo stretto controllo di PI3K. Se ne conoscono tre isoforme Akt1/α, Akt2/β e Akt3/γ che mostrano una notevole omologia di sequenza ma una certa diversità di funzione. Akt2 è coinvolta nell'"uptake" insulino-dipendente del glucosio e nella motilità, invasività e metastatizzazione delle cellule neoplastiche. Akt promuove la sopravvivenza cellulare perché inibisce le proteine pro-apoptotiche BAD e BAX, impedisce la repressione del fattore trascrizionale NF-κB con aumento della trascrizione di geni anti-apoptotici, fosforila Mdm2 contrastando la regolazione dell'apoptosi mediata da p53 e reprime l'espressione dei fattori trascrizionali "forkhead" con conseguente riduzione dei livelli delle proteine che promuovono la morte cellulare. Inoltre, Akt blocca l'attività rheb GTP-asica del dimero TSC1/TSC2. In questo modo rheb attiva il complesso proteico contenente il "mammalian target of rapamycin (mTOR), denominato mTORC1, con conseguente aumento dell'attività della chinasi p70 S6. Mentre il complesso mTORC1 con la fosforilazione del fattore 4E e della proteina ribosomiale S6 fa aumentare la sintesi proteica, un secondo complesso mTORC, chiamato mTORC2, fosforila la serina in posizione 473 di Akt che risulta quindi totalmente fosforilato. Siccome la proteina S6 attivata può bloccare l'attivazione di PI3K essa funziona come sistema di "feed-back". I substrati di Akt sono circa un centinaio e tra questi bisogna ricordare la "glycogen synthase kinase-3α/β (GSK3α/β).

Gli inibitori di Akt possono essere suddivisi in ATP mimetici e non catalitici. Le neoplasie più sensibili agli inibitori sono quelle con mutazione di Akt1 o con amplificazione di Akt1 e Akt2. Tuttavia questi inibitori non bloccano gli effettori non-Akt della via di PI3K, anzi possono indurre un'eccessiva stimolazione di PI3K per perdita dei meccanismi di "feed-back".

La perifosina è un nuovo inibitore di Akt che appartiene alla classe degli alkilfosfolipidi. Questo composto defosforila Akt e ERK1/2, attiva le caspasi, interagisce con la membrana cellulare modulandone la permeabilità, la composizione lipidica ed il metabolismo fosfolipidico, modula la trasduzione del segnale mitogenico con blocco della crescita cellulare e promozione della differenziazione cellulare. Inoltre la perifosina blocca l'effetto anti-apoptotico della via delle "mitogen activated protein kinase" (MAPK) e modula l'equilibrio tra MAPK e via

delle “stress activated protein kinase” (SAPK/JNK), che svolgono un’azione proapoptotica. La perifosina causa l’apoptosi delle linee cellulari di LAM, riduce l’attività clonogenica dei progenitori leucemici ma non quella dei progenitori sani, aumenta la sensibilità dei blasti all’etoposide. Uno studio ha dimostrato che la perifosina da sola o in combinazione con la chemioterapia convenzionale può essere impiegata con successo nelle LAM che mostrano un’attivazione della via di segnale controllata da PI3K (Papa et al., 2008).

mTOR è una serina treonina chinasi che presenta un’omologia di sequenza con PI3K, caratteristica che spiega la possibile inibizione di mTORC da parte di molecole che inibiscono PI3K. Come già riportato mTORC esiste sottoforma di due complessi mTORC1 e mTORC2. Il primo è formato da mTOR/Raptor/mLST8/PRAS40/FKBP38/Deptor, controlla i processi anabolici promuovendo la sintesi proteica e la crescita cellulare, viene attivato da MEK/ERK e represso dalle protein chinasi AMP dipendenti. mTORC1 controlla la risposta a nutrienti e fattori di crescita fosforilando alcuni componenti che partecipano attivamente alla sintesi proteica. Tra questi componenti bisogna ricordare la chinasi p70S6 ed il “eukaryotic initiation factor 4E-binding protein-1” (4E-BP1). L’attivazione di quest’ultimo libera l’attività dell’ “eukaryotic initiation factor” 4E (eIF4E) necessario alla traslazione di molti “5’ capped” mRNA, che includono trascritti codificanti per fattori che favoriscono la crescita cellulare (ad esempio c-Myc, ciclica D1, chinasi ciclica dipendente 2, retinoblastoma, p27kip1, VEGF). Inoltre, mTORC1 blocca il processo di autofagia.

mTORC2 è formato da mTOR/Rictor/mLST8/SIN1/Protor/Deptor. Oltre alla già citata azione su Akt, mTORC2 controlla la polimerizzazione dell’actina, l’organizzazione del citoscheletro, la fosforilazione della proteina chinasi C α e il “serum and glucocorticoid-induced protein kinase 1” (SGK1). I complessi mTORC1 e mTORC2 sono in equilibrio tra loro: la formazione di mTORC1 blocca la formazione di mTORC2 e riduce l’attività di Akt. In realtà mTORC1 induce la fosforilazione di p70S6K che a sua volta fosforila l’ “insulin receptor substrate (IRS) 1 adapter protein”, inducendone la degradazione da parte del proteosoma con riduzione dell’attività di Akt. Pertanto l’inibizione di mTORC1 potrebbe causare l’iperattivazione di Akt.

La rapamicina (Sirolimo), un antifungino con un’importante azione immunosoppressiva e antiproliferativa, è il più noto inibitore di mTOR. Isolato da campioni di suolo provenienti da Rapa Nui è molto attiva nei confronti della candida albicans. Il suo effetto antiproliferativo è mediato dalla formazione di un complesso attivo con la proteina 12 legante l’immunofillina FK506 (FKBP12). L’inibizione di mTOR impedisce la traslazione di mRNA necessari alla progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S, blocca l’attivazione delle chinasi ciclino dipendenti, accelera il turnover della ciclina D1 inducendo un blocco nella fase G1 del ciclo cellulare. La rapamicina ha anche un effetto anti-angiogenico causato da una ridotta produzione di VEGF e dalla ridotta risposta delle cellule endoteliali a tale fattore. Siccome la maggior parte dei pazienti con LAM presenta l’attivazione di Akt e conseguentemente la fosforilazione di due bersagli di mTOR, 4E-BP1 e S6K1, la rapamicina potrebbe essere efficace nel controllo della malattia. Studi

in vitro hanno però mostrato una scarsa attività del composto anche se sembra che la rapamicina svolga il maggior effetto antiproliferativo nei confronti dei progenitori leucemici (Récher et al., 2005). Inoltre, sembra esservi un sinergismo tra rapamicina ed etoposide, inibitori delle deacetilasi istoniche e citosina arabinoside. Due studi condotti in pazienti con LAM refrattaria hanno dimostrato che la rapamicina in monoterapia può indurre un rilevante miglioramento ematologico dopo 4-9 giorni di trattamento (Récher et al., 2005; Boehm et al., 2009).

L'everolimo (RAD001), un derivato della rapamicina, ha un effetto antiproliferativo. Si lega alla proteina intracellulare FKBP-12, blocca l'attività kinasica di mTOR, causa l'arresto nella fase G1 del ciclo cellulare, blocca l'attività di p21 e delle kinasi ciclino dipendenti 2 e 4, l'attivazione del NFkB, induce apoptosi e sopprime l'angiogenesi. Tutte le azioni dell'everolimo sono prodotte dall'inibizione di mTORC1, mentre mTORC2 rimane attivo. Questa mancata inibizione può causare un'iperattivazione di Akt che non si verifica con la rapamicina e con nuovi inibitori che si legano al sito catalitico di mTORC1 e di mTORC2. Uno studio di fase I/II condotto in ventisei pazienti con neoplasie ematologiche resistenti/refrattarie ha dimostrato che il farmaco è ben tollerato alla dose di 10mg. I più comuni effetti collaterali sono anoressia, aftosi del cavo orale, diarrea, astenia, iperglicemia, iperlipemia, rialzo degli enzimi epatici, ipofosfatemia e ipomagnesiemia (Yee et al., 2006). Tuttavia, mentre la rapamicina aveva determinato una risposta ematologica parziale nel 44% dei pazienti con LAM refrattaria, il RAD004 non era riuscito a controllare la malattia in nessun paziente.

Il temsirolimo (CCI-779) è un estere solubile della rapamicina che inibisce mTOR in modo specifico e svolge le stesse azioni della rapamicina. CCI-779 è stato impiegato senza successo in alcuni pazienti con LAM refrattaria (Recher et al., 2005; Yee et al., 2006). È tuttora in corso uno studio che valuta l'efficacia del temsirolimo in combinazione con clofarabina.

Il deferolimo è una piccola molecola che blocca l'attività di mTOR attraverso una riduzione della fosforilazione di 4E-BP e di S6. È stato utilizzato in uno studio di fase II condotto in pazienti con malattie ematologiche refrattarie. In questo studio il farmaco era stato impiegato al dosaggio di 12.5mg in infusione endovenosa di trenta minuti una volta al giorno per 5 giorni consecutivi ogni due settimane. Un miglioramento ematologico era stato osservato nel 44% dei pazienti, ma solo quattro erano affetti da LAM. Trials clinici tuttora in corso valuteranno l'efficacia antileucemica del deferolimo in associazione alla chemioterapia convenzionale (Rizzieri et al., 2008).

Inibitori delle aurora kinasi

Le Aurora kinasi, Aurora A, B e C, sono una famiglia di serina-treonina kinasi che svolgono un importante ruolo in vari stadi della mitosi (Moore et al., 2010). Aurora A e Aurora B regolano la proliferazione della maggior parte delle cellule e la loro localizzazione cellulare varia durante la mitosi. Il gene dell'Aurora A è mappato in 20q13.2 e si comporta da oncogene. La proteina svolge un ruolo rilevante nella maturazione del centrosoma, nell'assemblaggio del fuso, nella maturazione meio-

tica e nell'orientamento del fuso durante la metafase I. L'attività di Aurora A è regolata dalla degradazione, fosforilazione e defosforilazione a livello della treonina in posizione 288 dell'"activation loop". L'inibizione della fosforilazione di questo residuo amminoacidico determina il blocco della fosforilazione di p53, fusi mitotici monopolari, ed un arresto nella fase G2-M del ciclo cellulare (Carmena et al., 2003). L'Aurora kinasi B, il cui gene è mappato in 17p13.1, forma un "chromosomal passenger complex" (CPC) con tre sottounità non enzimatiche: la "inner centromere protein", la survivina e la borealina. Il complesso CPC è molto dinamico e svolge un ruolo critico nella condensazione cromosomica, nell'orientamento cromosomico sul fuso mitotico, nella fase di controllo della formazione del fuso mitotico e nelle fasi finali della citokinesi. Aurora B, oltre a fosforilare le stesse proteine fosforilate da Aurora A, fosforila le serine in posizione 10 e 28 dell'istone H3 durante la mitosi e partecipa quindi alla condensazione cromosomica. L'inibizione di Aurora B determina una poliploidia, l'inibizione della fosforilazione della serina in posizione 10 dell'istone H3 e l'apoptosi. L'Aurora C è espressa fisiologicamente solo a livello del tessuto testicolare, ma una sua espressione è stata osservata anche in linee cellulari leucemiche nelle quali il silenziamento di tale Aurora comportava un aumento dei livelli di espressione di p27Kip1, una riduzione dei livelli di Skp2, un arresto nella fase G1/G2 del ciclo cellulare con apoptosi e blocco della crescita cellulare.

Una sovraespressione, un'amplificazione ed un polimorfismo dei geni dell'Aurora kinasi, soprattutto della A, sono stati riportati in molti tumori solidi ma anche nelle LAM. Gli inibitori delle Aurora kinasi ad oggi sviluppati si legano alla tasca di legame dell'ATP e si distinguono in pan-inibitori o inibitori specifici. Nelle LAM questi inibitori sono potenti soprattutto nei confronti di FLT3, e sono più potenti nelle forme con gene mutato che in quelle con gene "wild-type". L'AT9283, attivo contro l'Aurora A, l'Aurora B, la mutazione T315I di ABL e JAK2, è stato impiegato in uno studio di fase I/II che ha arruolato ventitre pazienti con leucemia acuta refrattaria e ha riportato una riduzione della percentuale dei blasti leucemici in sette pazienti (Foran et al, 2008). L'AS703569, attivo contro Aurora A, Aurora B, FLT3 e ABL, è attualmente impiegato con risultati incoraggianti in uno studio di fase I in pazienti con LAM de novo e secondaria, LMC e SMD (McLaughlin et al., 2010). L'AZD1152, inibitore selettivo dell'Aurora B, è stato impiegato in un trial clinico di fase I/II. Complessivamente, otto pazienti (25%) avevano risposto al trattamento ed una RC era stata ottenuta da tre pazienti che avevano ricevuto la dose di 1200mg (Lowenberg et al., 2009).

Inibitori delle farnesiltransferasi

La farnesiltransferasi (FT-asi) è un enzima intracellulare coinvolto nel primo step di modificazione post-traslazionale della proteina RAS. In particolare, la FT-asi catalizza il trasferimento di un gruppo farnesilico al residuo terminale di cisteina. Una volta avvenuta la farnesilazione, RAS cicla tra una forma attiva legata alla guanosina trifosfato ad una forma inattiva legata alla guanosina difosfato. In que-

sto modo RAS regola la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. Le mutazioni di RAS, che si osservano nel 10-30% delle SMD e LAM e colpiscono soprattutto il gene N-RAS a livello dei codoni 12, 13 e 61, stabilizzano la proteina nella sua forma attiva impedendo l'idrolisi di RAS-GTP. L'inibizione delle FT-asi blocca l'azione di RAS e quindi la crescita cellulare, l'apoptosi e l'angiogenesi. Tuttavia, studi preclinici hanno dimostrato che l'efficacia degli inibitori delle FT-asi non dipende dalla presenza di mutazioni di RAS. Questo dato potrebbe essere spiegato dall'esistenza di un altro possibile bersaglio delle FT-asi. D'altronde la refrattarietà di K- e di N-RAS all'azione delle FT-asi potrebbe dipendere dal fatto che la geranilgeranil transferasi tramite un processo di prenilazione genera proteine RAS mutate assolutamente funzionanti. Gli inibitori delle farnesil transferasi sono il tipifarnib, il lonafarnib (Sarasar) ed il BMS-214662.

Il tipifarnib è un metilchinolone nonpeptidomimetico che può essere somministrato per via orale. Studi *in vitro* hanno dimostrato che le cellule leucemiche sono più sensibili delle cellule normali all'azione del tipifarnib. In uno studio di fase I il farmaco era stato somministrato a dosi crescenti da 100 a 1200 mg/m² due volte al giorno per ventuno/ventotto giorni a venticinque pazienti con LAM in recidiva o con LAM refrattaria o con malattia non trattata in precedenza per patologia associata (Karp et al., 2001). Una risposta ematologica (due RC e sei remissioni parziali) era stata raggiunta dal 32% dei pazienti. Uno studio successivo aveva impiegato il tipifarnib in monoterapia in pazienti con LAM ad alto rischio non precedentemente trattati (Lancet et al., 2007). Una RC era stata raggiunta dal 14% dei pazienti ed era stata di breve durata (durata mediana 7,3 mesi). Nonostante questi risultati poco soddisfacenti ed il fatto che uno studio di fase III non sia riuscito a dimostrare la superiorità del tipifarnib rispetto alla "best supportive care", alcuni pazienti con LAM ad alto rischio possono giovare del farmaco come terapia di mantenimento. Dati recenti indicano che il tipifarnib potrebbe essere più efficace se utilizzato in combinazione con la chemioterapia convenzionale. Infatti, un recente studio fase I, che aveva arruolato 82 pazienti di età superiore a 70 anni ed aveva impiegato una dose di tipifarnib di 300-600 mg due volte al dì per quattordici o ventuno giorni in combinazione con etoposide alla dose di 100-200 mg al giorno nei giorni 1-3 e 8-10, aveva riportato che il 50% dei pazienti che avevano ricevuto il farmaco per 14 giorni aveva raggiunto la RC (Karp et al., 2009).

Il Lonafarnib è un composto tricyclico che può essere somministrato per via orale. *In vitro* inibisce la farnesilazione di H-ras e N-ras senza inibire la geranilgeranil transferasi. Studi di fase I hanno dimostrato che il farmaco ha scarsa attività nelle LAM e SMD.

Il BMS-214662 è un derivato benzodiazepinico. Colpisce preferenzialmente cellule non proliferanti ed è dotato di una rilevante attività antileucemica. In uno studio di fase I, che aveva arruolato diciannove LAM in ricaduta o refrattarie, il farmaco era stato somministrato per via endovenosa ad una dose che variava tra 42 e 300 mg/m² una volta alla settimana per quattro settimane consecutive (Cortes et al., 2005). Quattro pazienti avevano raggiunto la RC. Questo studio aveva stabilito la dose massima raccomandata di farmaco a 118 mg/m².

Inibitori di Hsp90

Questa molecola trasporta varie oncoproteine e ne regola il “folding”, la maturazione, la stabilità ed il “trafficking”. Le proteine Hsp, Hsp90 inclusa, sono sovraesprese in molte neoplasie ematologiche, dato che le fa ritenere necessarie all’omeostasi cellulare anche in microambienti poveri di ossigeno e alla sopravvivenza della cellula anche quando questa abbia sviluppato anomalie geniche altrimenti letali. Tra gli inibitori di Hsp90 bisogna ricordare la 17-AAG, il cui impiego clinico è limitato dalla scarsa solubilità: Sono disponibili anche altre molecole che ne inducono modificazioni post-translazionali come la fosforilazione e l’acetilazione. Recentemente, uno studio di fase I, condotto in pazienti con LAM in fase avanzata, ha impiegato un inibitore a basso peso molecolare derivato dalla geldamicina, la alvespimicina. Il farmaco era stato somministrato per via endovenosa ad un dosaggio progressivamente aumentato da 8 mg/m² a 32 mg/m² due volte alla settimana per due settimane consecutive con un intervallo libero di una settimana. La dose massima tollerata era stata fissata a 24 mg/m². Tre dei tredici pazienti valutabili avevano raggiunto una RC (Lancet et al., 2010).

Inibitori di Bcl-2

La proteina Bcl-2 impedisce la morte cellulare programmata. Bcl-2 è in realtà membro di una più ampia famiglia di proteine ad azione pro- e anti-apoptotica che svolgono un ruolo importante nella progressione tumorale e nella sensibilità alla chemioterapia. Recentemente, è stato osservato che le proteine anti-apoptotiche BH3-only svolgono anche un’azione oncosoppressiva visto che sono bersaglio di delezioni omozigoti in molte neoplasie tra cui il linfoma mantellare. L’oblimersen è stato il primo inibitore di Bcl-2. Si tratta di un oligonucleotide antisenso che si lega al mRNA che codifica per Bcl-2. Oblimersen causa la morte cellulare non solo attivando le caspasi attraverso l’aumento delle proteine Bax e PARP, ma anche favorendo l’autofagia.

Tale composto è stato impiegato in uno studio randomizzato di fase III in combinazione con Ara-C/daunorubicina+inibitori delle deacetilasi istoniche in cinquecentotré pazienti di età >60 anni con LAM non trattata senza alcun miglioramento del loro decorso clinico e della loro sopravvivenza (Marcucci et al., 2007). È stato inoltre impiegato insieme al Gentuzumab in uno studio non randomizzato di fase II che aveva arruolato quarantotto pazienti (Moore et al., 2006). In questo studio erano state raggiunte cinque RC e sette remissioni parziali. Recentemente sono state sviluppate molecole che interagiscono direttamente con Bcl-2. Si tratta di ABT-737, ABT-263 e GX15-070.

Il primo sequestra proteine BH3 ad azione proapoptotica e promuove l’oligomerizzazione di Bax e Bak causando la morte cellulare programmata e quindi aumenta la risposta alla radio- ed alla chemioterapia. ABT-263, la versione orale di ABT-737, non induce mielosoppressione e sembra essere particolarmente efficace nelle malattie linfoproliferative. GX15-070, che sembra possedere una minore affinità per Bcl2, Bcl-X_L, Bcl-w e MCL-1, è stato sino ad ora impiegato

in vitro dove ha bloccato la crescita e ha favorito l'apoptosi di linee cellulari leucemiche (Kang et al., 2009).

Inibitori delle amino peptidasi

Le aminopeptidasi regolano la funzione di peptidi biologicamente attivi perchè rimuovono la metionina amino-terminale di proteine appena sintetizzate. È questo il processo che rifinisce antigeni che verranno presentati alle molecole di classe I del sistema maggiore di istocompatibilità e modula il riciclaggio delle proteine. Il tosedostat è un nuovo inibitore che all'interno della cellula viene convertito in un metabolita attivo, il CHR-79888, composto acido poco permeabile che si accumula nella cellula. Il meccanismo d'azione degli inibitori delle aminopeptidasi non è stato ancora chiarito, ma il tosedostat svolge un'azione antiproliferativa perchè induce la fosforilazione di mTOR e causa una deplezione di proteine. Il farmaco, che sinergizza con bortezomib, ara-C e acido all trans-retinoico, è stato impiegato alla dose di 130 mg in uno studio di fase I/II che ha arruolato quarantuno LAM. L'effetto collaterale più severo è stata una piastrinopenia. Complessivamente, il 27% dei pazienti ha risposto al farmaco. In particolare, una risposta midollare completa è stata raggiunta da sette pazienti e una risposta midollare parziale da altri sette pazienti (Löwenberg et al., 2010).

Inibitori delle istone deacetilasi

La plasticità cromatinica è principalmente governata dalla acetilazione della lisina situata a livello dei frammenti NH₂-terminali degli istoni H2A, H2B, H3 e H4. Il processo di rimodellamento della cromatina determina l'attivazione o il silenziamento del processo trascrizionale di molti geni. A livello fisiologico i processi di acetilazione e deacetilazione sono in perfetto equilibrio. Gli agenti che inibiscono le deacetilasi istoniche causano l'acetilazione della cromatina e quindi promuovono la trascrizione di geni prima silenti. Si conoscono due tipi di deacetilasi istoniche: le NAD⁺ dipendenti che formano la classe III (sirtuine) e le Zn²⁺ dipendenti, distinte in tre classi: I, II e IV. Sbilanciamenti nella acetilazione degli istoni si osservano in diverse neoplasie ematologiche. Sino ad ora cinque sono stati i tipi di inibitori impiegati in studi pre-clinici e clinici: i carbossilati, gli idrossamati, i peptidi ciclici, le benzamidi e i ketoni elettrofilici. Queste molecole, che vengono distinte in pan-inibitori ed inibitori selettivi, inducono *in vitro* la maturazione e l'apoptosi delle cellule neoplastiche, riducono l'espressione di NF-κB e attivano l'espressione di geni oncosoppressori in precedenza silenti. L'iperacetilazione di certi geni causata da inibitori non selettivi come l'acido valproico ed il fenilbutirrato può bloccarne l'attività antineoplastica. Vari studi hanno dimostrato che gli inibitori delle deacetilasi istoniche in monoterapia possiedono una scarsa attività anti-leucemica, mentre se utilizzati in combinazione con la chemioterapia convenzionale sono molto efficaci.

L'acido valproico, che era stato impiegato per il trattamento di convulsioni e cefalea, induce la degradazione dell'istone deacetilasi di tipo 2 ma non delle istone

deacetilasi appartenenti alla classe 1. Inoltre, insieme alla tricostatina induce la maturazione dei blasti mieloidi e determina un aumento del numero e delle dimensioni delle colonie nei tests di clonogenicità condotti *in vitro*. Se confrontate con le colonie che crescono in colture di controllo, le colonie che crescono in presenza di acido valproico contengono un maggior numero di progenitori leucemici CD34 positivi. Studi di fase 1 hanno dimostrato che l'acido valproico ha scarsa attività antileucemica.

La Romidopsina è un peptide biciclico approvato negli Stati Uniti approvato per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T in precedenza sottoposto a chemioterapia per via sistemica. *In vitro* la romidopsina causa l'accumulo di istoni acetilati, induce l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi. Uno studio, che ha arruolato dodici SMD/LAM, ha utilizzato il farmaco alla dose di 18 mg/m² per via endovenosa al giorno 1 e al giorno 5 con ventuno giorni di intervallo libero da terapia (Klimek et al, 2008). Il grado di acetilazione degli istoni è stato valutato con Western-blot in cinque pazienti: due hanno mostrato un aumento del grado di acetilazione degli istoni H3 e H4 ed uno ha mostrato un aumento dell'acetilazione del solo istone H4.

Il Vorinostat è l'acido suberaniloidrossamico (SAHA), un idrossamato sintetico. Il farmaco si lega alle deacetilasi di classe I o II. Tests *in vitro* hanno dimostrato che l'attività antineoplastica del vorinostat dipende dall'arresto del ciclo cellulare nella fase G1, dall'induzione della differenziazione e dall'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi, azione svolta indipendentemente da p53. Nelle LAM/SMD il farmaco è stato impiegato in studi di fase I e II (Garcia-Manero et al, 2008; Schaefer et al., 2009).

Il Panobinostat è un analogo idrossamico che induce l'acetilazione degli istoni e della proteina Hsp90, aumenta i livelli di p21 e provoca l'accumulo di cellule leucemiche nella fase G1 del ciclo cellulare ed una loro apoptosi. Siccome il panobinostat possiede una lunga emivita esso determina una prolungata acetilazione degli istoni. Studi condotti su linee cellulari leucemiche e su cellule leucemiche fresche hanno dimostrato che la molecola è dotata di un'ottima attività antileucemica ed in combinazione con doxorubicina causa la morte della cellula leucemica perché induce la permeabilizzazione della parete esterna della membrana mitocondriale con liberazione del citocromo c dai mitocondri e attivazione delle caspasi. Questa combinazione causa l'apoptosi delle cellule leucemiche anche attraverso un altro meccanismo poichè induce una forte attivazione dei meccanismi di risposta al danno genotossico del DNA ed il possibile sviluppo di "double-strand DNA breaks" (Maiso et al., 2009). L'associazione Panobinostat e 17-AAG è un'altra combinazione rivelatasi molto efficace nel trattamento della LAM FLT3 ITD positiva (George et al., 2005).

Bibliografia

1. Komrokji RS, List AF. Lenalidomide for treatment of myelodysplastic syndromes: current status and future directions. *Hematol Oncol Clin N Am.* 2010; 24: 277-388.

2. List A, Kurtin S, Roe DJ, Buresh A, Mahadevan D, Fuchs D, Rimsza L, Heaton R, Knight R, Zeldis JB. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *New Engl J Med.* 2005; 352: 549-557.
3. List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, Powell B, Greenberg P, Thomas D, Stone R, Reeder C, Wride K, Patin J, Schmidt M, Zeldis J, Knight R. Myelodysplastic Syndrome-003 Study Investigators. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *New Engl J Med.* 2006; 355: 1456-1465.
4. Burcheri S, Prebet T, Beyne-Rauzy O, et al. Lenalidomide (LEN) in INT 2 and High risk MDS with DEL 5q. Interim results of a phase II trial by the GMF. *ASH Annual Meeting. abstracts 2007;* 110: 820.
5. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008; 111: 2776-2784.
6. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, Racevskis J, Dewald GW, Ketterling RP, Bennett JM, Rowe JM, Lazarus HM, Tallman MS. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *New England J Med.* 2009; 361: 1249-1259.
7. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H. German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *New England J Med.* 2008; 358: 1909-1918.
8. Smith BD, Levis M, Beran M, Giles F, Kantarjian H, Berg K, Murphy KM, Dausies T, Allebach J, Small D. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood.* 2004; 103: 3669-3676.
9. Knapper S, Burnett AK, Littlewood T, Kell WJ, Agrawal S, Chopra R, Clark R, Levis MJ, Small D. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood.* 2006; 108: 3262-3270.
10. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, Grandin W, Leibold D, Wang Y, Cohen P, Fox EA, Neuberg D, Clark J, Gilliland DG, Griffin JD. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood.* 2005; 105: 54-60.
11. Stone RM, Fischer T, Paquette R, et al. Phase IB study of PKC412, an oral FLT3 kinase inhibitor, in sequential and simultaneous combination with daunorubicine and cytarabine (DA) induction and high-dose cytarabine combination in newly diagnosed patients with AML. *Blood (ASH annual Meeting Abstracts) 2005;* 106: 404.
12. Fischer T, Stone RM, DeAngelo DJ, Galinsky I, Estey E, Lanza C, Fox E,

- Ehninger G, Feldman EJ, Schiller GJ, Klimek VM, Nimer SD, Gilliland DG, Dutreix C, Huntsman-Labed A, Virkus J, Giles FJ. Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3. *J Clin. Oncol.* 2010; 28: 4339-4345.
13. Schittenhelm MM, Kampa KM, Yee KW, Heinrich MC. The FLT3 inhibitor tandutinib (formerly MLN518) has sequence-independent synergistic effects with cytarabine and daunorubicin. *Cell Cycle.* 2009; 6: 2621-2630.
 14. Zhang W, Konopleva M, Shi YX, McQueen T, Harris D, Ling X, Estrov Z, Quintás-Cardama A, Small D, Cortes J, Andreeff M. Mutant FLT3: a direct target of sorafenib in acute myelogenous leukemia. *J Natl. Cancer Int.* 2008; 100: 184-198.
 15. Crump M, Hedley D, Kamel-Reid S, Leber B, Wells R, Brandwein J, Buckstein R, Kassis J, Minden M, Matthews J, Robinson S, Turner R, McIntosh L, Eisenhauer E, Seymour L. A randomized phase I clinical and biologic study of two schedules of sorafenib in patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia: a NCIC (National Cancer Institute of Canada) Clinical Trials Group Study. *Leuk. Lymphoma.* 2010; 51: 252-260.
 16. Ravandi F, Cortes JE, Jones D, Faderl S, Garcia-Manero G, Konopleva MY, O'Brien S, Estrov Z, Borthakur G, Thomas D, Pierce SR, Brandt M, Byrd A, Bekele BN, Pratz K, Luthra R, Levis M, Andreeff M, Kantarjian HM. Phase I/II study of combination therapy with sorafenib, idarubicin, and cytarabine in younger patients with acute myeloid leukemia. *J Clin. Oncol.* 2010; 28: 1856-1862.
 17. DeAngelo DJ, Amrein PC, Kovacsovics TJ, et al. Phase 1/2 study of tandutinib (MLN518) plus standard induction chemotherapy in newly diagnosed acute myelogenous leukaemia. *Blood (ASH Annual Meeting abstracts)* 2006; 108: 156.
 18. Schittenhelm MM, Yee KM, Kampa KM, et al. Tandutinib (MLN518), a potent FLT3 inhibitor, synergizes with cytarabine and/or daunorubicin in a sequence independent manner. *Blood/ASH Annual Meeting Abstracts* 2006; 108: 1374.
 19. Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, Cappellini A, Ognibene A, McCubrey JA. The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in normal myelopoiesis and leukemogenesis. *Biochim. Biophysica Acta* 2010; 1803: 991-1002.
 20. Papa V, Tazzari PL, Chiarini F, Cappellini A, Ricci F, Billi AM, Evangelisti C, Ottaviani E, Martinelli G, Testoni N, McCubrey JA, Martelli AM. Proapoptotic activity and chemosensitizing effect of the novel Akt inhibitor perifosine in acute myelogenous leukemia cells. *Leukemia.* 2008; 22: 147-160.
 21. Récher C, Dos Santos C, Demur C, Payrastra B. mTOR, a new therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Cell Cycle.* 2005; 4: 1540-1549.

22. Boehm A, Mayerhofer M, Herndlhofer S, Knoebl P, Sillaber C, Sperr WR, Jaeger U, Valent P. Evaluation of in vivo antineoplastic effects of rapamycin in patients with chemotherapy-refractory AML. *Eur J Intern Med.* 2009; 20: 775-778.
23. Yee KW, Zeng Z, Konopleva M, Verstovsek S, Ravandi F, Ferrajoli A, Thomas D, Wierda W, Apostolidou E, Albitar M, O'Brien S, Andreeff M, Giles FJ. Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 5165-5173.
24. Récher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, Chicanne G, Dos Santos C, Mas VM, Benzaquen D, Laurent G, Huguet F, Payrastre B. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 105: 2527-2534.
25. Rizzieri DA, Feldman E, Dipersio JF, Gabrail N, Stock W, Strair R, Rivera VM, Albitar M, Bedrosian CL, Giles FJ. A phase 2 clinical trial of deforolimus (AP23573, MK-8669), a novel mammalian target of rapamycin inhibitor, in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 2756-2762.
26. Moore AS, Blagg J, Linardopoulos S, Pearson AD. Aurora kinase inhibitors: novel small molecules with promising activity in acute myeloid and Philadelphia-positive leukemias. *Leukemia.* 2010; 24: 671-678.
27. Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Moll Cell Biol.* 2003; 4: 842-854.
28. Foran JM, Ravandi F, O'Brien SM, et al. Phase I and pharmacodynamic trial of AT9283, an aurora kinase inhibitor, in patients with refractory leukaemia. *ASCO Meeting Abstract* 2008; 26 (15 suppl): 2518.
29. McLaughlin J, Markovtsov V, Li H, Wong S, Gelman M, Zhu Y, Franci C, Lang DW, Pali E, Lasaga J, Low C, Zhao F, Chang B, Gururaja TL, Xu W, Baluom M, Sweeny D, Carroll D, Sran A, Thota S, Parmer M, Romane A, Clemens G, Grossbard E, Qu K, Jenkins Y, Kinoshita T, Taylor V, Holland SJ, Argade A, Singh R, Pine P, Payan DG, Hitoshi Y. Preclinical characterization of Aurora kinase inhibitor R763/AS703569 identified through an image-based phenotypic screen. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010; 136: 99-113.
30. Lowenberg B, Rousselot P, Martinelli G, et al. Phase I/II study to assess the safety and efficacy of the Aurora Kinase B inhibitor, AZD1152, in patients with advanced acute myeloid leukaemia. *Blood (ASH Annual Meeting)* 2009; 2080
31. Karp JE, Lancet JE, Kaufmann SH, End DW, Wright JJ, Bol K, Horak I, Tidwell ML, Liesveld J, Kottke TJ, Ange D, Buddhharaju L, Gojo I, Highsmith WE, Belly RT, Hohl RJ, Rybak ME, Thibault A, Rosenblatt J. Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial. *Blood.* 2001; 97: 3361-3369.
32. Lancet JE, Gojo I, Gotlib J, Feldman EJ, Greer J, Liesveld JL, Bruzek LM, Morris L, Park Y, Adjei AA, Kaufmann SH, Garrett-Mayer E, Greenberg PL, Wright JJ, Karp JE. A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipi-

- farnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leucemia. *Blood*. 2007; 109: 1387-1394.
33. Karp JE, Flatten K, Feldman EJ, Greer JM, Loegering DA, Ricklis RM, Morris LE, Ritchie E, Smith BD, Ironside V, Talbott T, Roboz G, Le SB, Meng XW, Schneider PA, Dai NT, Adjei AA, Gore SD, Levis MJ, Wright JJ, Garrett-Mayer E, Kaufmann SH. Active oral regimen for elderly adults with newly diagnosed acute myelogenous leukemia: a preclinical and phase 1 trial of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib (R115777, Zarnestra) combined with etoposide. *Blood*. 2009; 113: 4841-4852.
 34. Cortes J, Faderl S, Estey E, Kurzrock R, Thomas D, Beran M, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Giles F, Koller C, O'Brien S, Wright J, Bai SA, Kantarjian H. Phase I study of BMS-214662, a farnesyl transferase inhibitor in patients with acute leukemias and high-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 2805-2812.
 35. Lancet JE, Gojo I, Burton M, Quinn M, Tighe SM, Kersey K, Zhong Z, Albitar MX, Bhalla K, Hannah AL, Baer MR. Phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (KOS-1022, 17-DMAG) administered intravenously twice weekly to patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010; 24: 699-705.
 36. Marcucci G, Moser B, Blum W, et al. A phase III randomized trial of intensive induction and consolidation chemotherapy {+/-} oblimersen, a pro-apoptotic Bcl-2 antisense oligonucleotide in untreated acute myeloid leukemia patients >60 years old (abstract). *J Clin Oncol*. 2007; 25: 7012.
 37. Moore J, Seiter K, Kolitz J, Stock W, Giles F, Kalaycio M, Zenk D, Marcucci G. A Phase II study of Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) combined with gemtuzumab ozogamicin in older patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *Leuk Res*. 2006; 30: 777-783.
 38. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2010; 15: 1126-1132.
 39. Lowenberg B, Morgan G, Ossenkoppele GJ, et al. A Phase II study of Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) combined with gemtuzumab ozogamicin in older patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 4333-4338.
 40. Klimek VM, Fircanis S, Maslak P, Guernah I, Baum M, Wu N, Panageas K, Wright JJ, Pandolfi PP, Nimer SD. Tolerability, pharmacodynamics, and pharmacokinetics studies of depsipeptide (romidepsin) in patients with acute myelogenous leukemia or advanced myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 826-832.
 41. Garcia-Manero G, Yang H, Bueso-Ramos C, Ferrajoli A, Cortes J, Wierda WG, Faderl S, Koller C, Morris G, Rosner G, Loboda A, Fantin VR, Randolph SS, Hardwick JS, Reilly JF, Chen C, Ricker JL, Secrist JP, Richon VM, Frankel SR, Kantarjian HM. Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2008; 111: 1060-1066.

42. Schaefer EW, Loaiza-Bonilla A, Juckett M, DiPersio JF, Roy V, Slack J, Wu W, Laumann K, Espinoza-Delgado I, Gore SD; Mayo P2C Phase II Consortium. A phase 2 study of vorinostat in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2009; 94: 1375-1382.
43. Maiso P, Colado E, Ocio EM, Garayoa M, Martín J, Atadja P, Pandiella A, San-Miguel JF. The synergy of panobinostat plus doxorubicin in acute myeloid leukemia suggests a role for HDAC inhibitors in the control of DNA repair. *Leukemia*. 2009; 23: 2265-2274.
44. George P, Bali P, Annavarapu S, Scuto A, Fiskus W, Guo F, Sigua C, Sondarva G, Moscinski L, Atadja P, Bhalla K. Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3. *Blood*. 2005; 105: 1768-1776.

Targeted therapy nelle malattie mieloproliferative croniche Philadelphia-negative

Alessandro Maria Vannucchi

S.O.D. di Ematologia, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

Le neoplasie mieloproliferative croniche Philadelphia negative (MPN), che includono la policitemia vera (PV), la trombocitemia essenziale (ET) e la mielofibrosi primaria PMF), sono rimaste “orfane” di un marcatore molecolare sino al 2005, quando è stata descritta la prima mutazione somatica ricorrente rappresentata dalla mutazione puntiforme V617F nell’esone 14 del gene JAK2 (1). Jak2 è una protein-chinasi coinvolta nella trasmissione del segnale di numerosi recettori per citochine e fattori di crescita, tra i quali in particolare la eritropoietina e la trombopoietina. Questa mutazione conferisce una attività fosforilasi autonoma alla proteina JAK2, che è quindi in grado di segnalare attraverso l’attivazione del pathway JAK/STAT anche in assenza del legame con la citochina specifica. Si tratta quindi di una mutazione “gain-of-function”, come indicato dalla autonoma fosforilazione di JAK2 e STAT5 dimostrabile in queste cellule (2). La presenza della proteina mutata è alla base del caratteristico fenomeno della crescita “endogena”, ovvero eritropoietina-indipendente, di progenitori eritroidi nella PV (EEC). Successivamente sono state identificate altre mutazioni a carico dell’esone 12 di JAK2 (in alcune forme di policitemia vera negative per la più frequente mutazione V617F) (3, 4) e mutazioni a carico del gene che codifica per il recettore della trombopoietina (MPN) (5, 6); funzionalmente queste proteine mutate hanno le caratteristiche della proteina JAK2 V617F. La mutazione JAK2V617F è in grado di determinare un fenotipo mieloproliferativo in animali che la overesprimono. Infatti, topi che hanno ricevuto cellule di donatore transfettate con il gene JAK2V617F sviluppano un quadro del tutto simile alla PV, che nell’arco di alcuni mesi evolve verso una forma di mielofibrosi con riduzione dei valori eritrocitari, leucocitosi, e sviluppo di fibre a livello midollare. Ulteriori studi in modelli animali hanno dimostrato che il fenotipo che si sviluppa è in larga parte dipendente dalla quantità relativa della proteina JAK2V617F mutata rispetto a quella normale (wild-type, wt). In animali transgenici che esprimono simili livelli di JAK2 wt e JAK2V617F si osserva prevalentemente trombocitosi, mentre quando prevale la forma mutata il fenotipo è quello della PV. Questi studi hanno confermato ampiamente osservazioni nei pazienti con MPN in base alle quali esi-

ste una differenza di carica allelica mutata tra i soggetti co PV (valori medi superiori al 50%) e quelli con ET (valori medi attorno al 20%) e con PMF (tendenzialmente superiori al 50%). Pertanto, la carica allelica del gene JAK2V617F è un importante fattore nel fenotipo di malattia. Vi sono inoltre evidenze che il progressivo aumento della carica allelica di JAK2V617F si accompagna ad una più frequente progressione della PV e della ERT verso la mielofibrosi (7-9).

La proteina JAK2V617F mutata, che è presente in più del 95% dei soggetti con PV e in circa il 60% di quelli con ET o PMF, rappresenta quindi un possibile bersaglio terapeutico, venendo così a configurare la possibilità di “targeted therapy”, sulla scorta di quanto da anni avviene per la leucemia mieloide cronica BCR/ABL1 mutata. Infatti, in questi ultimi tre anni sono stati attivati, e in parte completati, studi clinici di fase 1/2 con inibitori di JAK2 (e JAK1) nella mielofibrosi e, più limitatamente anche in PV e ET; inoltre, sono noti i primi risultati di uno studio di fase 3 randomizzato con il più noto di questi inibitori (Ruxolitinib, o INCB018424) in pazienti con mielofibrosi.

Attualmente l’approccio terapeutico al paziente con MPN si basa su alcuni fattori, dei quali il più importante è certamente rappresentato dalla stratificazione dei soggetti in classi di rischio diverse. Nel caso della PV e della ET, si riconoscono pazienti a basso rischio e ad alto rischio a seconda che questi abbiano un’età superiore o meno a 60 anni e abbiano già avuto manifestazioni di tipo trombotico; la presenza di una sola di queste due variabili identifica infatti la categoria di soggetti ad alto rischio (10, 11). Le indicazioni terapeutiche attuali sono per l’approccio conservativo nelle forme a basso rischio (salassoterapia e basse dosi di aspirina nella PV; solo aspirina, o anche osservazione nella ET) mentre nell’alto rischio è indicata la citoriduzione, che si effettua generalmente con idrossiurea, associata a salassoterapia (se necessaria, nella PV) e aspirina. Alcuni pazienti, che possono essere stimati attorno al 3-5%, sviluppano però una resistenza/refrattarietà al trattamento con idrossiurea, o sviluppano effetti collaterali che ne impongono la sospensione. I criteri per definire la resistenza/intolleranza alla idrossiurea sono stati stilati da parte dell’European Leukemia Net (ELN) (12, 13).

Nel caso della PMF, la definizione del rischio si ottiene attualmente utilizzando i criteri dell’International Prognostic Score System sviluppati dall’International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). In base a 5 variabili (età, anemia, leucocitosi, sintomi costituzionali e presenza di >1% blasti nel sangue periferico) i pazienti vengono stratificati in quattro classi di rischio (basso, intermedio-1 e -2, alto) con sopravvivenza che varia da oltre 12 anni a meno di due anni (14). Questi criteri sono utili sia alla diagnosi che durante il decorso della malattia (Dynamic IPSS, DIPPS) (15); recentemente sono stati aggiunti (DIPPS-plus) anche la presenza di piastrinopenia, trasfusione-dipendenza e il cariotipo sfavorevole (16). L’approccio terapeutico convenzionale alla PMF è quanto mai vario e complesso, dovendo tenere conto delle principali necessità cliniche dei pazienti, variamente rappresentata dalla anemia, dai sintomi dovuti alla splenomegalia, dalla prevenzione del rischio trombotico, dai sintomi sistemici e dall’eventuale sviluppo di manifestazioni cliniche dovute all’emopoiesi eterotopa (16). La terapia è comunque poco efficace e certamente non in grado di modi-

ficare la sopravvivenza né di rallentare o prevenire la trasformazione leucemica, che avviene nel 10-15% dei soggetti. Il trapianto di cellule staminali allogeniche rappresenta la sola possibilità di curare la malattia, ma è attualmente riservato a soggetti giovani ad alto rischio con un donatore disponibile (17).

La scoperta di queste anomalie molecolari e la migliore comprensione di alcuni aspetti fisiopatologici delle malattie hanno favorito lo sviluppo di terapie a “bersaglio”. Tra questi innanzitutto una serie di farmaci che posseggono un’attività di inibizione contro JAK2, elencati nella Tabella 1. Questi farmaci non sono inibitori selettivi della proteina JAK2 mutata, ma inibiscono anche la proteina wild-type; inoltre, differiscono tra loro per il rapporto di attività anti-JAK2 versus JAK1, che per molti di questi è però sostanzialmente simile. La maggior esperienza clinica accumulata sin’ora riguarda Ruxolitinib (o INCB018424), che è anche l’unico di questa classe di farmaci che sia stato impiegato in studi clinici di fase 3 randomizzati. Nello studio di fase 1/2 pubblicato da Verstovsek e colleghi sono stati trattati 153 pazienti con forme primarie o post-PV/post-ET di mielofibrosi (18). Il trattamento ha comportato una rapida diminuzione della splenomegalia, che in oltre la metà dei casi si è ridotta di oltre il 50% il valore basale; un miglioramento dei sintomi costituzionali ed il recupero del peso corporeo nei soggetti con bassa massa corporea. Questi effetti sono largamente attribuibili alla drastica riduzione dei livelli di citochine pro-infiammatorie che sono stati riscontrati essere estremamente elevati nei soggetti con mielofibrosi, e devono essere probabilmente ascritti alla attività di inibizione delle vie di segnalazione mediate da JAK1 piuttosto che JAK2 (19). Il farmaco è risultato tollerato bene, con pochi e clinicamente poco rilevanti effetti collaterali sistemici, mentre la tossicità ematologica è risultata modesta alla dose ottimale di 15 mg due volte die (piastrinopenia nel 3% dei casi e progressione dell’anemia nell’8%, compensata da un’eguale proporzione di pazienti che hanno avuto un miglioramento). I risultati clinici sono simili per il farmaco TG101348, che però risulta meno tollerato con circa un quarto dei pazienti che hanno dovuto sospendere il trattamento (20), e per CYT387, che nei dati preliminari ha dimostrato una attività anche sull’anemia in circa il 50% dei casi (21). Tutti questi farmaci hanno mostrato un’attività sostanzialmente modesta circa la riduzione della carica allelica di JAK2V617F, suggerendo che il loro effetto sul clone debba essere minimo. Sono quindi farmaci con importante effetto palliativo, i cui effetti sulla storia naturale della malattia devo-

Tab. 1 - Farmaci con attività anti-JAK2 e JAK1.

Farmaco	α -JAK2 vs JAK1	α -JAK2 vs JAK3	Altri target noti	Fase	Pat. No.	Ref
Ruxolitinib (INCB018424)	x 1.0	x 98	none known	1/2 3	153 628	(1) ongoing
TG101348	x 35	x 332	FLT3, Ret	1	59	(2)
CYT387	x 0.6	x 8.6	JNK1, CDK2	1/2	36	(3)
CEP-701	n.a.	x 3.0	FLT3, TrkA	2	22	(4)
AZD1480	x 5.0	x 15	Aurora A, TrkA FG Fr1	1/2	unkn	ongoing
SB1518	x 58	x 24	FLT3	1/2	31	(5)

Tab. 2 - Altri farmaci innovativi per il trattamento del MPN.

Classe	Molecola	In vitro	Clinical trial	Referenza
Immunomodulators	Pomalidomide		✓	Tefferi et al. JCO. 2009; 27: 4563-9.
	Lenalidomide	✓		Mesa et al. Blood. 2010; 116: 4436-8
mTOR inhibitors	Everolimus	✓	✓	Vannucchi et al. (ASH annual Meeting Abstract); 2010; 116: 314
Hypomethylating agents	Azacitidine	✓	✓	Mesa et al. Leukemia. 2009; 23: 180-2
	Decitabine			Danilov et al. BJH. 2009; 145: 131-2
Histone deacetylase inhibitors	Givinostat	✓	✓	Rambaldi et al. BJH. 2010; 150: 446-55
	Panobinostat	✓	✓	De Angelo et al. (ASH annual Meeting Abstract). 2010; 276
BCL-2 inhibitors	Obatoclox mesylate	✓	✓ ^O	Parikh et al. Clin Lymph Myel Leuk. 2010; 10: 285-9
α -Interferon			✓	Silver et al. Leukemia. 2009; 23: 1366-9
BCL-XL inhibitors	ABT-737	✓		Lu et al. Blood. 2010; 116: 4284-7
HSP90 inhibitors	PU-H71	✓		Levine et al. JCI. 2010; 120: 3578-93

no però essere ancora valutati nel termine medio-lungo. Inoltre, è del tutto sconosciuto il meccanismo con cui sono in grado di determinare una così rapida e sostenuta riduzione della splenomegalia, che non sembra essere attribuibile ad un effetto di tipo citotossico. Effetti sovrapponibili sulla splenomegalia e sui sintomi sono stati ottenuti anche con un inibitore di mTOR (RAD001, Everolimus) in uno studio di Fase 1/2, a sostegno dell'ipotesi che anche la via di segnalazione Akt/mTOR è funzionalmente coinvolta nella abnorme proliferazione dei progenitori emopoietici delle MPN (22).

In aggiunta agli inibitori di JAK2/JAK1 altri farmaci a bersaglio molecolare potenzialmente utili (e in fase di sperimentazione a vario livello) nelle MPN sono elencati nella tabella 2. Questi comprendono immunomodulatori più potenti e meglio tollerati della talidomide (come la pomalidomide, che ha dimostrato una efficacia nei pazienti anemici con mielofibrosi (23, 24), o la lenalidomide che trova un'indicazione assoluta nei pazienti con anomalia 5q-) (25); farmaci ad attività "epigenetica", come gli inibitori delle deacetilasi istoniche (quali Givinostat, recentemente impiegato in uno studio pilota nelle tre MPN (26, 27) o farmaci ipometilanti (28); regolatori dei meccanismi dell'apoptosi; e l'interferone, che nei pazienti con policitemia si è dimostrato in grado di ottenere remissioni molecolari anche complete (29). È possibile che, nel prossimo futuro, si debbano analizzare combinazioni di farmaci con meccanismo di attività diverso e che mostrino attività sinergica, capaci quindi di agire su vie di segnalazioni non sovrapposte e di determinare risposte cliniche su obiettivi diversi. Non vi è dubbio che si sia aperta una nuova era nel trattamento delle neoplasie mieloproliferative croniche indirizzata allo sviluppo di terapie mirate ma, al tempo stesso, va preso atto del fatto che ancora non è disponibile un farmaco con le caratteristiche di Imatinib nella leucemia mieloide cronica.

Bibliografia

1. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *CA Cancer J Clin.* 2009; 59: 171-191.
2. Cazzola M, Skoda R. Gain of function, loss of control - a molecular basis for chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica.* 2005; 90: 871-874.
3. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med.* 2007; 356: 459-468.
4. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood.* 2011: blood-2010-2011-316810.
5. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* 2006; 3: e270.
6. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood.* 2008; 112: 844-847.
7. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia.* 2008; 22: 1299-1307.
8. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Clinical profile of homozygous JAK2V617F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood.* 2007; 110: 840-846.
9. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia.* 2010; 24: 1574-1579.
10. Vannucchi AM, Barbui T. Stratified management of essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Hematology Education.* 2008; 201-208.
11. Barbui T, Finazzi G. When and how to treat essential thrombocythemia. *N Engl J Med.* 2005; 353: 85-86.
12. Barosi G, Besses C, Birgegard G, et al. A unified definition of clinical resistance/intolerance to hydroxyurea in essential thrombocythemia: results of a consensus process by an international working group. *Leukemia.* 2007; 21: 277-280.
13. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, et al. A unified definition of clinical resistance and intolerance to hydroxycarbamide in polycythaemia vera and primary myelofibrosis: results of a European LeukemiaNet (ELN) consensus process. *Br J Haematol.* 2010; 148: 961-963.
14. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood.* 2009; 113: 2895-2901.
15. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT

- (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010; 115: 1703-1708.
16. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, et al. Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Critical Concepts and Management Recommendations From European LeukemiaNet. *Journal of Clinical Oncology*. 2011.
 17. Kroger N, Mesa RA. Choosing between stem cell therapy and drugs in myelofibrosis. *Leukemia*. 2008; 22: 474-486.
 18. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2010; 363: 1117-1127.
 19. Vannucchi AM. From palliation to targeted therapy in myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2010; 363: 1180-1182.
 20. Pardanani A, Gotlib JR, Jamieson C, et al. Safety and Efficacy of TG101348, a Selective JAK2 Inhibitor, in Myelofibrosis. *Journal of Clinical Oncology*.
 21. Pardanani A, George G, Lasho T, et al. A Phase I/II Study of CYT387, An Oral JAK-1/2 Inhibitor, In Myelofibrosis: Significant Response Rates In Anemia, Splenomegaly, and Constitutional Symptoms *Blood*. 2010; 116: 460A.
 22. Vannucchi AM, Bogani C, Bartalucci N, et al. The mTOR Inhibitor, RAD001, Inhibits the Growth of Cells From Patients with Myeloproliferative Neoplasms. *Blood*. 2009; 114: 2914A.
 23. Tefferi A, Verstovsek S, Barosi G, et al. Pomalidomide is active in the treatment of anemia associated with myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 4563-4569.
 24. Mesa RA, Pardanani AD, Hussein K, et al. Phase 1/2 study of Pomalidomide in myelofibrosis. *Am J Hematol*. 2010; 85: 129-130.
 25. Tefferi A, Cortes J, Verstovsek S, et al. Lenalidomide therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2006; 108: 1158-1164.
 26. Guerini V, Barbui V, Spinelli O, et al. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 selectively targets cells bearing mutated JAK2(V617F). *Leukemia*. 2008; 22: 740-747.
 27. Rambaldi A, Dellacasa CM, Finazzi G, et al. A pilot study of the Histone-Deacetylase inhibitor Givinostat in patients with JAK2V617F positive chronic myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol*. 2010; 150: 446-455.
 28. Mesa RA, Verstovsek S, Rivera C, et al. 5-Azacitidine has limited therapeutic activity in myelofibrosis. *Leukemia*. 2008; 23: 180-182.
 29. Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, et al. High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. *Blood*. 2006; 108: 2037-2040.

Molecular basis of target therapy for aggressive B-Cell lymphoma

*Riccardo Bruna, Silvia Rasi, Alessio Brusca, Valeria Spina,
Michaela Cerri, Clara Deambrogi, Sara Monti, Stefania Cresta,
Daniela Piranda, Marco Fangazio, Silvia Franceschetti, Daniela Capello,
Davide Rossi, Gianluca Gaidano*

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale & IRCAD, Divisione di Ematologia,
Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Novara

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is a heterogeneous disease, with patients exhibiting a wide range of outcomes that are clinically predicted by the International Prognostic Index (IPI). Although advances in treatment and identification of clinical indicators have led to improved prognosis and have allowed some tailoring of therapy, a significant fraction of DLBCL patients still fail treatment and die of their disease.

Clinical models predicting DLBCL outcome do not take into account the high degree of molecular heterogeneity and the pathogenetic mechanisms of DLBCL. Knowledge of the main molecular pathways sustaining DLBCL growth are a prerequisite for a rational approach toward target therapy of DLBCL. Two main approaches have concurred to the clarification of DLBCL biology. Conventional and high throughput studies of structural genetic lesions, predominantly gene rearrangements and mutations, have identified genes that are recurrently affected in DLBCL patients.

Transcriptional profiling and associated functional analyses have further increased our understanding of DLBCL, and have recognized pathological subtypes of the lymphoma with shared features and reliance upon targetable survival pathways. This knowledge has been instrumental in defining novel biological prognosticators and in devising strategies for target therapy of DLBCL. In addition to the molecular features of DLBCL tumor cells, some genetic characteristics of the host, such as the pharmacogenetic background of DLBCL patients, may be important for molecularly tailored therapies.

Therapeutic strategies targeting molecular pathways and genetic lesions of DLBCL tumor cells

Studies of the molecular pathogenesis of DLBCL have revealed a number of potential targets for rational therapeutic strategies. Molecular targets that have

been exploited for rational therapeutic strategies of DLBCL in pre-clinical models or in early phase clinical trials include (Table 1):

- protein kinase C β ;
- the BCL6 proto-oncogene;
- histone deacetylase;
- the B-cell receptor (BCR) cascade;
- the NF- κ B system.

Protein kinase C β as a therapeutic target for DLBCL

Gene expression profiling and immunohistochemistry studies have shown that protein kinase C β (PKC β) expression associates with poor prognosis and reduced survival in DLBCL. PKC β is a serine/threonine kinase phosphorylating the scaffolding protein CARD11 (also known as CARMA1). PKC β brings into close proximity two kinases, known as transforming growth factor-activated kinase 1 (TAK1) and I κ B-inhibitor kinase (I κ K). This PKC β -mediated molecular proximity renders TAK1 able to phosphorylate I κ K. In turn, phosphorylation of I κ K represents the initial step of the cascade activating the pro-survival NF κ B pathway. PKC β is also an essential component of the VEGF signaling pathway. This fact is of note since tumor angiogenesis mediated by VEGF has been proposed to herald poor prognosis in DLBCL.

The expression of PKC β in DLBCL with unfavorable prognosis and the role of the kinase in critical signaling pathways, including NF κ B and VEGF-mediated tumor angiogenesis, suggested that PKC β might be a rational therapeutic target in DLBCL and prompted analysis of molecules representing possible inhibitors of the PKC β target.

Enzastaurin HCl is an adenosine triphosphate-competitive, selective inhibitor of PKC β that induces apoptosis and inhibits the proliferation of cell lines representative of different tumors, including DLBCL, glioblastoma, and colon carcinoma. Notably, in animal models, enzastaurin HCl is also able to antagonize proliferation of tumor xenografts at low micromolar doses.

After determining doses and safety profile in a phase I study, a phase II multi-center trial of oral enzastaurin has been conducted in patients with relapsed/refractory DLBCL. Twelve of 55 patients with relapsed DLBCL (22%; 95% CI, 13% to 46%) experienced freedom from progression (FFP) for \geq two

Table 1 - Molecular targets for rational therapeutic strategies of DLBCL.

Target	Function	Drug(s)	Reference
PKC β	Serine/threonine kinase phosphorylating the scaffolding protein	CARD11	
		Enzastaurin	(7)
BCL6	Transcriptional repressor	RI-BPI	(2)
SYK	BCR signaling	Fostamatinib	(3)
NF κ B pathway	Regulates cell survival, cell proliferation, and cell adhesion	Bortezomib,	(5)
		Lenalidomide, other NF- κ B inhibitors	
HDAC	Deacetylation of histones and of BCL6	HDAC inhibitors	(6)

cycles, and eight patients remained free from progression for \geq four cycles (15%; 95% CI, 6% to 27%). Four patients (7%; 95% CI, 2% to 18%) continued to experience FFP 20+ to 50+ months after study entry. Overall, treatment with enzastaurin was well tolerated and associated with prolonged FFP in a small subset of patients. These pilot data prompted the development of additional multicenter phase III trials of standard induction therapies (rituximab-CHOP) with or without enzastaurin as initial therapy in patients with high intermediate/high risk DLBCL.

BCL6 as a therapeutic target for DLBCL

Chromosomal alterations affecting band 3q27 and several alternative partner chromosomes are a frequent recurrent abnormality in DLBCL. The cloning of the 3q27 chromosomal breakpoints revealed the *BCL6* gene, a transcriptional repressor containing zinc fingers, a protein sequence motif able to mediate the protein binding to specific DNA sites. *BCL6* expression is topographically restricted to the germinal center (GC), where *BCL6* is expressed by both centroblasts and centrocytes, whereas expression of *BCL6* is absent in pre-GC B cells (naïve B cells) and post-

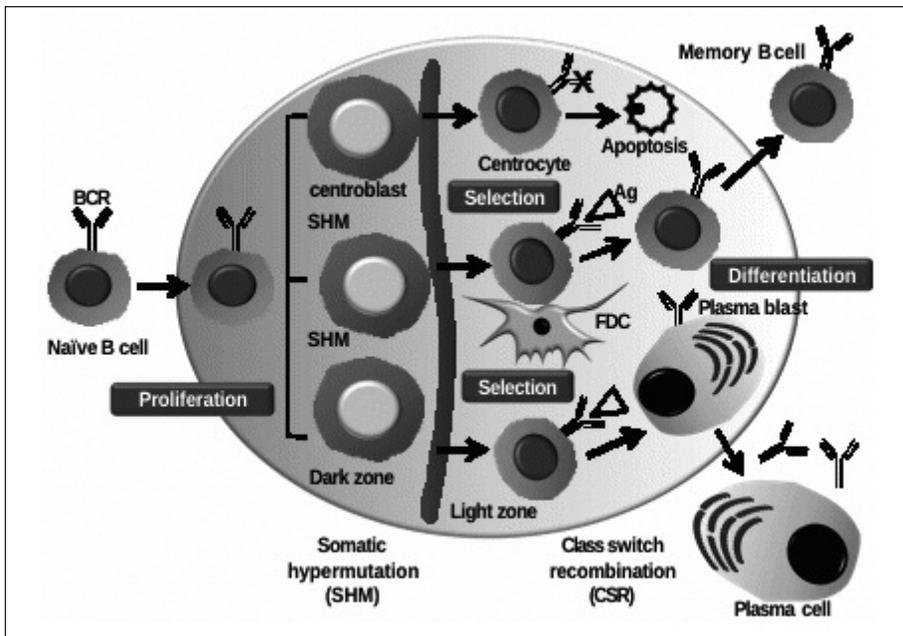


Fig. 1 - The germinal centre reaction. Naïve B cells differentiate into centroblasts and undergo clonal expansion in the dark zone of the germinal centre. During this process, somatic hypermutation (SHM) targets the IGV regions of the B cell receptor (BCR); some of these mutations may change the aminoacid sequence and increase, or decrease, the BCR affinity for antigen (Ag). Centroblasts subsequently differentiate into centrocytes, which reside in the germinal centre light zone. With help from T cells (not shown) and follicular dendritic cells (FDC), the mutated BCR is selected for antigen binding. Newly generated centrocytes whose mutations decreased BCR affinity for antigen undergo apoptosis and are removed. A subset of centrocytes undergoes class switch recombination. Antigen selected centrocytes eventually differentiate into memory B cells or plasma cells. Expression of *BCL6* is restricted to GC centroblasts and centrocytes.

GC B cells (memory B cells and plasma cells) (Fig. 1). The observation that *BCL6* is expressed within the GC, but not before entrance into or after exit from the GC is consistent with the fact that *BCL6* is needed for GC development and sustenance, while its downregulation is necessary for further differentiation of B cells. *BCL6* determines the ability of GC B cells to tolerate their extremely high proliferation rate while undergoing DNA remodeling in the GC. In fact, *BCL6* suppresses apoptotic and cell cycle arrest responses by directly suppressing *TP53* transcription and by suppressing the activation of the cell cycle arrest gene *p21*. *BCL6* rearrangements are detectable in 35% of DLBCL. In all of *BCL6* rearrangements, the entire coding sequence of *BCL6* is juxtaposed downstream to heterologous sequences which may originate from different chromosomal sites in different patients. The common functional consequence of *BCL6* translocations is the juxtaposition of heterologous promoters to the *BCL6* coding domain, a mechanism called promoter substitution. The substitution of the *BCL6* promoter by heterologous regulatory sequences causes deregulated *BCL6* expression in lymphomas carrying *BCL6* rearrangements. Thus, *BCL6* rearrangements may prevent downregulation of *BCL6* and, in turn, block the differentiation of GC B cells toward the stage of plasma cells. In particular, *BCL6* translocations abrogate the NF- κ B mediated induction of the IRF4 transcription factor that, in normal B cells, represses *BCL6* expression. Another way whereby *BCL6* contributes to lymphomagenesis is functional inactivation of *TP53*. *BCL6* functions normally to suppress *TP53*-mediated apoptosis of GC B cells in response to DNA damage during the GC reaction. Constitutive expression of *BCL6* decreases the *TP53*-mediated apoptotic response to DNA damage, promoting persistence of malignant clones.

The fact that *BCL6* is lymphomagenic and is frequently activated in de novo DLBCL represent optimal prerequisites for its exploitation as a therapeutic target. Recently, a peptomimetic inhibitor of *BCL6* has been shown to display potent anti-lymphoma activity both in vitro and in animal models. This peptide inhibitor, known as RI-BPI (for *retroinverso BCL6 peptide inhibitor*), can inhibit *BCL6* biologic functions, including its transcriptional repressor activity, and selectively kills DLBCL cells associated with the BCR gene expression profile. In animal models, RI-BPI was nontoxic and nonimmunogenic even after prolonged administration, and could powerfully suppress the growth of DLBCL xenografts in a dose-dependent manner. Although RI-BPI could kill primary DLBCL cells, it had no effect on normal lymphoid tissues or other tumors, confirming the specificity of action of this compound. Rational design of a peptidomimetic inhibitor of *BCL6* demonstrates that this oncoprotein is an excellent therapeutic target for anti-lymphoma therapy, and provides the basis for future clinical studies in DLBCL patients.

Targeting HDAC in DLBCL

Acetylation plays a major role in down regulating *BCL6*, with histone deacetylase (HDAC) being required to lift this repression. Pharmacologic inhibition of HDAC in lymphomas expressing *BCL6* may lead to tonic acetylation and inhibition of

this pathway. This deacetylation pathway interferes with the *TP53* pathway, providing further rationale for inhibiting deacetylation in DLBCL. On these basis, several HDAC inhibitors are under investigation in DLBCL. Because HDAC inhibitors are not specific for *BCL6*, inhibiting HDAC in DLBCL can have a number of effects on the cell, some of which may be mediated through *BCL6* modulation, and some through chromatin remodeling that is a well known effect of HDAC inhibitors in general.

Tonic BCR signaling as a therapeutic target for DLBCL

A subset of DLBCL have a transcriptional profile characterized by increased expression of multiple components of the BCR signaling cascade including the SYK tyrosine kinase. Recent studies highlight the role of BCR-mediated survival signals in normal B cells and B-cell lymphomas. Engagement of the BCR recruits and activates SYK and downstream pathways. Although BCR signaling is triggered by antigen binding, emerging data highlight the role of “tonic” BCR survival signals in the absence of receptor engagement.

SYK plays a critical role in tonic BCR signaling, transmitting downstream events and amplifying the original signal. The activity of SYK is tightly regulated by BCR-associated phosphorylation and protein tyrosine phosphatase-mediated inhibition. These reasons prompted assessment of the role of SYK-dependent tonic BCR survival signals in primary DLBCL and DLBCL cell lines as well as evaluation of the *in vitro* efficacy of a competitive SYK inhibitor, R406. R406 induced apoptosis in the majority of DLBCL cell lines and primary tumors and specifically inhibited tonic BCR signaling.

The *in vitro* studies indicated that SYK-dependent tonic BCR signaling was a targetable survival pathway in certain B-cell lymphomas, prompting further clinical investigation. A phase I/II trial of an oral version of the SYK inhibitor, R788/fos-tamatimib disodium (FOS D), was recently completed. The oral SYK inhibitor was evaluated in relapsed/refractory DLBCL, follicular lymphoma and additional B-cell malignancies. In this clinical trial, there was clear evidence of activity in DLBCL.

NF- κ B as a potential therapeutic target for DLBCL

Sustained activity of NF- κ B signaling leads to aberrant expression of NF- κ B target genes, including loci involved in cell survival, cell proliferation, cell adhesion, and inflammation (Fig. 2). In DLBCL, activation of the NF- κ B system in tumor cells may be due to molecular lesions intrinsic to the tumor clone and affecting genes belonging to or regulating the NF- κ B system. Five subunits combine into hetero- and homodimers to create the NF- κ B transcription factor family (p50, p52, c-Rel, p65/RelA, and RelB). Such dimers are inactive in the cytoplasm in most normal cells, due to the interaction of NF- κ B dimers with I κ B inhibitors. Activation of NF- κ B signaling may follow two general pathways. In the classical (or canonical) pathway IKK β phosphorylates the inhibitory subunits I κ B α , I κ B β , or I κ B ϵ , leading to their degradation in the proteasome. As a result, the NF- κ B

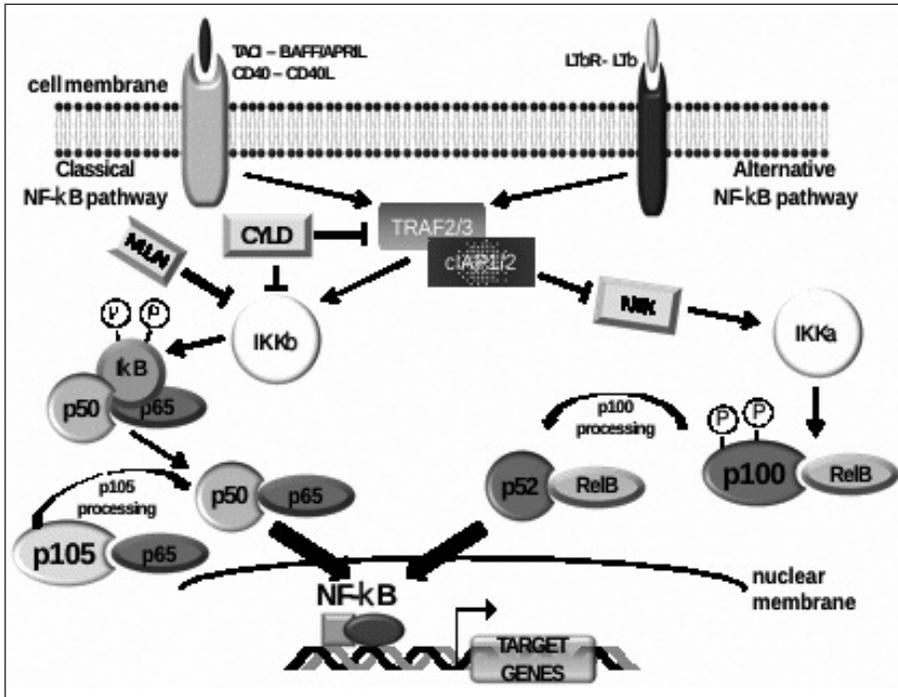


Fig. 2 - The NF- κ B pathway and its involvement in DLBCL. Five subunits combine into hetero- and homodimers to create the NF- κ B transcription factor family (p50, p52, c-Rel, p65/RelA, and RelB). Such dimers are inactive in the cytoplasm in most normal cells, due to the interaction of NF- κ B dimers with I κ B inhibitors. Activation of NF- κ B signaling may follow two general pathways. In the classical (or canonical) pathway, IKK β phosphorylates the inhibitory I κ B molecule, leading to degradation (not shown) in the proteasome. As a result, the NF- κ B heterodimers p50/p65 and c-rel/p65 accumulate in the nucleus. In the alternative (or non-canonical) pathway, IKK α phosphorylates p100/NFKB2, resulting in proteasomal removal of an inhibitory C-terminal domain and generating the NF- κ B p52 subunit. As a consequence, the p52/RelB heterodimers preferentially accumulate in the nucleus. Following translocation to the nucleus, p50/p65, c-rel/p65 and p52/RelB activate transcription of target genes. In DLBCL, the NF- κ B pathway is altered by several structural alterations, whose common effect is to activate the NF- κ B cascade.

heterodimers p50/p65 and c-rel/p65 accumulate in the nucleus. In the alternative (or non-canonical) pathway, IKK α homodimers phosphorylate p100/NFKB2, resulting in proteasomal removal of an inhibitory C-terminal domain and generating the NF- κ B p52 subunit. As a consequence, p52/RelB heterodimers preferentially accumulate in the nucleus. These two pathways, however, show much interplay and overlap: many signals activate both NF- κ B pathways, many of the same cytoplasmic effector proteins are used in both pathways, and many target genes are activated by both pathways.

Gene expression studies have shown that the most aggressive biological type of DLBCL, i.e. activated B cell-like (ABC) DLBCL, is associated with constitutive activation of the NF- κ B transcription complex. In >50% of ABC-DLBCL, NF- κ B activation is due to somatic mutations in negative and/or positive regulators of NF- κ B. Negative regulators of NF- κ B mutated in DLBCL include the

TNFAIP3 gene, also known as *A20*. Positive regulators of NF- κ B mutated in DLBCL include the *CARD11*, *TRAF2*, *TRAF5*, *MAP3K7 (TAK1)*, and *TNFRSF11A (RANK)* genes. Of these, the *A20* gene, which negatively regulates NF- κ B, is most commonly affected, with 30% of patients displaying biallelic inactivation by mutations and/or deletions. When reintroduced into cell lines carrying biallelic inactivation of the gene, *A20* induces apoptosis and cell growth arrest, indicating its pathogenetic role in DLBCL. Activation of NF- κ B by one or more of the aforementioned genetic lesions may provide suitable targets for rational therapy by drugs interfering with NF- κ B. However, available candidate inhibitors have either not been potent enough for clinical development or have multiple other likely mechanisms of action. For example, the proteasomal inhibitor, bortezomib, blocks the proteasomal degradation of the cytosolic inhibitor of kappaB, I κ KB, but also affects many other cellular proteins and pathways. IMiDs may interfere with NF- κ B among several other effects of this class of drugs. Studies of lenalidomide combined with CHOP are in progress in the context of DLBCL.

The host pharmacogenetic profile as a molecular tool to personalize therapy in DLBCL

Beside the biology of tumor cells, also the genetic background of the host may be relevant for cancer prognostication and for tailored therapy. In particular, pharmacogenetic studies have documented that host's single nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting genes involved in drug metabolism, detoxification, and transport are responsible, at least in part, for the inter-individual variability in efficacy and toxicity of a given pharmacologic treatment. Until recently, the impact of pharmacogenetics as a predictor of outcome and toxicity in the context of DLBCL had been poorly investigated.

R-CHOP pharmacogenetics in DLBCL

Rituximab-CHOP (R-CHOP) is the standard treatment for DLBCL. To address the potential role of the host pharmacogenetic profile in DLBCL treatment and management of toxicity, pharmacogenotyping was performed on a consecutive series of 106 newly diagnosed DLBCL treated with R-CHOP21 at our institution. This study documented that:

1. host SNPs affecting alkylating agent detoxification (*GSTA1*-4621C>T) and doxorubicin pharmacodynamics (*CYBA*-4185C>T) are independent predictors of event free survival (EFS) in DLBCL treated with R-CHOP21;
2. *NCF4*-368A>G, a SNP belonging to NAD(P)H-oxidase p40phox and regulating reactive oxygen species (ROS) generation, recurs as an independent protective host factor against both hematologic and non-hematologic toxicities of R-CHOP21. The independent predictive value of *GSTA1*-4621C>T, *CYBA*-4185C>T and *NCF4*-368A>G was validated in a prospectively collected dataset provided with a large number of tumor and host-related covariates, including IPI, organ function, comorbidities, and treatment feasibility.

The association of *GSTA1*-4621C>T and *CYBA*-4185C>T with R-CHOP21 efficacy and DLBCL outcome is biologically plausible and consistent with previous observations in settings other than lymphoma. *GSTA1* encodes an alpha class glutathione S-transferase that catalyses the conjugation of cyclophosphamide and its active metabolites with glutathione in order to increase water solubility and facilitate excretion. The *GSTA1*-4621 T minor allele associates with reduced levels of *GSTA1* enzyme in healthy individuals, and predicts for reduced detoxification of alkylating agents, thus increasing tumor cell exposure to the drug. DLBCL patients carrying the *GSTA1*-4621 CT/TT genotypes displayed a better EFS compared to DLBCL patients who carried the *GSTA1*-4621 CC genotype. Interestingly, in addition to DLBCL, the prognostic relevance of *GSTA1*-4621C>T in cancer patients treated with cyclophosphamide containing regimens is also documented in breast cancer. Conceivably, improved outcome in both DLBCL and breast cancer may be related to increased levels of cyclophosphamide derivatives mediating increased tumor cell killing.

The *CYBA* gene encodes the p22phox subunit of the NAD(P)H oxidase complex. Individuals carrying the *CYBA*-4185 T minor allele have a substantial reduction in ROS generation by NAD(P)H oxidase. Since ROS generation is one of the anti-tumor mechanism of doxorubicin, the *CYBA*-4185 T minor allele is expected to reduce the tumor cytotoxicity of doxorubicin based regimens. According to this model, DLBCL patients treated with R-CHOP21 and carrying the *CYBA*-4185 TT genotype displayed a poorer EFS compared to DLBCL patients who carried the *CYBA*-4185 CT/CC genotypes.

The genetic background of the host may add information useful for tailoring therapy when utilized in combination with IPI. In fact, in the study by Rossi et al. both *GSTA1*-4621C>T and *CYBA*-4185C>T identified a subgroup of DLBCL patients that, despite presenting with favorable IPI 0-2, eventually failed R-CHOP21. In addition, DLBCL patients presenting with both unfavorable IPI 3-5 and *GSTA1*-4621 CC genotype failed R-CHOP21 in virtually all cases.

In addition to outcome, the pharmacogenetic background of the host might be relevant for predicting R-CHOP toxicity. In fact, carriers of the *NCF4*-368 G minor allele experience less frequently hematologic, infective, and cardiac toxicity, conceivably because of reduced generation of ROS that are well known mediators of cardiac toxicity by doxorubicin and of neutrophil death upon exposure to chemotherapy. The protective effect of *NCF4*-368A>G appears to be independent of potentially confounding clinical variables, such as comorbidities, organ function, performance status and dose intensity.

Overall, SNPs of genes involved in the pharmacogenetics of R-CHOP may provide valuable markers for predicting failure of therapy and toxicity in DLBCL patients. To date, most of the new molecular markers identified for DLBCL have been derived from the biological characterization of the tumor clone. Based on the example of colon cancer and childhood leukemias, the results of pharmacogenetic studies in DLBCL highlight the need to improve the characterization of the host genetic background for devising strategies of molecularly tailored therapy.

Perspectives

From a clinical standpoint, understanding DLBCL biology may serve two major purposes:

- provide biologically-based prognosticators that might be both highly informative and independent of conventional predictors;
- identify genes and molecular pathways suitable for target therapy approaches.

Biological prognosticators of DLBCL are now well established, and their wide application in the clinical practice merely awaits simple and affordable technical approaches for their assessment. Target therapy of DLBCL is at an earlier stage, but significant advances have been made during the very last few years. Most studies have been focused on *de novo* DLBCL, although molecular targets are being currently identified also for transformed DLBCL, in particular Richter syndrome. Although target therapy is frequently looked upon as an “all problem-solving” strategy, it may not be so in such a molecularly heterogeneous disease as DLBCL has revealed to be. The genetic asset of DLBCL is far more complex than that, say, of chronic myeloid leukemia, and a prerequisite for the exploitation of target therapies in the single patient will be a detailed biological analysis of the lymphoma sample. Also, given the results achieved so far with immunochemotherapy in DLBCL, target therapy is expected to be used in combination strategies with conventional approaches, rather than be an immediate substitute for these well established modalities.

Bibliografia

1. Abramson JS, Shipp MA. Advances in the biology and therapy of diffuse large B-cell lymphoma: moving toward a molecularly targeted approach. *Blood*. 2005; 106: 1164-1174.
2. Cerchetti LC, Yang SN, Shaknovich R, Hatzi K, Polo JM, Chadburn A, Dowdy SF, Melnick A. A peptomimetic inhibitor of BCL6 with potent anti-lymphoma effects in vitro and in vivo. *Blood*. 2009; 113: 3397-3405.
3. Chen L, Monti S, Juszczynski P, Daley J, Chen W, Witzig TE, Habermann TM, Kutok JL, Shipp MA. SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2008; 111: 2230-2237.
4. Ci W, Polo JM, Melnick A. B-cell lymphoma 6 and the molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Hematol*. 2008; 15: 381-390.
5. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Bracamachary M, Shen Q, Bertoni F, Ponzoni M, Scandurra M, Califano A, Bhagat G, Chadburn A, Dalla-Favera R, Pasqualucci L. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- κ B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2009; 459: 717-721.
6. O'Connor O. Targeting histones and proteasomes: new strategies for the treatment of lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 6429-6436.
7. Robertson MJ, Kahl BS, Vose JM, de Vos S, Laughlin M, Flynn PJ, Rowland K, Cruz JC, Goldberg SL, Musib L, Darstein C, Enas N, Kutok JL, Aster JC,

- Neuberg D, Savage KJ, LaCasce A, Thornton D, Slapak CA, Shipp MA. Phase II study of enzastaurin, a protein kinase C beta inhibitor, in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 1741-1746.
8. Rossi D, Gaidano G. Genesis and consequences of genetic lesions in lymphoid neoplasms. In: *The lymphoid neoplasms*, 3rd ed. Magrath IT, ed. Hodder: London, in press.
 9. Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. *Hematol Oncol.* 2009; 27: 1-10,
 10. Rossi D, Rasi S, Franceschetti S, Capello D, Castelli A, De Paoli L, Ramponi A, Chiappella A, Pogliani EM, Vitolo U, Kwee I, Bertoni F, Conconi A, Gaidano G. Analysis of the host pharmacogenetic background for prediction of outcome and toxicity in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP21. *Leukemia.* 2009; 23: 1118-1126.

Mieloma multiplo

Michele Cavo, Giulia Perrone, Carolina Terragna

Istituto di Ematologia "Seràgnoli", Università degli Studi, Bologna

Nel corso degli ultimi 10 anni la terapia del Mieloma multiplo (MM) è radicalmente cambiata. L'introduzione nel programma terapeutico di nuovi farmaci, quali talidomide (1, 2) e i suoi derivati (3), e di inibitori del proteasoma (4, 5) (bortezomib), ha modificato la storia naturale della malattia determinando un prolungamento della sopravvivenza libera da malattia (PFS) e, frequentemente, un significativo aumento della sopravvivenza globale (OS) (6) rispetto all'era pre-talidomide.

La migliore comprensione del ruolo del microambiente nel sostenere la crescita e la sopravvivenza del clone neoplastico e dei meccanismi responsabili della progressione tumorale, ha permesso di identificare nuovi target biologici coinvolti nel processo oncogenetico. Nuove molecole (*small molecules*), in grado di inibire selettivamente processi biologici rilevanti per la crescita tumorale, sono state validate in studi pre-clinici e clinici come possibili target terapeutici (*targeted therapy*).

Tuttavia, nonostante l'entusiasmo generato dagli iniziali risultati ottenuti, l'evidenza che nell'era post-talidomide non sia ancora stata raggiunto un plateau nelle curve di sopravvivenza e che persista una popolazione non responsiva, ha portato ad intensificare la ricerca di nuove molecole dotate di un superiore profilo di efficacia associato ad una minore tossicità.

Targeted therapies

La storia degli ultimi anni ha dimostrato come il successo terapeutico dipenda più spesso dalla combinazioni di farmaci dotati di un diverso meccanismo d'azione, piuttosto che dall'utilizzo del singolo agente utilizzato in monoterapia, suggerendo che solamente l'inibizione contemporanea di più bersagli biologici sia in grado di superare adeguatamente le resistenze indotte dal singolo farmaco (7, 8). Di seguito un breve elenco delle principali molecole attualmente in studio pre-clinico e clinico, classificate in base al meccanismo d'azione ritenuto responsabile dell'effetto terapeutico.

a) inibitori del proteasoma di seconda e terza generazione

La dimostrata efficacia di bortezomib nell'ambito di numerosi studi clinici ha validato l'inibizione del proteasoma come un importante target terapeutico nei

pazienti con MM. Tuttavia nel corso della storia naturale della malattia molti pazienti sviluppano una resistenza al farmaco. Nuovi inibitori del proteasoma sono pertanto in studio. Fra questi, Carfilzomib, un potente inibitore irreversibile della subunità $\beta 5$ del proteasoma dotato di un profilo di tossicità inferiore, specialmente neurologico, ha dimostrato di superare *in vitro* e *in vivo* la resistenza indotta da bortezomib. Trial clinici attualmente in corso stanno validando anche altri inibitori del proteasoma (9, 10) (NPI-0052, MLN9708).

b) derivati della talidomide (IMiDs)

Pomalidomide, strutturalmente simile alla talidomide e alla lenalidomide (11), ha dimostrato *in vitro* di inibire la proliferazione delle cellule di MM, di indurre un effetto proapoptotico e di modulare l'adesione delle cellule di MM allo stroma midollare inibendo, in tal modo, la secrezione di citochine pro-infiammatorie e antiapoptotiche. Studi clinici hanno dimostrato che pomalidomide è grado di superare sia *in vitro* che *in vivo* la resistenza indotta da talidomide e/o lenalidomide e presenta un minore profilo di tossicità.

c) altri inibitori selettivi

Numerose altre molecole sono state studiate come possibili target terapeutici; fra queste inibitori dell'istone deacetilasi (vorinostat, panobinostat, romidepsin...) (12, 13), inibitori della trasmissione del segnale (CDK, HSP90, NKkB, mTOR, AKT) (14), anticorpi monoclonali diretti contro molecole di superficie (anti IL6, CD38, CD200) e mediatori della malattia ossea (anti-DKK1) sono in corso di valutazione nell'ambito di studi preclinici e clinici.

Dalla targeted therapies alla terapia personalizzata (tailored therapy)

Nonostante incoraggianti risultati emersi negli studi preclinici, meno del 10% delle molecole valutate in studi di fase I-II, ha ottenuto l'approvazione da parte degli organi competenti (FDA, EMEA). Questo parziale fallimento ha portato a sviluppare:

- a) nuovi modelli di studio pre-clinico in grado di riprodurre più fedelmente la complessità biologica della neoplasia;
- b) a cercare di selezionare una sottopopolazione di pazienti che maggiormente possa beneficiare di tale terapia.

Per questo motivo una crescente attenzione è stata posta, per esempio, all'integrazione dei dati provenienti dalla classificazione cariotipica e degli studi di biologia molecolare (profilo di espressione genica, mutazioni del DNA, profilo di metilazione) (15, 16) con i dati emersi dalla analisi clinica dei pazienti con MM (per esempio, pazienti di nuova diagnosi rispetto a pazienti pluritrattati, oppure nell'ambito di coorti di pazienti trattati uniformemente). In questa ottica gli attuali studi pre-clinici e clinici si pongono come obiettivo quello di identificare biomarker del target terapeutico e di correlarli con marcatori di sensibilità e di risposta al farmaco allo scopo di individuare per ogni singolo paziente il miglior target terapeutico.

Bibliografia

1. Rajkumar SV, Blood E, Vesole D, et al. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 431-6.
2. Cavo M, Di Raimondo F, Zamagni E, et al. Short-term thalidomide incorporated into double autologous stem-cell transplantation improves outcomes in comparison with double autotransplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2009; 27 (30): 5001-7.
3. Weber DM, Chen C, Niesvizky R, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. *N Engl J Med.* 2007; 357: 2133-42.
4. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F et al. GIMEMA Italian Myeloma Network. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study. *Lancet.* 2010; 376 (9758): 2075-85. Epub 2010 Dec 9.
5. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2008; 359: 906-17.
6. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood.* 2008; 111: 2516-20,
7. Siegel D, Weber DM, Mitsiades CS, et al. Combined Vorinostat, Lenalidomide and Dexamethasone Therapy in Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma: A Phase I Study Blood American Society of Hematology meeting abstract book (abs #305), 2009.
8. Harrison SJ, Quach H, Yuen K, et al. High Response Rates with the Combination of Bortezomib, Dexamethasone and the Pan-Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin in Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma in a Phase I/II Clinical Trial. *Blood* 2008; 112: 1267-1267.
9. Chauhan D, Singh AV, Aujay M, et al. A novel orally active proteasome inhibitor ONX 0912 trigger in vitro and in vivo cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood.*
10. Chauhan D, Singh AV, Ciccarelli B, et al. Combination of novel proteasome inhibitor NPI-0052 and lenalidomide trigger in vitro and in vivo synergistic cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 115: 834-45.
11. Jakubowiak AJ, Reece DE, Hofmeister CC, et al. Lenalidomide, Bortezomib, Pegylated Liposomal Doxorubicin, and Dexamethasone in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Updated Results of Phase I/II MMRC Trial. *Blood.* 2009; 114: 60-60.
12. Weber D, Badros AZ, Jagannath S, et al. Vorinostat Plus Bortezomib for the Treatment of Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Early Clinical Experience. *Blood.* 2008; 112s: Abstract 871.

13. Richardson P, Weber D, Mitsiades C, et al. A Phase I Study of Vorinostat, Lenalidomide, and Dexamethasone for Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *Haematologica-the Hematology Journal*. 95: 0385.
14. Baughn LB, Di Liberto M, Wu K, et al. A novel orally active small molecule potently induces G1 arrest in primary myeloma cells and prevents tumor growth by specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6. *Cancer Res*. 2006; 66: 7661-7.
15. Broyl A, Hose D, Lokhorst H, et al: Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood* 116: 2543-53.
16. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* 116: e56-65.

Eterogeneità genetica dei tumori e terapie personalizzate

Giorgio Stassi

Oncologia Sperimentale, Fondazione Salvatore Maugeri, Pavia

Recenti dati bibliografici hanno messo in luce le potenzialità terapeutiche delle cellule staminali che rappresentano un argomento di ampio dibattito scientifico. Una sempre maggiore comprensione dei meccanismi biologici che governano le cellule staminali e la conseguente ricerca di cure più selettive a vantaggio dei pazienti rappresenta il futuro della clinica attuale al fine di ottimizzare i trattamenti. Le popolazioni cellulari che costituiscono il tumore sono eterogenee e mostrano una organizzazione gerarchica in cui è possibile riscontrare vari livelli di differenziamento con caratteristiche specifiche sia da un punto di vista morfologico che antigenico.

I diversi gradi di differenziamento potrebbero essere dovuti alla presenza di una popolazione di cellule indifferenziate e con caratteristiche di autorinnovamento e multipotenzialità, note come cellule staminali tumorali (CST) o inizianti il tumore. Si pensa che queste cellule siano il risultato di alterazioni genetiche ed epigenetiche, a carico delle cellule staminali normali o progenitori, in grado di determinare cambiamenti nelle vie di trasduzione del segnale che regolano la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi.

Queste mutazioni verranno ereditate da tutta la progenie staminale, determinando nel tempo la progressione verso la malignità e creando, in definitiva, un pool di cellule staminali che sostengono la formazione della neoplasia. Nonostante lo sviluppo di terapie molecolari mirate, la chemio-radioterapia rimane attualmente il trattamento principale utilizzato contro i tumori. I tumori sono tuttavia capaci di evadere i segnali di morte indotti dai farmaci chemioterapici attraverso lo sviluppo di numerosi meccanismi quali l'aumento di espressione di ATP-binding cassette (ABC) *transporters*, l'attiva capacità di riparazione del DNA e l'over-espressione di molecole anti-apoptotiche.

La resistenza alla morte da parte delle cellule tumorali rappresenta uno dei maggiori ostacoli per una terapia efficace contro il cancro. Molti meccanismi possono contribuire allo sviluppo della resistenza alla terapia, quali la selezione genetica di subcloni resistenti, fattori cellulari intrinseci e microambientali. Nell'ultimo decennio il nostro gruppo di ricerca ha messo in evidenza come i carcinomi esprimono elevati livelli di Interleuchina 4 (IL-4), citochina che up-rego-

la proteine antiapoptotiche. Abbiamo inoltre dimostrato come le CST del colon-retto siano in grado di produrre endocrinamente l'IL-4 e come la neutralizzazione della citochina induca sensibilizzazione verso i convenzionali protocolli terapeutici. Per proteggere i pazienti dalle recidive, gli scienziati hanno focalizzato la loro attenzione sulla messa a punto di trattamenti in grado di colpire selettivamente le CST risparmiando le cellule staminali normali e permettendo l'eradicazione del tumore alla radice prevenendo inoltre la formazione di metastasi. Un'efficace e promettente alternativa è costituita dalla famaco-genomica, che consentirà l'identificazione di proteine-bersaglio sensibili ai farmaci di nuova generazione, in maniera da mettere a punto delle vere e proprie terapie individuali meno tossiche e più tollerabili.

Questi nuovi farmaci andranno ad aggiungersi agli altri strumenti a disposizione degli scienziati e, in associazione agli altri trattamenti medici (chemioterapia convenzionale, radioterapia) saranno in grado di influenzare in maniera positiva le probabilità di guarigione del paziente migliorandone la qualità nonché l'aspettativa di vita.

**CELLULE STAMINALI
MESENCHIMALI (CSM):
PRIME APPLICAZIONI CLINICHE**

MSC and autoimmune diseases

Federica Benvenuto

Dipartimento Neuroscienze, Oftalmologia e Genetica, Centro di Eccellenza per la Ricerca Biomedica (CEBR), Università degli Studi di Genova

Mesenchymal stem cells (MSC) are a rare cell population firstly identified by Friedenstein in the bone marrow and described as adherent fibroblast-like population capable of differentiating into osteogenic precursor cells (Friedenstein AJ, 1976). MSC are of mesodermal origin, differentiate under appropriate stimuli into different cell subtypes such as chondrocytes, adipocytes and osteoblasts (Pittenger MF et al., 1999), maintaining the ability of self-renew. They are found in all connective organs either of adult or fetal origin (Da Silva Meirelles L et al., 2006; Bieback K, et al., 2008; Soncini M et al., 2007). In the bone marrow, MSC belong to the hematopoietic *niche* to support hematopoiesis in synergy with other cell types like osteoblasts, osteocytes, pericytes and endothelial cells (Sacchetti B, et al. 2007). It seems that MSC protect hematopoietic stem cells (HSC) from differentiating signals and support their maintenance and self-renewal properties. Because of their ubiquity (Da Silva Meirelles L et al., 2006), they contribute to create specialized microenvironments in every organs. Bone marrow MSC (BM-MSC) can easily cultured and expanded *in vitro* as adherent cells and have been extensively characterized them both phenotypically and functionally. Furthermore, MSC have an high proliferative potential *in vitro*, giving rise to differentiated progeny. Several studies showed that MSC are able to suppress immune cells effector functions from both adaptive or innate immunity (reviewed in Uccelli A et al., 2008; reviewed in Uccelli et al., 2006). The immunoregulation seems mainly dependent on the release by MSC of soluble factors following a cross-talk between MSC and target cells. This process requires a previous activation by the immune cells through the secretion of pro-inflammatory cytokines like IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β (Groh ME et al., 2005; Le Blanc K et al., Ren G et al., 2008). Then, the soluble factors released by target cells, induce MSC to produce specific immunosuppressive mediators whose characteristics depend on *in vitro* experimental system used (Uccelli A et al., 2008). Between the others, the well known indoleamine 2,3 dioxigenase (IDO), PGE-2, Nitric oxide, soluble HLA-G5 together with other less relevant molecules (Uccelli A et al., 2008; Selmani Z et al., 2009; Krampera M et al.; Meisel R et al., 2004). Of note, inhibiting each mediator results in a partial decrease of the immunosuppressive effect, leading to the conclusion that several independent mechanisms might be involved

in their immunomodulating properties. One of the most relevant mechanisms involved regards the arrest of the cells cycle, which results in the inhibition of cell proliferation (Corcione A et al., 2005; Benvenuto F et al., 2007; Ramasamy R et al., 2007) so called “division arrest energy” (Glennie S et al., 2005). This was first demonstrated in T lymphocytes, in which MSC co-culture downregulate the production of IFN- γ , IL-2 and TNF- α , while on the contrary increase IL-4 production. It has been shown that MSC promote the differentiation of T regulatory cells, both CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ CD4⁺/CD8⁺Fox P3⁺ T REG cells (Selmani Z et al., 2008; Maccario R et al., 2005; Prevosto C et al., 2007). MSC-mediated cell cycle inhibition was observed also in NK cells, in which cytotoxicity and cytokines production were affected (Spaggiari GM et al., 2008). Moreover, it has been studied MSC ability to dampen the generation of mature dendritic cells on which they impair the antigen presenting function to T cells (Nauta AJ et al., 2006). Controversial results were obtained on B cells (Corcione A et al., 2005; Traggiari et al., 2008; Rasmusson I et al., 2007), probably due to different *in vitro* experimental conditions. On this regard, it has been shown that *in vivo* infusion of MSC inhibit pathogenic antibodies production by B cells (Gerdoni E et al., 2007; Rafei M et al., 2008).

More recently, MSC immunogenicity have been investigated and it has been found that MSC can be considered immune privilege cells in an allogeneic settings (Le Blanc K, 2003) because they exert an immune reaction and at the same time, they are not subjected to any immunological reaction. MSC do not express co-stimulatory molecules such as CD80, CD86 and CD40 nor HLA-Class II molecules, while express HLA-Class I at low/medium intensity. Furthermore, MSC express several chemokine receptors necessary to direct their chemokine-mediated migration (Chamberlain G et al., 2007) and several adhesion molecules to roll and adhere to the endothelial cells of the epithelium (Ruster B et al., 2006). It has been demonstrated that MSC secrete metalloproteases for the demolition of basement membrane, fostering the MSC extravasation (Son BR et al., 2006). In literature, are present transplantation studies from last few years on different animal models. In particular, MSC infusion in non human primates showed MSC ability

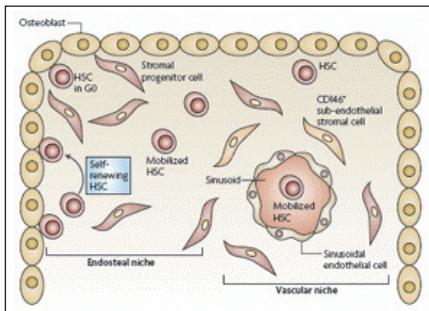


Fig. 1 - Haematopoietic Cells and Mesenchymal Stem Cells (MSC) (Uccelli A, et al. Nat Rev. Immunol 2008).

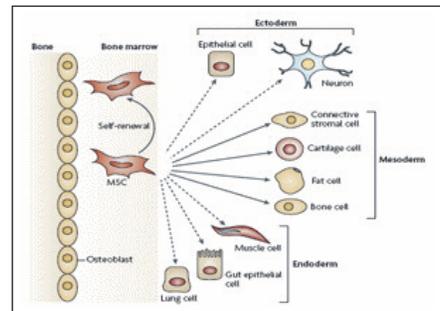


Fig. 2 - Multipotentiality of Mesenchymal Stem Cells (MSC) (Uccelli A, et al. Nat Rev. Immunol 2008).

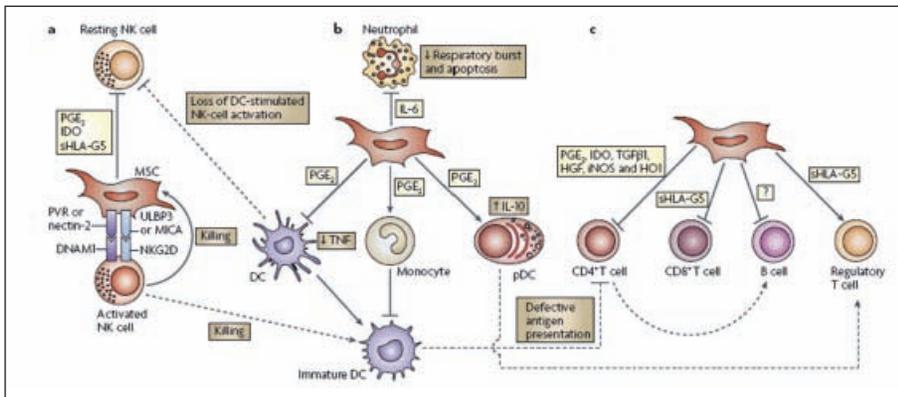


Fig. 3 - The complex interplay between MSC and the immune system (Uccelli A et al. Nat. Rev Immunol 2008).

to migrate to different tissues (Devine SM et al., 2003). An animal model using rats, showed that MSC reach first organs like the lung, and only secondarily other organs such as the liver (Gao J et al., 2001).

MSC homing to the bone marrow is driven by the chemokine receptors CXCR4 expressed on MSC (Wynn RF et al., 2004). In general., thanks to their chemokine repertoire, MSC home preferentially to injured tissues driven by cytokines and growth factors (Ponte AL et al., 2007) secrete either systemic or in local inflammations, including the Central Nervous System. Here, in particular, MSC exert a potent therapeutic effects (Gerdoni E et al., 2008). MSC concentrate mainly in radiation-damaged and ischemic tissues (Mouiseddine M, et al., 2007), an issue which might be of particular interest in view of MSC-mediated therapy for acute inflammatory disease such as ischemia, vasculity or Systemic Sclerosis (SSc). The therapeutic potential of MSC resides also on the ability to release several molecules able to affect the local environment in a paracrine fashion, either directly or indirectly by neighbor cells. It has been supposed a common paracrine mechanism, independent from trans-differentiation, that support MSC plasticity in a wide range of experimental diseases.

The immunomodulatory properties of MSC have been extensively evaluated in diverse clinical studies in the therapy of Graft *versus* Host Disease (GvHD), in humans and in a previous *in vitro* approach in which it has been showed the MSC immunodulating properties on T lymphocytes (Di Nicola M et al., 2002). Le Blanc K and co-workers showed an interesting case report of a patient with a refractory, acute GvHD which recovered and successfully survived for 18 months after MSC infusion (Le Blanc K et al., 2004). Based on this optimistic result, an important clinical trial for the GvHD treatment were encouraged, without any relevant results able to clarify the mechanism involved in MSC effect (Le Blanc K et al., 2008). Although encouraging results on the relevant role exerted by MSC in preventing GvHD, an occurrence of leukemia relapsing diseases have been described, probably due to the reduced Graft versus Leukemia (GvL) upon GvHD inhibition

(Ning H et al., 2008). Nowadays, different preclinical trials utilize MSC to treat immunological disorders, rely on their immunomodulatory and protective properties, and their ability to migrate to the target tissue. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), the murine model of Multiple Sclerosis, has been extensively used to test MSC potential therapeutic ability in several studies. I.v. infusion of MSC, resulted in either clinical and histological improvement of the disease, probably due to the induction of a tolerance response towards the immunizing myelin protein MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) (Zappia E et al., 2005). Such results were confirmed in an second study using human MSC and a PLP (Proteolipid protein) induced model of EAE, where MSC engrafted into CNS without trans-differentiation (Zhang J et al., 2005). Rafei M. and Co-authors, demonstrated that infusion of conditioned-medium ameliorates EAE by a MSC-mediated inhibition of T effector CD4Th17⁺cells (Rafei M et al., 2009). Several studies have shown that MSC may exert an immunomodulating action, but also induce tissue repair through the release of throphic factors, on one hand, and anti-apoptotic factors towards neurons and oligodendrocytes. MSC promote the proliferation and maturation of local neural precursor cells as shown by Munoz JR et al., and Rivera FJ and co-authors. Encouraging results were also obtain in a collagen-induced arthritis, the animal model of human rheumatoid arthritis. There are at least two studies (Augello A et al., 2007; Zheng ZH et al., 2008) in which MSC were able to prevent tissue destruction and suppressed autoimmune response. An inhibition of inflammatory response exerted by adipose tissue- derived MSC has been successfully obtained also in experimental colitis (Gonzalez MA et al., 2009).

Recently, different preclinical studies suggested that MSC may treat refractory luminal Crohn Disease (Duijvestein M et al., 2010), prevent Experimental Enterocolitis chemically-induced in mice (Parekkadan B et al., 2001). The immunomodulatory properties of MSC as well as their tissue-trophic characteristics and low immunogenicity, make these cells interesting candidates for the prevention and the treatment of autoimmune diseases. Currently, just few publications are available on MSC treatment of human autoimmune diseases. In particular, the most part of the data are from GvHD studies, suggesting that the ratio between benefits and risks in humans is acceptable, making even more appealing MSC as promising candidates for autoimmune diseases treatment.

Bibliografia

1. Augello A, Tasso R, Negrini SM, et al. *Arthritis Rheum* 2007; 56 (4): 1175.
2. Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, et al. *Stem Cells*. 2007; 25:1753.
3. Bieback K, Kern S, Kocaomer A, et al. *Biomed Mater Eng*. 2008; 18: S71.
4. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. *Stem Cells*. 2007; Nov 25 (11): 2739.
5. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E et al. *Blood*. 2005; 107: 367.
6. Da Silva Meirelles L, Cagastelles PC, Nardi NB. *J Cell Sci*. 2006; Jun 1; 119: 2204.
7. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, et al. *Blood*. 2003; 101 (8): 2999.

8. Di Nicola M, Carlo Stella C, Magni M. *Blood*. 2002; 99: 3838.
9. Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, et al. *Gut*. 2010; Dec 59 (12): 1662.
10. Friedenstein AJ, DeriglasovaUF, Kulagina NN, et al. *Exp Hematol*. 1974; 2: 83-92.
11. Gao J, Tennis JE, Muzic RF, et al. *Cell Tissues Organs*. 2001;169: 12.
12. Gerdoni E, Gallo B, Casazza S. *Ann Neurol*. 2007; 61 (3): 187.
13. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, et al. *Blood*. 105 (7); 2821.
14. Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, et al. *Gastroenterology* 2009; 136 (3): 978.
15. Groh ME, Maitra B, Szekely E, et al. *Exp Hematol*. 2005; 33: 928.
16. Le Blanc K. *Cytotherapy*. 2003; 5: 485.
17. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. *Scand J Immunol*. 2003; 57: 11.
18. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. *Lancet*. 2004; 363 (9491): 1439.
19. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. *Lancet*. 2008; 371 (9624): 1579.
20. Maccario R, Podestà M, Moretta A. *Haematologica*. 2005; 90: 516.
21. Meisel R, Zibert A, Laryea M, et al. *Blood*. 2004; Jun. 15; 103: 4619.
22. Mousieddine M, Francois S, Semont A, et al. *Br J Radiol*. 2007; 80: S49.
23. Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, Prockop DJ. *PNAS* 2005; 102 (50): 18171.
24. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, et al. *J Immunol*. 2006; 177 (4): 2080.
25. Ning H , Yang F, Jiang M, et al. *Leukemia*. 2008; 22: 593.
26. Parekkedan B, Updhyay R, Dunham J, et al. *Gastroenterology*. 2001; 140 (3): 966.
27. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. *Science*. 1999; 284: 143-147.
28. Ponte AL., Marais E, Gally N, et al. *Stem Cells*. 2007; Jul 25: 1737.
29. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P. *Haematologica*. 2007; Jul; 92 (7): 881.
30. Rafei M, Hsieh J, Fortier S, et al. *Blood*. 2008; 112: 4991.
31. Rafei M, Campeau PM, Aguilar-Mahecha A, et al. *J Immunol*. 2009; 182: 5994.
32. Ramasamy R, Lam EW, Soeiro. *Leucemia*. 2007; 21: 304.
33. Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, et al. *Scand J Immunol*. 2007; 65: 336.
34. Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. *Cell Stem Cell*. 2008; 2: 141.
35. Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistrain R, et al. *Blood*. 2006; 108: 3938.
36. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. *Cell*. 2007; 19, 131: 324.
37. Selmani Z, Naji A, Gaiffe E. *Transplantation*. 2009; 87: S62.
38. Selmani Z, Naji A, Zidi I. *Stem Cells*. 2008; 26 (1): 212.
39. Son BR, Marquez Curtis SA, Kucia M, et al. *Stem Cells*. 2006; 24 (5): 1254.
40. Spaggiari GM , Capobianco A, Becchetti S, et al. *Blood*. 2006; 107 (4): 1484.
41. Spaggiari GM , Capobianco A, Abdelrazik H, et al. *Blood*. 2008; 111: 1327.
42. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, et al. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007; 1 (4): 296.
43. Traggi E, Volpi S, Schena F, et al. *Stem Cells*. 2008; 26: 562.
44. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. *Eur J Immunol*. 2006; 36: 2566.
45. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. *Nat Rev Immunol*. 2008; 889: 726.
46. Wynn RF, Hart CA, Corradi Perini C. *Blood*. 2004; 104: 2643.
47. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. *Blood*. 2005; 106 (5): 1755.
48. Zhang J, LiY, Chen J, et al. *Exp Neurol*. 2005; 195: 16.
49. Zheng ZH, Li XY, Ding J, et al. *Rheumatology*. 2008; 47 (1): 22.

Impiego delle cellule staminali mesenchimali in cardiologia

M. Gneccchi, P. Danieli, E. Cervio, F. Pisano, M.C. Ciuffreda, M. Mura, G. Malpasso

Dipartimento di Cardiologia, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

L'infarto miocardico acuto (IMA) è la principale causa di morte prematura nei paesi occidentalizzati. I pazienti che sopravvivono alla fase acuta vanno incontro ad irreversibile perdita di cellule miocardiche che provoca progressiva riduzione della funzione ventricolare fino a determinare insufficienza cardiaca severa. Lo scompenso si manifesta soprattutto in quei pazienti che non vengono prontamente sottoposti ad una terapia ripercussiva e che vanno quindi incontro a fenomeni di rimodellamento del ventricolo sinistro.

Le terapie oggi disponibili possono solo parzialmente rallentare il rimodellamento ventricolare negativo senza tuttavia evitare la comparsa d'insufficienza cardiaca nei pazienti con un esteso infarto del miocardio. Per tali motivi un numero sempre crescente di pazienti sviluppa una patologia cronica caratterizzata da una scarsa qualità della vita e frequenti ospedalizzazioni. Ad oggi il trapianto di cuore rappresenta l'unica terapia salvavita per la maggior parte di questi malati, anche se il numero limitato di donatori ed altre complicazioni cliniche post-trapianto, quali il rigetto acuto o cronico e gli effetti collaterali della terapia immunosoppressiva, rappresentano dei chiari limiti. Per tutti questi motivi sarebbe estremamente importante scoprire nuove terapie che permettano di prevenire o curare il rimodellamento ventricolare e quindi l'insufficienza cardiaca. Recentemente molti studi preclinici hanno suggerito che l'iniezione intramiocardica di cellule staminali adulte (ASC) autologhe possiede un'enorme potenziale per la cura del danno da infarto del miocardio (1).

In quest'ottica, le cellule staminali mesenchimali (CSM) rappresentano una popolazione di particolare interesse. Sebbene costituiscano solo lo 0.001-0.01% delle cellule nucleate del midollo osseo, le CSM possono essere facilmente isolate ed espanse *ex-vivo* per ottenere numeri clinicamente significativi. Le CSM sono state recentemente isolate anche da molti altri tessuti, tra cui il tessuto adiposo, il sangue cordonale e la placenta (2, 3). Interessante è notare che recenti evidenze suggeriscono che le CSM non sarebbero soggette a rigetto allogenico in modelli umani ed animali in quanto il loro fenotipo sembra essere immunoprivilegiato (4). Inoltre, le CSM sono facilmente modificabili *ex-vivo* mediante l'uso

di vettori virali (5). La caratteristica principale delle CSM è tuttavia rappresentata dalla loro multipotenza. In particolare, le CSM sono in grado di differenziare, sotto specifiche condizioni di coltura, in osteociti, adipociti, condrociti (6, 7) e, come discusso dettagliatamente nel paragrafo successivo, in cardiomiociti.

Proprietà cardiomiogeniche *in vitro*

CSM isolate da midollo osseo (BM-CSM) di topo sono state differenziate in cardiomiociti usando un mezzo di coltura arricchito con l'agente demetilante 5-azacitidina (5-AZA) (8). È stato dimostrato che in queste condizioni di coltura, il 30% delle cellule assume la caratteristica morfologia allungata delle miofibre. Inoltre, le cellule differenziate si fondono in un sincizio simile ad un miotubo ed esprimono marcatori tipici dei cardiomiociti fetali (8). L'isoforma β della catena pesante della miosina (β -MHC) è maggiormente espressa rispetto all'isoforma α ed è stato possibile riscontrare la presenza di fattori di trascrizione della linea miocitaria e cardiaca tra cui GATA-4, Nkx2.5 e HAND1/2 (9). È stato poi dimostrato che i cardiomiociti derivati dalle CSM esprimono recettori α -/ β -adrenergici e muscarinici sulla membrana cellulare (10). Infine, le cellule differenziate si contraggono spontaneamente ed in modo sincrono; in particolare, la frequenza di contrazione aumenta in presenza di isoproterenolo e diminuisce in seguito all'aggiunta di un β bloccante selettivo (10).

Altri ricercatori hanno invece evidenziato che per indurre il differenziamento, le CSM devono essere coltivate in contatto con cardiomiociti maturi. Le CSM sono state co-coltivate con cardiomiociti umani in rapporto 1:1 oppure in presenza di mezzo condizionato ottenuto dai cardiomiociti. Analisi immunocitochimiche hanno rilevato che le CSM, dopo 48 ore di co-coltura, differenziavano in cellule esprimenti miosina sarcomerica, β -MHC, troponina-T cardiaca (cTnT) e troponina-I cardiaca (cTnI). Al contrario, le CSM esposte al mezzo condizionato non esprimevano alcun marcatore cardiomiocitario (11). L'importanza di un contatto cellula-cellula è stata evidenziata anche da uno studio in cui CSM isolate da un topo GFP sono state co-coltivate con cardiomiociti neonatali di ratto (12). Dopo 7 giorni è stato possibile osservare che il 14% delle CSM aveva acquisito un fenotipo cardiaco ed aveva iniziato a contrarsi in sincronia con i cardiomiociti circostanti. Inoltre, mediante una colorazione specifica, è stato possibile evidenziare l'espressione della connessina-43 (Cx43) e la formazione di gap-junction fra i cardiomiociti originati dalle CSM ed i cardiomiociti neonatali. Infine, mediante analisi al microscopio elettronico a trasmissione, venivano identificati elementi tipici di cellule simil-cardiomiocitarie, tra cui sarcomeri, un elevato numero di granuli di glicogeno e numerosi mitocondri. Uno studio parallelo in cui le CSM venivano tenute separate dai cardiomiociti, mediante l'impiego di una membrana semi-permeabile, ha confermato il mancato differenziamento in assenza del contatto cellula-cellula (12).

In sintesi, le evidenze accumulate attraverso gli studi condotti *in vitro* supportano l'ipotesi che l'iniezione intramiocardica di CSM in cuori infartuati potrebbe promuovere la rigenerazione anche *in vivo*.

Terapia con cellule staminali mesenchimali per la riparazione miocardica

La potenzialità cardiomiogenica *in vivo* delle CSM umane è stata per la prima volta dimostrata dagli studi di Pittenger (13). CSM marcate con LacZ sono state iniettate nella cavità ventricolare sinistra di topi immunodeficienti CB17 SCID/beige e la localizzazione e il differenziamento delle CSM iniettate è stata valutata a precisi time-point.

Quattro giorni dopo l'iniezione, la maggior parte delle cellule β -gal⁺ sono state ritrovate all'interno di fegato e polmoni mentre a livello del cuore le cellule β -gal⁺ risultavano sparse nel miocardio. Lo 0,44% delle cellule iniettate sopravviveva all'interno del miocardio a 4 giorni dall'iniezione e tale percentuale si riduceva drasticamente a time point successivi. Quattro giorni dopo l'iniezione, la colorazione specifica per la β -galattosidasi e l'analisi immunohistochimica per specifici marcatori cardiomiocitari evidenziava che le CSM non esprimono alcun marcatore cardiomiocitario. Diversamente, dopo 60 giorni le cellule β -gal⁺ esprimevano positività per i marcatori cardiaci desmina, cTnT, α -actinina e β -MHC, a dimostrazione che col tempo le CSM sopravvissute all'interno del cuore differenziavano in muscolo striato.

Ulteriori evidenze relative alla potenzialità cardiomiogenica delle CSM *in vivo* derivano dai lavori di Prockop et al. (14). In questi studi è stata valutata la capacità d'integrazione e di differenziamento di BM-CSM di ratto trapiantate in embrioni allo stadio di organogenesi.

In breve, CSM di ratto marcate con GFP sono state iniettate in embrioni di pollo e, dopo 4 giorni dall'inoculo, le cellule trapiantate sono state identificate per la loro positività a GFP. I risultati ottenuti hanno dimostrato che nelle fasi successive dello sviluppo embrionale, le CSM erano integrate in numerosi tessuti dell'ospite, in particolare nel cuore.

Le cellule GFP⁺ ritrovate nel cuore esprimevano α -MHC e cardiotina, una proteina presente nel reticolo sarcoplasmatico longitudinale dei cardiomiociti maturi. Per escludere che il differenziamento in cardiomiociti delle CSM fosse in realtà dovuto a fenomeni di fusione cellulare, è stata condotta un'analisi cariotipica sulle cellule GFP⁺: tale indagine evidenziava la presenza di 42 cromosomi del ratto e non dei 120 cromosomi che ci si sarebbe attesi in caso di fusione cellulare (42 cromosomi del ratto più 78 del pollo).

Riassumendo, questo studio ha dimostrato che le CSM sono in grado di migrare all'interno del miocardio sano e ivi differenziare in cellule cardiache. Tuttavia questo evento si verifica con una frequenza molto bassa e il fenotipo di tali cardiomiociti non è completamente maturo.

Altri studi hanno in seguito verificato la capacità differenziativa delle CSM in modelli sperimentali d'infarto del miocardio. In un esperimento condotto da Fukuda e collaboratori singole cellule ematopoietiche Lin-CD34-c-kit⁺Sca1⁺ o cellule del midollo osseo (BMC) di origine murina, entrambe esprimenti GFP, sono state trapiantate in un modello murino singenico irradiato (15). L'IMA è stato indotto mediante legatura della coronaria e le cellule del midollo sono state mobilizzate mediante somministrazione del fattore di stimolazione delle colonie

granulocitarie (G-CSF). Dopo 8 settimane dall'induzione dell'IMA è stato possibile evidenziare la presenza di 5×10^3 cellule GFP⁺/Actina⁺ negli animali trattati con BMC rispetto a sole 3 cellule GFP⁺/Actina⁺ ritrovate negli animali trattati con singole cellule ematopoietiche. Questi dati suggeriscono che la maggior parte delle cellule GFP⁺/Actina⁺ derivano da cellule di midollo non-ematopoietiche e quindi dalla componente mesenchimale.

A conferma di tale ipotesi, il medesimo esperimento è stato ripetuto utilizzando CSM transfettate con un plasmide codificante per la GFP sotto l'azione del promotore per la catena leggera della miosina specifica dei cardiomiociti. Otto settimane dopo l'induzione dell'IMA sono state ritrovate 1034 cellule GFP⁺ all'interno del cuore. Questi risultati dimostrano che le CSM mobilizzate dal BM sono in grado di migrare all'interno del tessuto infartuato e di differenziare in cardiomiociti. Tuttavia, il numero di cardiomiociti derivati dalle CSM è troppo limitato per indurre una consistente rigenerazione cardiaca (15).

Successivamente, altri ricercatori hanno studiato i benefici funzionali indotti dalla somministrazione di CSM iniettate in cuori infartuati. Nagaya e collaboratori hanno dimostrato che nel loro studio le CSM iniettate per via sistemica si localizzavano prevalentemente nell'area ischemica del miocardio e determinavano un miglioramento della funzionalità contrattile e una diminuzione sia del diametro telesistolico che del diametro telediastolico del ventricolo sinistro (16). Altri studi hanno evidenziato che l'iniezione di CSM in seguito ad infarto del miocardio si accompagna a una diminuzione della pressione telediastolica ventricolare sinistra e a un concomitante aumento dell'indice di funzionalità contrattile (dP/dt) e della frazione di eiezione (FE) (17-19).

Le CSM attecchite esprimono diversi marcatori cardiaci e sembrano essere funzionalmente integrate con cardiomiociti nativi, esprimendo le proteine responsabili della connessione cellula-cellula e delle connessioni elettriche Cx43 e N-caderina (19). Tuttavia, l'efficienza di attecchimento delle CSM è limitata e non sono disponibili dati circa il potenziale replicativo delle CSM ritenute a livello del miocardio. Shake e collaboratori hanno rilevato una riduzione del processo di assottigliamento patologico del ventricolo sinistro del cuore infartuato in seguito al trapianto di CSM. Tuttavia, le cellule iniettate mancavano di un completo differenziamento miogenico (18).

Eventi di fusione cellulare possono rappresentare un fattore confondente nello studio delle proprietà rigenerative delle CSM. Utilizzando un sistema di ricombinazione Cre-lox il gruppo di Noiseux ha dimostrato che BM-CSM murine iniettate nel miocardio infartuato possono fondersi con i cardiomiociti residenti, sebbene la frequenza di fusione sia bassa (20, 21). Tuttavia, l'iniezione di CSM nel miocardio infartuato determina considerevoli miglioramenti funzionali tra cui la riduzione dell'area infartuata e dell'area di fibrosi, la riduzione del volume telediastolico e del volume telesistolico ventricolare sinistro e l'aumento dell'FE (20, 21).

In conclusione, le CSM differenziano *in vivo* in cellule simil-cardiomiocitarie. Tuttavia, la bassa efficienza di rigenerazione delle CSM non giustifica gli importanti benefici osservati in termini di funzionalità cardiaca e di rimodellamento ventricolare dopo somministrazione di CSM (22).

Meccanismi di azione di BM-CSM nel riparo cardiaco

Indipendentemente dal meccanismo d'azione, è generalmente riconosciuto che il trapianto di CSM ha effetti benefici sul miocardio ischemico. Originariamente, i principali meccanismi d'azione proposti per spiegare l'azione terapeutica delle BM-CSM sono stati la rigenerazione cardiaca e vascolare (23, 24). Tuttavia, la plasticità delle ASC è stata fortemente messa in discussione e l'entità della rigenerazione cardiaca secondaria alla transdifferenziazione di ASC descritta da alcuni ricercatori, non è stata confermata da altri (25, 26). Come esposto nel paragrafo precedente, il numero di nuovi cardiomiociti generati dalle CSM sembra troppo esiguo per giustificare i significativi miglioramenti funzionali riportati nella maggior parte degli studi sperimentali di trapianto di CSM in cuori infartuati. Inoltre, è stato riportato che le CSM esercitano effetti benefici immediati, entro 72 ore, ed è evidente che il differenziamento in cardiomiociti contrattili non può avvenire in un periodo così breve (27, 28). Similmente, è stato dimostrato che le BM-CSM sono in grado di differenziare in cellule vascolari e, quando iniettate in cuori ischemici, aumentano significativamente la densità vascolare (20, 29). Tuttavia in gran parte degli studi animali, solo un ristretto numero di CSM attecchite esprimono i marcatori delle cellule endoteliali (EC) o delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC), suggerendo che il ruolo diretto delle CSM nella rigenerazione vascolare è limitato.

È stato quindi proposto che le CSM agiscano mediante un terzo meccanismo d'azione, ovvero tramite effetto paracrino (30). Il paragrafo successivo, riporta numerose evidenze raccolte a supporto dell'ipotesi che meccanismi paracrini mediati da fattori rilasciati dalle CSM giochino un ruolo cruciale nei processi di riparazione cardiaca.

Effetti paracrini

Numerosi studi hanno dimostrato che le CSM producono citochine, chemochine e fattori di crescita solubili potenzialmente coinvolti nel meccanismo di riparazione cardiaca (31). In seguito ad iniezione di CSM in corrispondenza del tessuto cardiaco ischemico si rileva un aumento significativo della concentrazione di fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), del fattore di crescita epatico (HGF), del fattore di crescita fibroblastico (bFGF), del fattore di crescita insulinico (IGF-1) e di adrenomedullina (ADM) (16, 32). Tuttavia, le prove più convincenti in favore di un meccanismo paracrino di riparazione cardiaca derivano da studi sperimentali che dimostrano che la somministrazione del mezzo condizionato (CM) ottenuto dalle CSM è in grado di mediare gli stessi effetti benefici che si osservano dopo terapia cellulare. I fattori paracrini possono influenzare positivamente diversi aspetti della funzionalità cardiaca promuovendo la protezione del miocardio, la neovascolarizzazione e la rigenerazione cardiaca endogena. Inoltre, tali fattori solubili sono in grado di modulare positivamente i processi infiammatori e fibrotici post-infartuali, la contrattilità ed il metabolismo cardiaco.

Protezione del miocardio

In presenza di ischemia, le CSM rilasciano immediatamente molecole citoprotettive in grado di aumentare la sopravvivenza dei cardiomiociti. Il gruppo di Victor Dzau ha per primo dimostrato che il CM ottenuto da CSM (CSM-CM) sottoposte a ipossia riduceva l'apoptosi e la necrosi di cardiomiociti di ratto esposti ad una bassa tensione di ossigeno (28). Inoltre, tali proprietà cardioprotettive risultavano essere aumentate in CSM sovraesprimenti il gene anti-apoptotico Akt-1 (Akt-CSM). L'efficacia dei rispettivi CM ottenuti da Akt-CSM (Akt-CSM-CM) e da CSM di controllo è stata testata *in vivo* su un modello sperimentale murino in cui, 30 minuti dopo l'occlusione permanente dell'arteria coronaria, il CM veniva iniettato all'interno dell'area infartuata. Dopo 72 ore dall'inoculo, i ratti trattati con Akt-CSM-CM mostravano, rispetto ai controlli, una significativa riduzione del numero di cardiomiociti apoptotici e delle dimensioni dell'area infartuata. L'effetto citoprotettivo esercitato da CSM-CM è risultato essere meno pronunciato.

Gli studi condotti nel modello murino sono stati successivamente riprodotti in animali di grossa taglia. In particolare, nel maiale, l'iniezione di Akt-CSM determina una riduzione dell'area infartuata e la conservazione della funzionalità cardiaca (33). In seguito, numerosi altri studi hanno confermato che le BM-CSM esercitano effetti paracrini citoprotettivi su cardiomiociti ischemici. Numerosi sono i fattori citoprotettivi secreti dalle CSM; tra i più interessanti segnaliamo la proteina secreta correlata ai recettori frizzled 2 (SFRP2) (36).

Neovascolarizzazione

La somministrazione di cellule staminali in cuori infartuati induce neovascolarizzazione e migliora la circolazione sanguigna tissutale. Tuttavia, come nel caso della rigenerazione miocardica, nonostante ci siano prove che le BM-CSM vengano incorporate nelle strutture vascolari, il numero di nuovi vasi derivato da cellule trapiantate risulta essere molto basso (25, 26). È stato quindi proposto che anche l'angiogenesi e l'arteriogenesi vengano stimolate principalmente attraverso meccanismi paracrini. Fattori solubili quali VEGF, bFGF, HGF ed angiopoietina favoriscono la neovascolarizzazione ed è stato provato che le BM-CSM esprimono numerosi di questi fattori pro-angiogenici e pro-arteriogenici (28, 37, 38). Epstein e collaboratori hanno dimostrato che la presenza di CSM aumenta la perfusione collaterale attraverso un meccanismo paracrino (31). In questo studio, nelle 24 ore successive alla legatura dell'arteria femorale di topo, 1×10^6 CSM sono state iniettate nel muscolo adduttore. Rispetto ai controlli, in cui sono state iniettate EC mature o CM ottenuto da EC, l'iniezione di CSM promuoveva la riperfusione dell'arto attraverso un aumento del numero e delle dimensioni dei vasi. Inoltre, i livelli proteici di VEGF e bFGF erano significativamente aumentati nei muscoli degli animali trattati rispetto ai controlli. Tuttavia, le CSM non s'integravano nei vasi collaterali maturi ma si disperdevano fra le fibre muscolari a conferma che le CSM contribuiscono al rimodellamento collaterale attraverso meccanismi paracrini piuttosto che direttamente rigenerando i vasi. Lo stesso gruppo ha dimostrato sia a livello di espressione genica che proteica, che le CSM

esprimono un'ampia gamma di citochine arteriogeniche e che molte di queste sono sovraespresse dopo esposizione a ipossia (31, 37, 39).

Inoltre, è stato dimostrato che il CSM-CM, *in vitro*, promuove la proliferazione e la migrazione delle EC e delle VSMC in maniera dose dipendente ed *in vivo*, in modelli di ischemia degli arti inferiori, determina il ripristino del flusso ematico attraverso il rimodellamento collaterale. Altri studi condotti per valutare gli effetti proangiogenici delle CSM hanno dimostrato che, in modelli sperimentali d'infarto, l'iniezione di CSM ed EC, aumenta la densità capillare negli animali trattati, nonostante il numero di EC presenti sia molto basso (16, 20, 29). In sintesi, anche in questo caso si può concludere che le CSM inducono neovascolarizzazione mediante effetti paracrini pro-angiogenici e pro-arteriogenici.

Rimodellamento cardiaco

I fattori paracrini rilasciati dalle cellule staminali trapiantate sono in grado di modulare la deposizione di matrice extracellulare, influenzando favorevolmente il rimodellamento post-infartuale. È stato dimostrato che le CSM esprimono numerose molecole coinvolte nella biogenesi della matrice extracellulare tra cui collagenasi, metallo proteinasi (MMP), serine proteinasi e inibitori delle serine proteinasi, suggerendo che le CSM iniettate nell'area infartuale possano inibire la fibrosi attraverso meccanismi paracrini.

Xu e collaboratori hanno studiato l'effetto del trapianto di CSM sull'organizzazione della matrice extracellulare. Questo studio ha dimostrato che il trapianto di CSM attenua significativamente l'espressione cardiaca del collagene di tipo I e III, dell'inibitore tissutale delle metalloproteinasi (TIMP)-1 e di fattore di crescita tumorale (TGF β) (12). Inoltre, è stato dimostrato che il CSM-CM determina una significativa riduzione della proliferazione dei miofibroblasti cardiaci ed inibisce l'espressione di collagene di tipo I e III, supportando l'ipotesi che le CSM esercitano effetti paracrini antifibrotici (38). Infine, ulteriori studi hanno dimostrato che l'iniezione di CSM umane in cuori ischemici di ratto riduce la fibrosi, l'apoptosi e la dilatazione del ventricolo sinistro e parallelamente aumenta lo spessore del miocardio; tali effetti prevengono la disfunzione cardiaca sistolica e diastolica in assenza di rigenerazione cardiaca (40).

Rigenerazione cardiaca

Recenti evidenze suggeriscono che i meccanismi paracrini mediati dalle ASC favoriscono la rigenerazione endogena del miocardio mobilizzando e attivando le cellule staminali cardiache residenti (CSC). In particolare, i fattori rilasciati dalle ASC potrebbero influenzare positivamente proliferazione, mobilitazione, sopravvivenza e funzionalità di progenitori cardiaci endogeni e ripristinare le nicchie di cellule staminali. Tuttavia non sono ancora stati riportati studi in grado di provare inequivocabilmente l'effetto paracrino che le ASC trapiantate possono esercitare sui progenitori cardiaci. Poiché è stato dimostrato che l'iniezione intramiocardica di HGF ed IGF-1 induce differenziamento, proliferazione e migrazione delle CSC (41) ed è noto che le CSM, soprattutto in condizioni di ipossia, rilasciano sia HGF che IGF-1, è possibile ipotizzare che l'iniezione di queste cel-

lule nel miocardio ischemico attivi le CSC residenti. In supporto di questa ipotesi, in uno studio di Amado e colleghi, le CSM sono state iniettate in un modello di infarto miocardico nel maiale (17). L'analisi immunocistochimica ha evidenziato, a 10 giorni dall'iniezione, la presenza di cardiomiociti di nuova formazione, alcuni dei quali erano positivi per il marcatore c-kit, tipicamente espresso dalle CSC, mentre altri risultavano positivi per il marcatore di proliferazione cellulare Ki67. Nonostante manchi, in assenza di una doppia marcatura, uno studio sull'esatta origine di questi nuovi cardiomiociti, tali risultati suggeriscono la presenza di fenomeni di rigenerazione cardiaca endogena. Un recente studio condotto dal gruppo di Hare ha dimostrato che in seguito a somministrazione di CSM in un modello di IMA nel maiale il numero di CSC c-kit⁺, CSC c-kit⁺GATA-4⁺ e di miociti mitotici era rispettivamente 20, 6 e 4 volte superiore rispetto ai controlli non trattati. Inoltre, esperimenti condotti *in vitro* hanno evidenziato che le CSM stimolavano le CSC c-kit⁺ a proliferare in una popolazione di cardiomioblasti adulti esprimenti Nkx2-5 e troponina I (42).

Contrattilità cardiaca

L'iniezione di ASC può influenzare positivamente anche la contrattilità cardiaca. Studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che, in presenza di CM, ottenuto da Akt-CSM sottoposte ad ipossia, cardiomiociti adulti di ratto (ARVC) mostravano un aumento della loro spontanea attività contrattile (28). L'attività contrattile osservata risultava molto più vigorosa e sincronizzata rispetto a quella osservata nelle ARVC mantenute in condizioni di crescita standard, suggerendo che il CM potesse contenere fattori capaci di influenzare le proprietà contrattili delle ARVC. Altri esperimenti, condotti su ARVC in presenza di un terreno di crescita standard o in presenza di diverse concentrazioni di CSM-CM o Akt-CSM-CM, hanno confermato che le CSM sono in grado di rilasciare fattori inotropi che modulano positivamente la contrattilità cardiaca. Altre evidenze suggeriscono che gli effetti paracrini potrebbero modulare l'espressione di recettori adrenergici (43). Tuttavia, ad oggi non sono stati ancora condotti studi sulle vie e sui mediatori coinvolti nell'effetto paracrino sulla contrattilità cardiaca e la natura e l'identità dei fattori coinvolti può solo essere ipotizzata.

Metabolismo cardiaco

Altri studi hanno dimostrato che la somministrazione di cellule isolate da BM influenza positivamente il metabolismo cardiaco di cuori ischemici. In particolare, il trattamento del miocardio infartuato con CSM potrebbe influenzare positivamente le vie metaboliche coinvolte nel processo di adattamento e nel meccanismo di riparazione cardiaca all'interno dei cardiomiociti sopravvissuti. Uno studio di Feygin e collaboratori ha dimostrato che le zone limitrofe all'area ischemica di cuori infartuati di maiale presentano significative alterazioni metaboliche e che l'iniezione di CSM attenua significativamente questo rimodellamento metabolico (44). In particolare, l'iniezione di CSM in cuori di maiali sottoposti ad IMA determina un miglioramento del 30% del rapporto fosfocreatina/ATP (PCr/ATP). L'aumento o la conservazione di questo rapporto nel miocardio post-

infarto è importante poiché indica che il bilancio fra il costo energetico della contrazione e la presenza di ATP è vicino ai valori di normalità.

Un altro recente studio ha dimostrato che l'iniezione di Akt-CSM nell'area perinfartuale determina un miglioramento del metabolismo cardiaco rispetto all'iniezione di CSM native e limita significativamente il danno cardiaco. La concentrazione di PCr era diminuita nei ratti trattati con CSM mentre era aumentata nei ratti trattati con Akt-CSM, ad indicare una maggiore sopravvivenza del tessuto miocardico. Le Akt-CSM sono quindi in grado di prevenire il rimodellamento metabolico che si sviluppa in seguito ad infarto del miocardio (45).

Sfide future per ottimizzare l'uso delle CSM in cardiologia

Sebbene i dati sperimentali finora raccolti supportino l'ipotesi che la terapia con CSM possa rappresentare un innovativo e potente approccio per sviluppare nuove terapie cellulari per la riparazione del miocardio ischemico, il loro utilizzo nella pratica clinica è ancora ostacolato da diversi limiti biologici e tecnologici (Tabella 1).

Tra i vari aspetti irrisolti, il nostro Laboratorio ha deciso di focalizzarsi sulla bassa efficienza di differenziamento delle CSM in cardiomiociti e l'identificazione dei mediatori secreti dalle CSM reponsabili degli effetti paracrini cardioprotettivi. Un primo filone di ricerca è quindi finalizzato a promuovere le proprietà rigenerative delle CSM potenziandone il differenziamento in cardiomiociti mediante l'utilizzo di vettori virali che esprimano fattori solubili coinvolti nei processi differenziali cardiomiocitari. Come strategia alternativa sovraesprimiamo o inibiamo specifici microRNA (miRNA) coinvolti nei processi di sviluppo dei precursori cardiaci. Inoltre, in un'ottica di una traslazione alla pratica clinica, andremo anche a valutare il potenziale rigenerativo di cardiomiociti derivati dalle CSM non solo *in vitro* ma anche in un modello murino d'infarto miocardico.

Tab. 1 - Aspetti da esplorare al fine di ottimizzare la terapia con CSM.

-
- Identificazione di metodi per aumentare il differenziamento delle CSM in cardiomiociti
 - Identificazione dei mediatori degli effetti paracrini
 - Scelta della popolazione di CSM più appropriata
 - Standardizzazione dei metodi di preparazione delle CSM
 - Standardizzazione della nomenclatura delle CSM
 - Selezione dei pazienti da sottoporre alla terapia con CSM
 - Miglior "tempistica" di iniezione di CSM dopo IMA
 - Modalità di somministrazione di CSM più appropriata
 - Numero di CSM da somministrare
 - Strategie per aumentare la sopravvivenza delle CSM
 - Tracciabilità delle CSM trapiantate con metodiche di marcatura in vivo
 - Destino a lungo termine delle CSM trapiantate
 - Potenziale proliferativo delle CSM trapiantate
 - Parametri di valutazione dell'efficacia clinica
 - Variazione delle proprietà funzionali delle CSM in pazienti anziani o affetti da malattie cardiovascolari
 - Sicurezza clinica a lungo termine
-

Per identificare la natura e la funzione dei fattori solubili responsabili degli effetti benefici esercitati dalle CSM sul miocardio ischemico stiamo utilizzando un approccio combinato di analisi trascrittomiche e proteomiche. La caratterizzazione completa dei mediatori della cardioprotezione potrebbe evitare il trapianto cellulare in favore della somministrazione del fattore o, più plausibilmente, del “cocktail” di fattori paracrini responsabili della riparazione cardiaca. Questa strategia, rispetto alla terapia cellulare, risulterebbe tecnicamente più semplice e più facilmente trasferibile al letto del paziente. L’obiettivo a lungo termine che intendiamo perseguire con questi studi è quello di sviluppare strategie efficaci che ottimizzino il potenziale terapeutico delle CSM per poter riparare il danno tissutale da infarto del miocardio.

Bibliografia

1. Gneccchi M. Adult stem cell-based therapy for the heart. In: Heart Development and Regeneration: Edited by Rosenthal and Harvey-Elsevier; 2010.
2. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007; 100: 1249-60.
3. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med.* 2004; 200: 123-35.
4. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond).* 2005; 2: 8.
5. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 1999; 103: 1231-6.
6. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res.* 2004; 95: 9-20.
7. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002; 418: 41-9.
8. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999; 103: 697-705.
9. Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs.* 2001; 25: 187-93.
10. Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, Suzuki Y, Umezawa A, Ogawa S. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation.* 2002; 105: 380-6.

11. Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, Kresh JY. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 126: 124-32.
12. Xu M, Wani M, Dai YS, Wang J, Yan M, Ayub A, Ashraf M. Differentiation of bone marrow stromal cells into the cardiac phenotype requires intercellular communication with myocytes. *Circulation.* 2004; 110: 2658-65.
13. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002; 105: 93-8.
14. Pochampally RR, Neville BT, Schwarz EJ, Li MM, Prockop DJ. Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 9282-5.
15. Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Tsuboi K, Itabashi Y, Ikeda Y, Ogawa S, Okano H, Hotta T, Ando K, Fukuda K. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood.* 2004; 104: 3581-7.
16. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2005; 112: 1128-35.
17. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 11474-9.
18. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* 2002; 73: 1919-25; discussion 1926.
19. Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RC. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001; 122: 699-705.
20. Jiang S, Haider H, Idris NM, Salim A, Ashraf M. Supportive interaction between cell survival signaling and angiocompetent factors enhances donor cell survival and promotes angiomyogenesis for cardiac repair. *Circ Res.* 2006; 99: 776-84.
21. Noiseux N, Gneocchi M, Lopez-Ilasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, Dzau VJ, Pratt RE. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther.* 2006; 14: 840-50.
22. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008; 103: 1204-19.
23. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001; 410: 701-5.

24. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997; 275: 964-7.
25. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004; 428: 668-73.
26. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004; 428: 664-8.
27. Gneocchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 2005; 11: 367-8.
28. Gneocchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J*. 2006; 20: 661-9.
29. Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumiati LC, Allidina Y, Liu P, Li RK. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002; 123: 1132-40.
30. Mirotsov M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J, Gneocchi M, Dzau VJ. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 50: 280-9.
31. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004; 109: 1543-9.
32. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T, Losordo DW. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2005; 115: 326-38.
33. Lim SY, Kim YS, Ahn Y, Jeong MH, Hong MH, Joo SY, Nam KI, Cho JG, Kang PM, Park JC. The effects of mesenchymal stem cells transduced with Akt in a porcine myocardial infarction model. *Cardiovasc Res*. 2006;70:530-42.
34. Takahashi M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H886-93.
35. Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res*. 2006;98:1414-21.
36. Mirotsov M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gneocchi M, Noiseux N, Mu H,

- Pachori A, Dzau V. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 1643-8.
37. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004; 94: 678-85.
38. Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Lett*. 2007; 581: 3961-6.
39. Dzau VJ, Gneocchi M, Pachori AS, Morello F, Melo LG. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *Hypertension*. 2005; 46: 7-18.
40. Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, Pirolli TJ, Bish LT, Jayasankar V, Morine KJ, Gardner TJ, Discher DE, Sweeney HL. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290: H2196-203.
41. Linke A, Muller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, Castaldo C, Cascapera S, Bohm M, Quaini F, Urbanek K, Leri A, Hintze TH, Kajstura J, Anversa P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 8966-71.
42. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, Mazhari R, Boyle AJ, Zambrano JP, Rodriguez JE, Dulce R, Pattany PM, Valdes D, Revilla C, Heldman AW, McNiece I, Hare JM. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*, 107: 913-22.
43. Dhein S, Garbade J, Rouabah D, Abraham G, Ungemach FR, Schneider K, Ullmann C, Aupperle H, Gummert JF, Mohr FW. Effects of autologous bone marrow stem cell transplantation on beta-adrenoceptor density and electrical activation pattern in a rabbit model of non-ischemic heart failure. *J Cardiothorac Surg*. 2006; 1: 17.
44. Feygin J, Mansoor A, Eckman P, Swingen C, Zhang J. Functional and bioenergetic modulations in the infarct border zone following autologous mesenchymal stem cell transplantation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293: H1772-80.
45. Gneocchi M, He H, Melo LG, Noiseaux N, Morello F, de Boer RA, Zhang L, Pratt RE, Dzau VJ, Ingwall JS. Early beneficial effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing Akt on cardiac metabolism after myocardial infarction. *Stem Cells*. 2009; 27: 971-9.

Impiego delle cellule staminali mesenchimali nelle malattie renali

Marina Morigi

Laboratorio di Biologia Cellulare e Xenotrapianto, Dipartimento di Medicina Molecolare, Istituto Mario Negri, Bergamo

La capacità del rene di rigenerare formando nuovi nefroni è una caratteristica che evolutivamente si è persa nei mammiferi superiori ma si è mantenuta in altre specie quali i pesci elasmobranchi e teleostei. Nell'uomo, il rene è sempre stato considerato un organo terminalmente differenziato con basso potenziale proliferativo. Tuttavia, studi nei roditori suggeriscono che in seguito ad un danno renale acuto di varia natura, alcune popolazioni cellulari presenti nel rene, ma anche di origine extrarenale, sono in grado di attivare processi molecolari e cellulari di rigenerazione (1). In questo ambito, la nostra attività di ricerca si è sviluppata a vari livelli studiando la rigenerazione renale in modelli di danno renale acuto e cronico utilizzando cellule staminali adulte di diversa origine (2-4).

Abbiamo precedentemente documentato che la terapia con cellule staminali mesenchimali (CSM) umane isolate da midollo osseo (MO) riduceva significativamente il danno renale tubulare, prolungando la sopravvivenza degli animali NOD SCID con insufficienza renale acuta (IRA) indotta da un farmaco antitumorale, il cisplatino (3). Tali cellule erano in grado di migrare nel tessuto renale danneggiato e qui agivano producendo e rilasciando localmente fattori con attività anti-apoptotica e mitogenica (3).

In alternativa al midollo osseo, abbiamo testato le cellule CSM ottenute da tessuto adiposo, una fonte di più facile accesso per l'isolamento delle cellule staminali. I nostri dati non hanno mostrato alcun effetto reno-protettivo quando tali cellule erano iniettate in animali con IRA. Alla ricerca della migliore e più efficace sorgente di cellule staminali, abbiamo testato cellule di origine extraembrionale ottenute da sangue di cordone ombelicale (CO) o dal liquido amniotico (LA). Abbiamo osservato in topi immunodeficienti con IRA che il trattamento con CO-CSM migliorava significativamente la funzione renale e il danno tubulare (Tab. 1 e Fig. 1), prolungando la sopravvivenza degli animali (4) in maniera più marcata rispetto alle cellule del midollo osseo.

Le cellule identificate nel rene di topi iniettati con cisplatino si localizzavano prevalentemente a livello dello spazio extra-tubulare escludendo una loro differenziazione in cellule tubulari. Localmente le CO-CSM esercitavano un'azione anti-ossidante e un marcato effetto anti-apoptotico sulle cellule tubulari. La rigenera-

Tab. 1 - Effetto delle cellule staminali di diversa origine, come terapia cellulare in topi immunodeficienti con IRA da cisplatino.

Fonte delle cellule staminali	Funzione renale (BUN mg/dl)	Istologia renale	Sopravvivenza (7 giorni)	Migrazione nel rene (n° cellule staminali/105 cellule renali)
-	>140	Danneggiata	0%	-
Midollo osseo	63±5	Preservata	50%	3.4±0.7
Tessuto adiposo	125±17	Danneggiata	0%	-
Cordone ombelicale	58±7	Preservata	86%	2.1±0.4
Liquido amniotico	81±3	Preservata	56%	0.9±0.3

Topi con IRA ricevono, un giorno dopo il cisplatino, l'iniezione di cellule staminali di diversa origine (5×10^5 cellule), marcate con il PKH26, un colorante fluorescente di membrana. I dati sono indicati come media±SE.

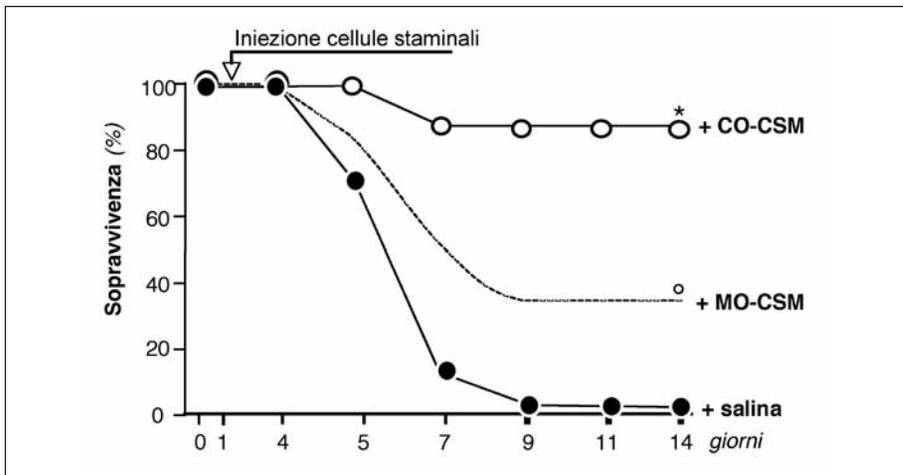


Fig. 1 - Sopravvivenza di topi con IRA non trattati (salina) o infusi con CO-CSM e MO-CSM un giorno dopo l'iniezione con cisplatino. A 9 giorni tutti i topi che ricevevano la salina morivano, mentre l'86% dei topi trattati con CO-CSM e il 36% di quelli trattati con MO-CSM sopravvivevano. * $p < 0.001$ e $^{\circ}p < 0.05$ vs salina.

zione del tessuto renale danneggiato da parte delle cellule staminali passava attraverso un meccanismo paracrino legato alla produzione di FGF, VEGF, HB-EGF e particolarmente HGF e alla stimolazione della proliferazione e fosforilazione di Akt a livello dei tubuli prossimali.

La recente scoperta di una popolazione di cellule staminali umane presenti nel liquido amniotico (LA), molto plastiche, con una elevata capacità di crescita e stabilità genica ci ha fortemente stimolati a studiarle nel modello di insufficienza renale da cisplatino. Queste cellule, isolate per la loro positività al cKit, mantengono in coltura un fenotipo intermedio tra cellule staminali adulte ed embrionali: infatti esprimono marker tipici dalle cellule embrionali come Oct-4 ed SSEA-4 e proteine specifiche per le CSM come CD90, CD105, CD73 e CD44. Iniettate negli animali con IRA, queste cellule esercitavano un effetto reno-protettivo

molto simile alle cellule del midollo osseo anche se la loro migrazione nel tessuto danneggiato era più limitata (6) (Tab.1).

Per aumentare la loro efficacia, le cellule staminali da LA sono state pretrattate con il GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), un fattore di crescita descritto aumentare la motilità e sopravvivenza delle cellule staminali mesenchimali in risposta ad uno stress ossidativo (5). Il preconditionamento delle cellule staminali da LA con il GDNF, prima dell'iniezione in topi con IRA, aumentava marcatamente la loro capacità di raggiungere il tessuto renale danneggiato e di rimanere più a lungo, migliorando ulteriormente la funzione e la struttura renale rispetto alle cellule staminali non trattate. Studi in vitro hanno evidenziato che il GDNF stimolava l'espressione sulla superficie di queste cellule, dei recettori adesivi responsabili della motilità cellulare aumentava la sopravvivenza delle cellule allo stress ossidativo e induceva una maggior produzione di IL-6, VEGF e SDF-1. Complessivamente questi risultati suggeriscono che le cellule staminali ottenute dal cordone ombelicale e dal liquido amniotico potrebbero rappresentare una nuova promettente terapia cellulare per la cura dell'insufficienza renale acuta.

Bibliografia

1. Benigni A, Morigi M, Remuzzi G. Kidney regeneration. *Lancet* 2010; 375: 1310-1317.
2. Imberti B, Morigi M, Tomasoni S, Rota C, et al. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2921-2928.
3. Morigi M, Introna M, Imberti B, Corna D, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells* 2008; 26: 2075-2082.
4. Morigi M, Rota C, Montemurro T, Montelatici E, et al. Life-sparing effect of human cord blood-mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury. *Stem Cells* 2010, 28: 513-522.
5. Shi H, Patschan D, Dietz GP, Bahr M, et al. Glial cell line-derived neurotrophic growth factor increases motility and survival of cultured mesenchymal stem cells and ameliorates acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: F229-235.
6. Morigi M, Rota C, Imberti B, et al. Human Amniotic Fluid Stem Cells Accelerate Recovery of Acute Kidney Injury and Prolong Survival in Mice. Abstract [TH-PO939] American Society of Nephrology 2009.

Trials clinici con l'uso di CSM

Paolo Bernasconi

Laboratorio di Citogenetica e Biologia Molecolare Ematologica, Divisione di Ematologia,
IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Il midollo osseo adulto contiene non solo cellule staminali ematopoietiche (CSE), macrofagi, eritrociti, fibroblasti, adipociti, cellule endoteliali ma anche progenitori multipotenti non ematopoietici ad aspetto fibroblastico (Deans et al., 2000). Queste cellule, chiamate cellule stromali mesenchimali (CSM) multipotenti, hanno la capacità di differenziarsi *in vitro* lungo la linea mesenchimale, danno origine a tessuto osseo, cartilagineo, adiposo e stroma midollare, presentano un'intensa attività paracrina potendo secernere diverse molecole bioattive che svolgono un'azione trofica ed immunomodulatoria. Le CSM dopo infusione endovenosa vanno a colonizzare aree di tessuto sede di intensa infiammazione. Proprio per la loro potenziale capacità rigenerativa nei confronti di vari tipi di tessuto e per la loro azione immunomodulatoria le CSM hanno recentemente suscitato un enorme interesse clinico. Infatti, esse possono essere impiegate per stabilizzare e ripristinare la funzionalità di molti organi come il cuore, il tratto gastroenterico, il sistema nervoso e nel trapianto allogenico di CSE per migliorare la ricostituzione ematopoietica e per prevenire e controllare la malattia da trapianto verso l'ospite (GvHD). Già in passato vari trials clinici avevano valutato la sicurezza e le possibili applicazioni cliniche delle CSM specie nei pazienti con GvHD, ischemia miocardica e stroke. Attualmente, circa un'ottantina di trials clinici, alcuni in corso altri già terminati, impiegano CSM per il trattamento di malattie renali e cardiovascolari, dell'osteogenesi imperfecta, della sclerosi laterale amiotrofica, della sindrome di Hurler, della leucodistrofia metacromatica, del morbo di Crohn e nel trapianto di CSE allogeniche. Ancor più recentemente è stato fondato il gruppo di studio MISOT ("Mesenchymal Stem Cells In Solid Organ Transplantation") che ha definito le linee guida per l'impiego delle MSC nel settino del trapianto di organo solido allo scopo di indurre uno stato di tolleranza immunologica o almeno di consentire una riduzione dell'immunosoppressione (Dahlke et al., 2009).

Premesse biologiche

Definizione

La "International Society for Cellular Therapy" (Horwitz et al, 2005; Dominici et al., 2007) ha stabilito che le CSM costituiscono una popolazione cellulare etero-

genea, aderente alla plastica, costituita da elementi ad aspetto fibroblastico che formano solo poche colonie e sono dotati di particolari caratteristiche fenotipiche e funzionali. Secondo questa definizione la CSM deve esprimere sulla propria superficie il CD44, il CD49b, il CD90, le molecole di classe I del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC), il CD73 ed il CD105; non deve invece esprimere il CD45 e la maggior parte dei marcatori che indicano una maturazione leucocitaria. Sul piano funzionale la CSM deve essere potenzialmente in grado di differenziarsi in senso adipogenico, condrogenico ed osteogenico e deve essere capace di inibire *in vitro* la proliferazione di linfociti attivati da allo-antigeni o da mitogeni. È stato inoltre stabilito che debbano essere indicate tutte quelle variabili che influiscono sulla capacità funzionale della CSM. Pertanto, devono essere conosciuti il tessuto di origine ed il suo mezzo di coltura della CSM, la densità cellulare al momento dell'espansione *in vitro*, il numero di passaggi eseguiti, la tensione di ossigeno utilizzata e la percentuale di contaminazione da parte di cellule mieloidi.

Sorgenti

Le CSM risiedono in nicchie specializzate presenti in vari tessuti. Esse possono essere isolate dal midollo osseo, dal sangue periferico, dal tessuto adiposo, dal cuoio capelluto, dal derma, dal sangue e dallo stroma del cordone ombelicale (gelatina di Warthon), dalla polpa dentaria, dalla placenta e da tutta una serie di tessuti fetali (Salem et al., 2010). Cellule dotate di questa potenzialità erano già state identificate negli anni 60 da Friedenstein et al. (1968). Infatti, egli aveva osservato che cellule ad aspetto fibroblastico potevano essere facilmente isolate da midollo osseo grazie alla loro capacità di aderire alla plastica, e potevano generare *in vitro* una popolazione di precursori cellulari stromali multipotenti ad aspetto fusiforme dotati di clonogenicità. Tali cellule, chiamate "Colony-Forming Unit Fibroblasts" (CFU-F), erano capaci sia *in vitro* che *in vivo* di differenziarsi in adipociti, condrociti, osteociti, mioblasti, cardiomiociti, neuroni ed astrociti (Pittenger et al., 1999).

Nel midollo osseo adulto le CSM costituiscono lo 0.01-0.001% di tutte le cellule nucleate, ma il loro numero si riduce con l'età: il neonato possiede 1 CSM/10.000 cellule midollari mentre l'adulto 1 CSM/250.000 cellule nucleate midollari. CSM sono presenti anche nel sangue cordonale ma non sempre vengono isolate con successo ed il loro numero varia in rapporto all'epoca della gravidanza. Infatti, il sangue fetale del primo trimestre contiene più CSM del sangue fetale del secondo e terzo trimestre (Campagnoli et al., 2001). Le variabili che incidono significativamente sulla resa in CSM delle colture *in vitro* di sangue cordonale sono l'intervallo di tempo tra raccolta e processazione dei campioni di sangue cordonale, il volume dei campioni e la concentrazione di cellule mononucleate. In ogni caso la resa dei campioni di sangue cordonale non è mai superiore al 60% (Bieback et al., 2004). Un recente studio ha confrontato la resa in CSM di dieci campioni di tessuto cordonale e di dieci campioni di sangue cordonale ottenuti da dieci donatrici diverse (ciascuna di esse aveva fornito un campione di tessuto cordonale ed un campione di sangue cordonale) e trattati secondo uno stesso protocollo.

Questo studio ha dimostrato che il tessuto cordonale ha una resa in CSM superiore a quella del sangue cordonale (Secco et al., 2008).

Azione immunomodulante

Molti studi hanno dimostrato che CSM isolate da vari tessuti possiedono grossolanamente la stessa capacità immunomodulatoria e rigenerativa delle CSM midollari. Siccome però queste sono state quelle meglio caratterizzate e per prime utilizzate nella pratica clinica, specie nel trapianto di CSE, Dahlke et al. (2009) ha proposto che tutti i trials pre-clinici e clinici diretti a modulare la risposta immunologica nel trapianto di organo solido utilizzino CSM midollari.

Numerosi sono stati gli studi che hanno dimostrato la capacità delle CSM di modulare l'attività dei T linfociti, le principali cellule effettrici delle reazioni immunologiche post-trapianto. Le CSM esprimono particolari recettori che permettono loro di interagire con linfociti T, con molecole di classe I del MHC, con molecole di adesione e con integrine che si legano a ligandi presenti sulla superficie dei T linfociti. Inoltre, dopo stimolazione con IFN- γ le CSM esprimono indolamina 2,3-deidrogenasi (IDO) funzionalmente attiva. Tale molecola catalizza la conversione di triptofano in kinurenina che ingrana in una via di segnale che ha un effetto inibitorio sulla capacità effettrice delle cellule T (Mellor et al., 1999). È stato osservato che in colture miste linfocitarie le CSM che esprimono IDO in forma funzionalmente attiva sono capaci di bloccare la risposta di cellule T allogeniche. L'attivazione di tale deidrogenasi causa una deplezione di triptofano ed un aumento della produzione di kinurenina, evento che può essere revertato dall'aggiunta di triptofano (Miesel et al., 2004). Altri due meccanismi che la CSM ha a disposizione per inibire l'attività dei T linfociti sono la produzione di ossido nitrico e la capacità di inibire la maturazione del monocita a cellula dendritica. Quest'ultima azione dipende dalla capacità della CSM di bloccare la sovraespressione di CD1a, CD40, CD80 e CD86, marcatori espressi durante il processo di maturazione della cellula dendritica stessa. Inoltre, siccome la CSM inibisce la secrezione di TNF- α , IFN- γ e interleukina 12 e stimola la secrezione di interleukina 10, essa fa sì che la cellula dendritica riduca la sua azione pro-infiammatoria ed acquisisca un fenotipo anti-infiammatorio (Zhang et al., 2004). La capacità immunomodulante della CSM dipende però anche dalla sua interazione con cellule natural killer (NK) e con linfociti T citotossici (CTL). Essa sfugge all'azione di cellule NK perché secerne fattori solubili e non viene riconosciuta da CTL alloreattivi perché ne blocca la maturazione. Sotiropoulou et al. (2006) ha proposto che i meccanismi utilizzati dalla CSM per bloccare la proliferazione delle cellule NK siano sia un'inibizione da contatto cellula-cellula sia la secrezione di TGF- β e di prostaglandina E2.

Espansione ex vivo

Le CSM possono essere espanse in vitro per un numero finito di passaggi dopodiché la loro potenzialità proliferativa e differenziativa si riducono. Inoltre, la crescita e la resa di una coltura di CSM varia nei diversi individui e dipende anche

dall'età. La maggior parte dei protocolli di espansione in vitro impiega un terreno di coltura basale a basse concentrazioni di glucosio contenente il 10-20% di siero fetale bovino (FBS).

Siccome quest'ultimo potrebbe però contenere patogeni e anche perché il ricevente di queste CSM potrebbe produrre anticorpi anti-FBS si preferisce impiegare terreni di coltura privi di siero.

Le CSM potrebbero crescere in terreni di coltura che contengono fattore di crescita fibroblastico (FGF), "platelet-derived growth factor" (PDGF) e "transforming growth factor β " (TGF- β). Alcuni gruppi di ricerca per migliorare la crescita in coltura delle CSM impiegano il "recombinant human fibroblast growth factor" (rhFGF). In questo modo Caimi et al. (2010) hanno accorciato il tempo mediano necessario ad ottenere la dose target di CSM da infondere per il trattamento di una GvHD acuta e per il riparo di tessuto cartilagineo danneggiato senza modificare la capacità immunomodulante e la potenzialità differenziativa delle CSM stesse. Una reale alternativa al FCS è il lisato piastrinico già impiegato in alcuni trials clinici. Il lisato piastrinico evita che si verifichino spiacevoli reazioni immunologiche mediate da antigeni contenuti nel FBS, consente di ottenere CSM che soddisfano i requisiti proposti dalla "International Society for Cellular Therapy", accelera la crescita delle CSM umane, ritarda la differenziazione delle CSM in senso adipogenico riducendo il rischio di una maldifferenziazione e sembra migliorare la capacità delle CSM di bloccare l'attivazione delle cellule T. Tuttavia le piastrine esprimono molecole MHC di classe I e quindi potrebbero creare problemi di sensibilizzazione. Un'altra possibile alternativa al FBS potrebbe essere il siero umano AB o il siero autologo il cui impiego è però limitato dalla scarsa disponibilità.

Parametri ancora da definire

Numero di cellule da infondere

I primi due studi che volevano valutare la sicurezza delle CSM nel setting del trapianto autologo hanno impiegato dosi crescenti ($1 \times 10^6/\text{kg}$; $5 \times 10^6/\text{kg}$ e $10 \times 10^6/\text{Kg}$) (Lazarus et al., 1995) o una dose di $1-22 \times 10^6/\text{kg}$ (Koc et al., 2000); Frassoni et al. (2002) che ha infuso contemporaneamente CSM midollari e CSE da donatore familiare HLA-identico nel setting del trapianto allogenico aveva utilizzato una dose di $1-2 \times 10^6/\text{kg}$. Più recentemente la dose di CSM impiegata dai vari studi per il trattamento della GvHD acuta era stata di $0,6-9 \times 10^6/\text{kg}$, mentre quella impiegata da vari studi per accelerare l'attecchimento del tessuto ematopoietico era stata di $0,4-9 \times 10^6/\text{kg}$.

Il numero di CSM da impiegarsi nel setting del trapianto di organo solido non è ancora definito. In piccoli animali da esperimento era stata utilizzata una dose di 2-20 milioni pro kilo, nei ratti e nei topi era stata impiegata una dose di 10 milioni pro kilo che era la dose necessaria a che non si verificassero fenomeni embolici, mentre nei conigli e nelle scimmie la dose impiegata era stata 5-15 milioni pro kilo. Nell'uomo potrebbe essere utili somministrare dosi crescenti per valutare la sicurezza e tossicità delle CSM.

Produzione clinica

Nel caso le CSM vengano impiegate nel setting del trapianto di organo solido la loro produzione dovrebbe essere affidata a strutture che già producono standards di granulociti, macrofagi e altri progenitori. Tali strutture dovrebbero essere centralizzate per assicurare una precisa sorgente di cellule per tutti i pazienti. È delle massima priorità, anche se laborioso e costoso, lo sviluppo di un programma di gestione della qualità che assicuri che tutti i pazienti ricevano cellule standardizzate. Siccome i periodi di coltivazione sono lunghi vi sono parecchie restrizioni nei regimi di trattamento con CSM. Queste ultime non possono essere prodotte a breve termine da organi di cadaveri. Infatti, mentre l'organo deve essere trapiantato entro poche ore, le CSM devono essere espanse in vitro per alcune settimane al fine di ottenere una quantità di cellule sufficiente al trapianto. CSM autologhe dovrebbe essere prodotte individualmente mentre il paziente è in lista d'attesa per un organo compatibile.

I tempi d'attesa per il trapianto non possono essere determinati con esattezza ma devono essere sufficientemente lunghi per garantire l'espansione delle CSM. Quando il tempo del trapianto si avvicina, le CSM dovrebbe essere richieste ad intervalli regolari per essere fornite ad adeguati livelli al momento del trapianto. Le CSM ad uso autologo sono costose da produrre e la loro conservazione è difficile. Alternativamente può essere utilizzato un "third-party donor". L'impiego di CSM da diversi donatori può assicurare una buona qualità e disponibilità. Oggigiorno due sono le industrie farmaceutiche che forniscono CSM. La Osiris Therapeutics Inc. (Columbia, MD, USA, http://www.osiristx.com/clinical_trials.php) produce CSM da donatori sani (Prochymal) e la Athersys (Cleveland, OH, USA, <http://www.athersys.com>) che produce progenitori allestiti da donatori prequalificati. Tuttavia, ancora oggi si hanno poche notizie per il trapianto con CSM da donatore "third-party" rispetto a quelle disponibili per il trapianto con CSM da donatore familiare o con CSM autologhe.

Vie di infusione

Sino ad ora due sono state le vie di infusione più spesso impiegate: l'infusione endovenosa sottoforma di un importante volume cellulare o l'infusione direttamente nella zona di tessuto danneggiato. Tuttavia nessuna delle due modalità di infusione è quella corretta.

Infatti, la prima espone il paziente a possibili effetti collaterali dipendenti dal gran numero di cellule infuse (da 1 a 5 milioni di cellule pro kilogrammo) prodotte a costi eccessivi, mentre la seconda richiede l'esecuzione di procedure invasive molto costose. Per quanto concerne il trapianto di organo solido non vi sono esperienze riguardo l'infusione intra-portale o endoarteriosa di CSM. Nel ratto è stato dimostrato che CSM infuse nell'arteria renale miglioravano la glomerulonefrite. Un vantaggio di questa via di somministrazione potrebbe essere costituito dal fatto che la CSM giungendo direttamente nell'organo trapiantato riduce le possibili aree di infiammazione e quindi svolge un potenziale ruolo protettivo. Si tratta però di una procedura complessa che potrebbe causare la formazione di ostruzioni capillari dell'organo trapiantato.

Primi studi clinici

Non ci sono modelli animali preclinici che abbiano valutato l'impiego di CSM nel trapianto di CSE ed i trials clinici che hanno impiegato CSM per via endovenosa sono stati condotti prima di averne compreso d'azione in vivo. Il primo studio di fase I che ha esaminato la possibilità di raccogliere, espandere in vitro e infondere per via endovenosa CSM derivate dal midollo osseo era stato condotto nel 1995 (Lazarus et al., 1995). Le cellule staminali mesenchimali erano state raccolte ed espanse in vitro da un volume di 10ml di sangue midollare che era stato prelevato a ventitre pazienti con varie neoplasie ematologiche in remissione completa (RC). Dodici pazienti erano già stati sottoposti a trapianto autologo o syngeneico. Quindici pazienti avevano ricevuto l'infusione intravenosa di CSM autologhe espanse in vitro per un periodo di 4-7 settimane. Erano state impiegate tre dosi di CSM: 1×10^6 , 5×10^6 e 10×10^6 . Non si erano verificate reazioni avverse cosicché questo studio aveva dimostrato la fattibilità della procedura. Lo stesso gruppo di ricerca aveva successivamente condotto uno studio di fase I/II che aveva lo scopo di stabilire se l'infusione di CSM autologhe espanse in vitro accelerava la ripresa dell'ematopoiesi in ventotto pazienti con carcinoma della mammella sottoposti ad autotrapianto di CSE dopo condizionamento mieloablativo con ciclofosfamide, tiotepa e carboplatino (Koc et al, 2000). Anche in questo studio le CSM erano state risolte da un piccolo volume di sangue midollare, espanse in vitro e reinfuse nelle pazienti dopo 2-3 passaggi in vitro. La dose di CSM era stata di $1-2.2 \times 10^6$ CSM pro kilo. Ancora una volta non si erano verificati eventi avversi. La ricostituzione dell'ematopoiesi era stata rapida: la ripresa dei neutrofili ($\geq 500/\mu\text{l}$) era avvenuta dopo un tempo mediano di otto giorni e quella delle piastrine ($\geq 20000/\mu\text{l}$) dopo un tempo mediano di 8.5 giorni. Tuttavia, questo studio non essendo randomizzato non era riuscito a stabilire se il rapido attecchimento era realmente causato dall'infusione di CSM. Uno studio successivo aveva analizzato l'impiego delle CSM nel setting allogeneico. CSM midollari del donatore HL-identico erano state infuse alla dose di $1-2 \times 10^6/\text{kg}$ insieme alle CSE ottenute dallo stesso donatore dopo condizionamento mieloablativo. La ricostituzione ematopoietica era avvenuta in tutti i pazienti, l'incidenza di GvHD era inferiore a quella attesa e la sopravvivenza a sei mesi era migliore di quella presentata dai pazienti impiegati come controllo.

Trattamento della GvHD

Come già riportato uno degli aspetti più interessanti capacità della CSM è quella di modulare la risposta immunologia interagendo con linfociti T, linfociti B, cellule NK, cellule dendritiche. La GvHD acuta è una grave complicanza del trapianto allogeneico, è sostenuta dai linfociti T del donatore e si verifica nei primi cento giorni dal trapianto. La forma che non risponde alla terapia steroidea ha una prognosi particolarmente severa. Studi in vitro ed in vivo hanno indicato che le CSM proprio grazie alla loro capacità immunomodulante potevano migliorare le manifestazioni cliniche della GvHD acuta. Questo effetto avviene senza che

venga alterata la risposta immunologica dei linfociti T nei confronti dei virus. Basandosi su queste osservazioni, Le Blanc et al (2004) fu la prima ad utilizzare CSM per il trattamento della GvHD in un ragazzo di nove anni affetto da leucemia che aveva ricevuto un trapianto di CSE da un donatore HLA compatibile non consanguineo. Dopo il trapianto il paziente aveva sviluppato una GvHD intestinale ed epatica resistente alle alte dosi di steroidi, ad infliximab e daclizumab. Le CSM aplo-identiche utilizzate erano di origine materna ed erano state infuse dopo tre settimane di coltura in vitro. La severità della GvHD si ridusse dopo che fu infusa la prima dose di CSM. L'infusione di una seconda dose fu efficace per il trattamento di un successivo episodio di recrudescenza della GvHD. Il fatto che non si verificasse alcuna reazione di alloreattività quando i linfociti del paziente venivano coltivati insieme alle CSM del donatore prima e dopo il trapianto di CSM era una conferma del ruolo immunomodulante svolto dalle CSM stesse. Questa importante esperienza clinica fu il punto di partenza per un altro studio, condotto dallo stesso gruppo di ricerca, che aveva arruolato otto pazienti con GvHD di grado III-IV resistente agli steroidi e un paziente con GvHD cronica estesa (Ringden et al., 2006). Le CSM erano state ottenute da un donatore familiare HLA identico, da un donatore aplo-identico e da un donatore HLA non compatibile. Durante l'infusione delle CSM non si era verificato alcun evento avverso. Sei pazienti avevano mostrato una completa risoluzione della sintomatologia determinata dalla GvHD acuta, gli altri due morirono subito dopo l'infusione di CSM senza mostrare alcuna variazione del quadro clinico. Cinque pazienti erano sopravvissuti dopo un intervallo di tempo dal trapianto compreso tra due mesi e tre anni e quindi presentavano una sopravvivenza sicuramente superiore a quella descritta per un gruppo di sedici pazienti con GvHD acuta intestinale resistente alle alte dosi di steroidi che non avevano ricevuto CSM. Nel 2007 Fang et al aveva impiegato CSM derivate dal tessuto adiposo sottocutaneo di donatori "third-party" che erano stati sottoposti a lipectomia per trattare sei pazienti con GvHD acuta resistente agli steroidi. Le CSM erano state espanse in vitro ed infuse alla dose di 1×10^6 CSM/kg. La procedura era stata ben tollerata ed aveva determinato la remissione completa della GvHD in cinque pazienti, dimostrando che le CSM derivate dal tessuto adiposo avevano la stessa capacità immunomodulatoria di quelle midollari. Nel 2008 Muller et al notarono un miglioramento della GvHD in due dei sette pazienti pediatrici sottoposti a trapianto che avevano ricevuto CSM da genitori aploidentici. Nello stesso anno Le Blanc et al. (2008) ha riportato i risultati ottenuti dall'infusione di CSM di origine midollare espanse in vitro secondo le linee guida del "European Group for Blood and Marrow Transplantation". Questo studio multicentrico di fase II voleva valutare l'efficacia terapeutica di dosi multiple di CSM in cinquantacinque pazienti con GvHD acuta resistente agli steroidi. In quarantotto pazienti la GvHD acuta era insorta dopo trapianto, in sette era insorta dopo infusione dei linfociti del donatore. La dose mediana di CSM era stata di $1,4 \times 10^6$ (intervallo $0,4-9 \times 10^6$)/kg; le cellule erano state ottenute da diversi donatori e talvolta uno stesso paziente aveva ricevuto CSM da più donatori. Trenta pazienti (54,5%) avevano avuta una completa risoluzione della GvHD dopo una o più dosi di CSM. A due anni di distanza dalla

somministrazione di queste ultime sopravviveva il 53% dei pazienti responsivi ma solo il 16% di quelli non responsivi. Il dato più importante prodotto da questo studio, quello che ad oggi ha arruolato il maggior numero di pazienti con GvHD acuta steroide resistente, è che l'infusione di CSM da "third-party" è efficace quanto quella di CSM HLA-identiche o allo-identiche per il controllo della GvHD e pertanto CSM da "third-party" potrebbero essere bancate in anticipo per poter rapidamente intervenire in caso di GvHD acuta.

Nel 2009 Von Bonin et al descrisse i risultati ottenuti da uno studio che aveva utilizzato l'infusione di CSM midollari espanse in vitro in un terreno di coltura contenente lisati piastrinici ottenuti da diversi donatori non compatibili in tredici pazienti con GvHD steroide resistente. Il numero mediano di infusioni di CSM era stato due (intervallo 1-5) e la prima dose di CSM era stata infusa dopo un tempo mediano dallo sviluppo della GvHD acuta di sedici giorni. Dopo la prima dose di CSM solo due pazienti non hanno richiesto un incremento della terapia immunosoppressiva, tutti gli altri hanno ricevuto dosi aggiuntive di terapia immunosoppressiva di salvataggio ed un maggior numero di infusioni di CSM. Cinque di questi undici pazienti hanno raggiunto una risposta dopo ventotto giorni di terapia. Quattro pazienti (31%) sono sopravvissuti dopo un follow-up mediano di 257 giorni. Il minor numero di risposte ottenute in questo gruppo di pazienti potrebbe essere stato determinato dai criteri di selezione dei pazienti, dall'impiego di un terreno di coltura contenente lisati piastrinici, dalla metodologia impiegata per l'espansione delle CSM, dalla dose di CSM infuse e da altri fattori come l'intervallo di tempo tra lo sviluppo della GvHD e la prima infusione di CSM.

Considerando poi i prodotti commerciali, bisogna ricordare che Kebraie et al. (2009) ha utilizzato il Prochymal, prodotto della Osiris Therapeutics, a due diversi dosaggi per trattare la GvHD acuta. Il prodotto ottenuto dall'espansione in vitro di CSM HLA non relate era stato utilizzato alla dose di 2×10^6 CSM/kg ed alla dose di 8×10^6 CSM/kg ed era stato somministrato in combinazione con alte dosi di steroidi entro ventiquattro-quarantotto ore dalla diagnosi. Una seconda dose di Prochymal veniva infusa dopo tre giorni. Non si erano verificati eventi avversi e dopo l'infusione ventiquattro pazienti (77%) avevano raggiunto la remissione completa e cinque pazienti (16%) avevano raggiunto la remissione parziale. La risposta alla terapia non sembrava correlare con la dose di CSM infuse. Inoltre, la risposta era stata raggiunta in undici pazienti con GvHD cutanea, in nove pazienti con GvHD intestinale ed in tutti e sette i pazienti con GvHD multiorgano. Tuttavia, questo studio non era riuscito a definire l'efficacia delle CSM perché alte dosi di steroidi erano state prontamente somministrate a tutti i pazienti non appena si era sviluppata la GvHD acuta. Inoltre i risultati raggiunti da questo studio sono in contrasto con quelli di un altro studio randomizzato che ha voluto confrontare l'aggiunta di Prochymal versus l'aggiunta di placebo alla terapia sino ad ora esistente per la GvHD acuta resistente agli steroidi (Martin et al., 2010). Sono stati arruolati duecentoquarantaquattro pazienti, centosessantatré scelti in modo random dovevano ricevere otto infusioni di CSM alla dose singola di 2×10^6 /kg in un periodo di quattro settimanemente ottantuno pazienti ricevevano il placebo. Il principale fine dello studio era valutare la remissione completa dure-

vole (DCR), definita come remissione completa mantenuta a ventotto giorni dopo aver iniziato la terapia senza terapia aggiuntiva e la sopravvivenza a novanta giorni. Utilizzando un "intent-to-treat analysis" il tasso di DCR era 35% per il gruppo di pazienti che aveva ricevuto il Prochymal e 30% per il gruppo che aveva ricevuto il placebo. La risposta complessiva era identica per i due gruppi di pazienti. Un altro studio randomizzato di fase III con placebo che voleva confrontare steroidi e placebo o Prochymal come trattamento di prima linea della GvHD acuta non era riuscito a dimostrare un vantaggio per il Prochymal (Elchin et al., 2009).

Profilasi della GvHD

Nel 2005 Lazarus et al aveva condotto uno studio multicentrico che voleva analizzare la fattibilità di una procedura trapiantologia che prevedeva la contemporanea infusione di CSM midollari e CSE fornite dallo stesso donatore familiare HLA identico. Lo studio aveva arruolato quarantasei pazienti con varie neoplasie ematologiche. L'espansione delle CSM era stata possibile nel 91% dei donatori ed erano state identificati tre gruppi di pazienti che dovevano ricevere tre diverse dosi di CSM: 1.0, 2.5 e 5×10^6 CSM/kg.

In quarantasei pazienti la somministrazione di CSM aveva preceduto di quattro ore l'infusione di CSE midollari o periferiche. Durante l'infusione non si erano verificati eventi avversi e nel post-trapianto l'incidenza e la gravità della GvHD erano paragonabili a quelle riportate da altri studi che avevano eseguito un trapianto da donatore familiare HLA compatibile. Questo studio di fase I aveva dimostrato la fattibilità di questa procedura di trapianto contemporaneo, mancano tuttora studi di fase II/III che provino l'efficacia di questa strategia di profilassi.

Miglioramento della ricostituzione ematopietica

Siccome modelli sperimentali animali hanno dimostrato che la contemporanea infusione di CSM e di CSE migliora la ricostituzione dell'ematopoiesi e siccome le CSM contribuiscono alla ricostituzione dell'ematopoiesi, vari trials clinici hanno utilizzato CSM allo scopo di migliorare l'attecchimento dopo trapianto allogenico. In uno di questi le CSM erano state impiegate per impedire un nuovo rigetto in tre pazienti e per migliorare l'attecchimento in quattro (Le Blanc et al., 2007). In tre pazienti le CSE era state prelevate ad un donatore familiare HLA identico, in tre ad un donatore da registro ed in uno erano da cordone ombelicale. Tre pazienti avevano ricevuto le CSM da un donatore familiare, quattro da un donatore aplo-identico. La ripresa dei neutrofili e delle piastrine era avvenuta dopo un tempo mediano di dodici giorni. Pertanto, l'infusione contemporanea di CSE e CSM determinava un rapido attecchimento ed un chimerismo completo in tutti i pazienti compresi i tre che in precedenza avevano sperimentato il rigetto. In un altro studio quattordici pazienti pediatrici avevano ricevuto CSM e cellule CD34 positive periferiche selezionate da donatore aplo-identico dopo mobilita-

zione con G-CSF (Ball et al., 2007). Questi pazienti avevano mostrato una buona ripresa dell'ematopoiesi e nessun evento avverso rispetto ad un gruppo di controllo costituito da quarantasette pazienti che aveva presentato un'incidenza di rigetto del 15%. Pertanto, l'infusione di CSM sembrava in grado di ridurre il rischio di rigetto nel trapianto allo-identico forse a causa di un effetto immunosoppressivo nei confronti delle cellule T alloreattive del ricevente che erano sfuggite all'azione del regime di condizionamento. Un trial clinico di fase I/II aveva poi tentato di stabilire se l'infusione di CSM di genitori allo-identici accelerava la ricostituzione ematopoietica dopo trapianto di una singola unità di cordone ombelicale. Lo studio aveva arruolato quindici pazienti ma per vari motivi sette non riuscirono a ricevere CSM.

I restanti otto pazienti avevano ricevuto le CSM lo stesso giorno del trapianto e tre pazienti avevano ricevuto una seconda dose di CSM a distanza di ventuno giorni dal trapianto. Cinque pazienti non avevano ricevuto la seconda dose di CSM per mancanza delle stesse. Il tempo mediano per avere la ripresa dei neutrofili era stato di diciannove giorni, mentre il tempo mediano per avere una probabilità del 75% che si verificasse la ripresa delle piastrine era stimato essere cinquantatre giorni (il primo di sette giorni consecutivi con conta piastrinica $\geq 50000/\mu\text{L}$). Dopo un follow-up mediano di 6.8 anni cinque pazienti erano sopravvissuti liberi da malattia (MacMillan et al., 2009). In uno studio di fase I/II Gonzalo-Daganzo et al. (2009) aveva esaminato nove pazienti che avevano ricevuto CSM da donatori "third-party" ed erano stati sottoposti a trapianto contemporaneo di cordone ombelicale e CSE da "third-party". La dose mediana di CSM era stata di 1,18 (intervallo 1.4-2.22) $\times 10^6$ CSM/kg. Non si erano verificati effetti collaterali, la ripresa dell'ematopoiesi era identica a quella osservata nei pazienti di controllo ed il rischio di GvHD acuta severa era pure identico a quello presentato dal gruppo di controllo. Due pazienti avevano successivamente ricevuto CSM perché avevano sviluppato una GvHD acuta resistente agli steroidi ed entrambi avevano raggiunto la remissione completa.

Riparo dei danni tissutali prodotti dal trapianto allogenico di CSE

La CSM è stata utilizzata a questo scopo tenendo conto del suo ruolo in medicina rigenerativa. Uno studio ha utilizzato l'infusione di CSM in dieci pazienti con vari danni tissutali prodotti dalla tossicità connessa con la procedura di trapianto allogenico (Ringden et al., 2007). Sette pazienti presentavano una cistite emorragica, due un pneumomediastino, ed uno una perforazione del colon con peritonite. Il donatore di CSM era stato un non consanguineo HLA diverso in undici pazienti, un donatore allo-identico in tre pazienti ed un donatore familiare HLA compatibile in due pazienti. Una risoluzione della cistite emorragica fu osservata in cinque pazienti ed una risoluzione del pneumomediastino in due. Due pazienti videro ridursi il loro fabbisogno trasfusionale ma entrambi morirono di infezioni ricorrenti. Un paziente con GvHD acuta intestinale resistente agli steroidi ebbe un iniziale miglioramento del quadro clinico ma successivamente morì per un'infezione fungina.

Tab. 1 - Principali trials clinici che impiegano CSM

Trial clinico	Malattia	Via di somm.	Sorgente di CSM	Stato	Sede/Sponsor
CSM nella sclerosi multipla	Sclerosi Multipla	Endovena	CSM midollari autologhe	Arruolamento	Cambridge University, UK
Studio di "safety" precursori mesenchimali allogenici in pazienti con recente infarto miocardio acuto	Infarto miocardio	Iniezione transendocardica	CSM midollari allogeniche	Arruolamento	Angioblast systems, USA
CSM e rigetto subclinico	Trapianto d'organo	Endovena	CSM midollari allogeniche	Arruolamento non ancora iniziato	Leiden University Medical Center, Netherlands
Uso della differenziazione di CSM autologhe in progenitori epatocitari per il trattamento dei pazienti con malattia epatica in stadio terminale	Cirrosi, insufficienza epatica	Endovena	CSM autologhe indotte a differenziarsi in epatocita	Arruolamento	Shaheed Beheshti Medical University, Iran
Studio di fase II di fattibilità e sicurezza sulla somministrazione transendocardica di tre diverse dosi di progenitori di CSM allogenici per il trattamento dell'insufficienza cardiaca	Insufficienza cardiaca	Iniezione transendocardica	CSM midollari allogeniche	Arruolamento	Angioblast systems, USA
CSM sotto basiliximab/basse dosi di RATG per indurre tolleranza nel trapianto di rene	Trapianto di rene	Endovena	CSM midollari autologhe	Arruolamento	Mario Negri, Istituto di ricerca Farmacologia, Italia
Impianto di CSM autologhe per il trattamento di fratture tibiali distali	Fratture tibiali	Impianto locale	CSM midollari autologhe	Attivo	Hadassah Medical Organization Israele
Studio prospettico randomizzato con CSM per il trattamento di pazienti sottoposti a chirurgia cardiaca (PROMETHEUS)	Disfunzione ventricolare sinistra	Iniezione intramiocardica	CSM midollari autologhe	Arruolamento	National Heart, Lung, Blood Institute USA
Espansione del sangue cordonale su CSM	Sindromi mielodisplastiche Leucemie	Endovena	CSM allogeniche derivate dal sangue cordonale	Arruolamento	U.T.M.D. Anderson Cancer Center, USA

Trial clinico	Malattia	Via di somm.	Sorgente di CSM	Stato	Sede/Sponsor
Valutazione del trattamento con cellule staminali adulte umane Prochymal di malattia di Crohn di grado moderato-severo resistente al trattamento	Malattia di Crohn	Endovena	CSM midollari allogeniche (Prochymal)	Arruolamento	Osiris Therapeutics, USA
Infusione di CSM per la prevenzione del rigetto e della malattia da trapianto verso l'ospite	Malattie Ematologiche	Endovena	CSM midollari allogeniche infuse insieme a cCSE periferiche HLA-mismatched o a sangue cordonale	Arruolamento	University Hospital of Liege, Belgium
Studio di valutazione della sicurezza ed efficacia delle CSM umane adulte nel trattamento della GvHD acuta	Graft versus Host Disease	Endovena	CSM midollari allogeniche (Prochymal)	Terminato	Osiris Therapeutics, USA
Studio di valutazione dell'efficacia e sicurezza delle CSM umane adulte per il trattamento dei pazienti con GvHD acuta resistente agli steroidi	Graft versus Host Disease	Endovena	CSM midollari allogeniche (Prochymal)	Terminato	Osiris Therapeutics, USA
Prochymal (CS umane adulte) per il trattamento del diabete di tipo I di recente diagnosi	Diabete mellito di tipo I	Endovena	CSM midollari allogeniche (Prochymal)	Arruolamento	Osiris Therapeutics, USA
Prochymal (CS umane adulte) per il trattamento della malattia ostruttiva polmonare cronica di grado moderato-severo	Malattia polmonare cronica ostruttiva	Endovena	CSM midollari allogeniche (Prochymal)	Attivo	Osiris Therapeutics, USA
Trapianto di CSM per il trattamento della nefropatia cronica da allotrapianto	Nefropatia cronica da allotrapianto, trapianto di rene	Endovena	CSM midollari	Arruolamento non ancora iniziato	Fuzhou General Hospital, China
Terapia con CSM autologhe dell'insufficienza cardiaca	Insufficienza cardiaca congestizia	Iniezione intramiocardica	CSM midollari autologhe	Arruolamento non ancora iniziato	Rigshospitalet University Hospital, Copenhagen, Denmark

Trial clinico	Malattia	Via di somm.	Sorgente di CSM	Stato	Sede/Sponsor
Terapia dell'osteogenesi imperfetta con CSM midollari: studio pilota	Osteogenesi imperfetta	Endovena	CSM midollari allogeniche	Completato	St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, 38105

Riparazione di danni tissutali e malattie autoimmuni

Oggi giorno, circa ottanta trials clinici, alcuni in corso altri già terminati, hanno dimostrato la potenzialità terapeutica delle CSM; i principali sono riassunti in tabella 1. Chen et al. (2004) ha riportato che l'infusione intracoronarica di CSM midollari in pazienti con infarto miocardico acuto migliorava in modo statisticamente significativo la velocità di movimento della parete miocardica danneggiata. Il risultato più rilevante di questo studio era però rappresentato dal fatto che nei primi tre mesi di follow-up dopo l'infarto i pazienti che avevano ricevuto le CSM presentavano una frazione di eiezione del ventricolo sinistro significativamente più alta di quella dei pazienti che non erano stati sottoposti a tale procedura. Questa osservazione è stata confermata anche da altri studi a doppio cieco che prevedevano la somministrazione di un placebo.

Infatti, questi trials hanno dimostrato che l'infusione di CSM autologhe o commerciali (Prochymal) determinava un miglioramento della frazione di eiezione del ventricolo sinistro, riduceva la frequenza degli episodi di tachicardia ventricolare e riduceva il tasso di mortalità nei pazienti colpiti da stroke (Hare et al., 2009; Lee et al., 2010). Sino ad ora la capacità delle CSM di riparare i danni funzionali e strutturali prodotti a livello tubulare, glomerale ed interstiziale da un'insufficienza renale acuta o cronica è stata fornita da modelli animali (Morigi et al., 2008; Asanuma et al., 2010). Altri modelli sperimentali e i risultati iniziali di studi di fase I hanno evidenziato che CSM di origine midollare o commerciali possono essere impiegate per il trattamento delle complicanze cardiologiche, nefrologiche, polineuritiche nonché le ulcere cutanee che complicano il decorso clinico di pazienti affetti da diabete mellito (Volarevic et al., 2011). Altri studi di fase III stanno valutando l'impiego del Prochymal, prodotto dalla Osiris Therapeutics, per il trattamento della malattia di Crohn, mentre altri di fase I stanno reclutando pazienti con diabete mellito e malattia polmonare cronica ostruttiva da sottoporre a tale terapia.

Pazienti affetti da morbo di Crohn che non avevano risposto alla terapia standard con steroidi entrati in uno studio di fase II che prevedeva l'infusione di basse dosi di Prochymal per un periodo di tempo relativamente breve avevano mostrato un miglioramento delle manifestazioni cliniche della malattia dopo ventotto giorni di follow-up (Salem et al., 2010). Un'altra ditta farmaceutica l'Athersys (Cleveland, OH, USA, <http://www.athersys.com>) sta valutando l'impiego di CSM in diversi trials clinici di fase I in pazienti con vari tipi di ischemia acuta e malattie autoimmuni.

Trapianto di rene da donatore vivente

Il gruppo MISOT ha suggerito che CSM autologhe potrebbero essere infuse nel paziente in attesa di trapianto di rene da donatore familiare o non consanguineo prima del trapianto stesso (Dahlke et al., 2009). Il gruppo MISOT ha anche valutato se debbano essere impiegate CSM autologhe, allogeniche ottenute dal donatore o da un "third-party". Un punto a favore delle CSM autologhe è rappresentato dal fatto che la loro capacità di bloccare la risposta immunologica nei confronti del donatore è sovrapponibile a quella posseduta dalle CSM generate dal donatore e dal "third-party". Inoltre per impedire l'attivazione delle cellule che partecipano alla risposta immunologica e impedire la sensibilizzazione del paziente che riceve il trapianto bisogna evitare che avvenga il contatto con antigeni estranei. Pertanto il gruppo MISOT ha stabilito che nel setting del trapianto renale debbano essere utilizzate CSM midollari autologhe. D'altra parte la comprensione dei meccanismi che stanno dietro all'immunosoppressione mediata dalle CSM è assolutamente necessaria per poter decidere nel prossimo futuro quale tipo di CSM (autologhe o allogeniche) debbano essere impiegate per prevenire e trattare la reazione di rigetto. Inoltre, un altro punto essenziale per capire quale sia l'effetto benefico svolto dalle CSM autologhe nei confronti di queste complicanze del trapianto renale sarà un attento e ben disegnato monitoraggio clinico e immunologico post-trapianto.

Trapianto di fegato

Le problematiche sono le stesse del trapianto di rene. Per il momento anche in questo settino sarà bene privilegiare le CSM autologhe per un discorso di sicurezza. Il paziente che verrà sottoposto a trapianto dovrà comunque ricevere una terapia con immunosoppressori. Quest'ultima dovrà essere eseguita nel post-trapianto, mentre l'infusione delle CSM dovrà avvenire il più precocemente possibile prima e dopo l'operazione.

La funzione delle CSM potrà essere influenzata dalle alterazioni prodotte dall'immunosoppressione nel microambiente epatico del ricevente. Pertanto, la terapia immunosoppressiva sarà di preferenza condotta con micofenolato il cui dosaggio sarà inizialmente basso e verrà quindi progressivamente aumentato ("bottom-up protocol"). L'esecuzione di questo protocollo di immunosoppressione in combinazione con l'infusione di CSM sembra ancor più importante se si tiene conto che la somministrazione degli inibitori della calcineurina (Ciclosporina A) può impedire alle CSM di svolgere l'azione immunomodulatoria e che il rigetto acuto dopo trapianto di fegato viene controllato con facilità da un aumento dell'immunosoppressione. Inoltre, sembra che le CSM beneficino della rigenerazione del "graft" danneggiato da ischemia fredda. Pertanto il gruppo MISOT ha discusso un protocollo che confronta l'immunosoppressione di tipo "bottom-up" con micofenolato con lo stesso protocollo più CSM. L'"end point" primario dello studio è valutare l'intervallo di tempo richiesto per il verificarsi di un rigetto acuto e la frequenza di rigetto acuto.

Effetti negativi dell'infusione di CSM

Due gruppi di ricerca hanno riportato una cattiva differenziazione delle CSM direttamente infuse nell'area di tessuto danneggiato. Uno studio ha riportato la formazione di adipociti all'interno del glomerulo in un modello sperimentale di glomerulonefrite, un altro ha descritto la formazione di tessuto osseo ectopico in un modello murino di infarto miocardio. Inoltre, nel rigetto cronico di cuore e nel feagato con danno cronico è stato osservato che la CSM sviluppa un fenotipo simil miofibroblastico non voluto. Un trial clinico randomizzato aveva sottoposto a trapianto allogenico di CSE da donatore familiare compatibile venticinque pazienti con varie neoplasie ematologiche. Dieci pazienti avevano ricevuto CSM, quindici no (Ning et al., 2008). I due gruppi di pazienti non avevano mostrato differenze significative nella ripresa dei neutrofili e delle piastrine. Una GvHD di grado III/IV fu osservata in uno solo dei dieci pazienti che avevano ricevuto CSM mentre in otto dei quindi pazienti che non avevano ricevuto CSM, ma una ripresa di malattia era avvenuta in sei pazienti che avevano ricevuto CSM ed in tre pazienti che non avevano ricevuto CSM con una sopravvivenza libera da malattia a tre anni del 30% e del 66.7% rispettivamente. Pertanto, questo studio aveva suggerito che l'infusione di CSM e di CSE riduceva il rischio di GvHD ma faceva aumentare il rischio di recidiva. Non è dato sapere se i risultati ottenuti dallo studio fossero stati in qualche modo influenzati dalle dosi di CSM. Infatti, solo due pazienti avevano ricevuto la dose stabilita di CSM ($1-2 \times 10^6/\text{kg}$) mentre gli altri avevano ricevuto una dose di CSM inferiore a quella utilizzata da tutti gli altri studi ($0.03-1.5 \times 10^6/\text{kg}$). Altri studi hanno dimostrato che le CSM hanno un tropismo per lo stroma tumorale e grazie alla loro proprietà angiogenica ed immunomodulante possono favorire la crescita tumorale ed indurre la formazione di metastasi. Pertanto specie nel setting del trapianto che richiede un'importante e prolungata immunosoppressione bisognerà considerare il rischio di neoplasie occulte e di infezioni ricorrenti e bisognerà anche tener conto che le CSM stesse possono andare incontro ad un processo di trasformazione neoplastica determinando ad esempio la formazione di rhabdomyosarcomi alveolari. D'altra parte siccome le CSM sono una popolazione eterogenea potrebbe avvenire che cellule a potenziale cattiva differenziazione non siano quelle che svolgono un'azione di immunomodulazione.

Bibliografia

1. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000; 28: 875-884.
2. Dahlke MH, Hoogduijn M, Eggenhofer E, et al. Toward MSC in solid organ transplantation: 2008 position paper of the MISOT Study Group. *Transplantation* 2009; 88: 614-619.
3. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005; 7: 393-395.
4. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining mul-

- tipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2007; 9: 301-302.
5. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010; 28: 585-596.
 6. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6: 230-247.
 7. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
 8. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM: Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001; 98: 2396-2402.
 9. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem cells* 2004; 22: 625-634.
 10. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LL, Cerqueira A, Carvalho MD, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR, Zatz M: Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*. 2008; 26: 146-150.
 11. Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunology Today*. 1999; 20: 469-473.
 12. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D: Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004; 103: 4619-4621.
 13. Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, Deng W, Zhao RC: Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev*. 2004; 134: 263-271.
 14. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *StemCells*. 2006; 24: 74-85.
 15. Caimi PF, Reese J, Lee Z, Lazarus HM. Emerging therapeutic approaches for multipotent mesenchymal stromal cells. *Current Opinion in Hematol*. 2010; 17: 505-513.
 16. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transpl*. 1995; 16: 557-564.
 17. Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol*. 2000; 18: 307-316.
 18. Frassoni F, Labopin M, Bacigalupo A, et al. Expanded mesenchymal stem cells (MSC) co-infused with HLA identical stem cell transplants, reduce acute and chronic graft versus host disease: a matched pair analysis. *Bone Marr. Transpl*. 2002; 29: S2.
 19. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M,

- Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004; 363: 1439-1441.
20. Ringdén O, Uzunel M, Rasmussen I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006; 81:1390-1397.
 21. Fang B, Song Y, Liao L, Zhang Y, Zhao RC. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transpl. Proc.* 2007; 39: 3358-3362.
 22. Muller I, Kordowich S, Holzwarth C, Isensee G, Lang P, Neunhoeffler F, Dominici M, Greil J, Handgretinger R. Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol. Dis.* 2008; 40: 25-32.
 23. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O; Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008; 371: 1579-1586.
 24. von Bonin M, Stölzel F, Goedecke A, Richter K, Wuschek N, Hölig K, Platzbecker U, Illmer T, Schaich M, Schetelig J, Kiani A, Ordemann R, Ehninger G, Schmitz M, Bornhäuser M. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transpl.* 2009; 43: 245-251.
 25. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, Devetten M, Jansen J, Herzig R, Schuster M, Monroy R, Uberti J. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow transpl.* 2009; 15: 804-811.
 26. Martin PJ, Uberti JP, Soiffer RJ, et al. Prochymal improves response rates in patients with steroid- refractory acute graft versus host disease (SR-GVHD) involving the liver and gut: results of a randomized, placebo-controlled, multicenter phase III trial in GVHD. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2010; 16: S169-S170.
 27. Elchin E. Osiris Therapeutics announces preliminary results for prochymal phase III GVHD trials. Osiris Therapeut Press release (serial on the Internet) 09/08/2009.
 28. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, Shpall EJ, McCarthy P, Atkinson K, Cooper BW, Gerson SL, Laughlin MJ, Loberiza FR Jr, Moseley AB, Bacigalupo A. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2005; 11: 389-398.
 29. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, Ljungman P, Lönnies H, Nava S, Ringdén O. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2007; 21: 1733-1738.
 30. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM,

- Locatelli F, Fibbe WE. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. 2007; 110: 2764-2767.
31. Macmillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone Marrow transpl*. 2009; 43: 447-454.
 32. Gonzalo-Daganzo R, Regidor C, Martín-Donaire T, Rico MA, Bautista G, Krsnik I, Forés R, Ojeda E, Sanjuán I, García-Marco JA, Navarro B, Gil S, Sánchez R, Panadero N, Gutiérrez Y, García-Berciano M, Pérez N, Millán I, Cabrera R, Fernández MN. Results of a pilot study on the use of third-party donor mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults. *Cytotherapy*. 2009; 11: 278-288.
 33. Ringdén O, Uzunel M, Sundberg B, Lönnies L, Nava S, Gustafsson J, Henningsohn L, Le Blanc K. Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon. *Leukemia*. 2007; 21: 2271-2276.
 34. Chen SL, Fang WW, Qian J, Ye F, Liu YH, Shan SJ, Zhang JJ, Lin S, Liao LM, Zhao RC. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1443-1448.
 35. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, Gerstenblith G, DeMaria AN, Denktas AE, Gammon RS, Hermiller JB Jr, Reisman MA, Schaer GL, Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am. Coll. Cardiol*. 2009; 54: 2277-2286.
 36. Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY; STARTING collaborators. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells*. 2010; 28: 1099-1106.
 37. Morigi M, Introna M, Imberti B, Corna D, Abbate M, Rota C, Rottoli D, Benigni A, Perico N, Zoja C, Rambaldi A, Remuzzi A, Remuzzi G. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells*. 2008; 26: 2075-2082.
 38. Asanuma H, Meldrum DR, Meldrum KK: Therapeutic applications of mesenchymal stem cells to repair kidney injury. *J Urology*. 2010; 184: 26-33.
 39. Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Stojkovic M. Concise review: Mesenchymal stem cell treatment of the complications of diabetes mellitus. *Stem Cells*. 2011; 29: 5-10.
 40. Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J, Yu Z, Li B, Xu C, Li Y, Wang J, Hu J, Lou X, Chen H. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia*. 2008; 22: 593-599.

**PROSPETTIVE
DI IMMUNOTERAPIA CELLULARE**

Immunoterapia cellulare adottiva con linfociti T citotossici: un aggiornamento

Rita Maccario, Daniela Montagna, Antonia Moretta, Patrizia Comoli

Laboratorio di Immunologia Trapianti/Cell Factory, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università degli Studi di Pavia

L'immunoterapia cellulare adottiva con linfociti T, finalizzata al potenziamento dei meccanismi endogeni d'immunosorveglianza, è stata identificata e, da circa venticinque anni, progressivamente sempre più frequentemente utilizzata quale efficace strumento capace di prevenire e/o curare gravi infezioni da patogeni opportunisti e la recidiva neoplastica in individui immunocompromessi. In particolare, pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (allo-TCSE) o a trapianto d'organo solido, e pazienti affetti da alcune tipologie di tumore solido refrattario ai trattamenti convenzionali possono trarre beneficio da un approccio di terapia cellulare adottiva personalizzata con linfociti T.

L'allo-TCSE, soprattutto il TCSE T-depletato da donatore parzialmente HLA-compatibile, è associato, durante la fase di ricostituzione del sistema emopoietico ed immunologico post trapianto, ad uno stato di profonda d'immunodeficienza che può favorire l'insorgenza di gravi infezioni opportunistiche, soprattutto infezioni virali o fungine, e sfavorire l'instaurarsi dei meccanismi di immunosorveglianza antitumore, con conseguente aumentato rischio di ricaduta della malattia neoplastica.

In questa tipologia di pazienti l'efficacia dell'approccio di terapia cellulare adottiva è rafforzata dalla possibilità di utilizzare linfociti T di origine del donatore di CSE, per definizione un individuo immunocompetente; è stato ipotizzato che, nel caso di individui sottoposti ad allo-TCSE per la cura di patologia neoplastica, la terapia cellulare adottiva con linfociti dotati di attività antitumore, oltre a contribuire alla ricostituzione dell'immunocompetenza derivata dal sistema immunitario del donatore, giochi un importante ruolo nel potenziare lo sviluppo dell'effetto *graft-versus-tumor* (GVT) del trapianto stesso.

Nel caso di pazienti sottoposti a trapianto di organo solido lo stato di immunocompromissione secondario alle terapie immunosoppressive anti-rigetto può essere, invece, trattato esclusivamente con approcci di terapia cellulare adottiva con linfociti T autologhi.

Lo stesso approccio di terapia cellulare adottiva con linfociti T autologhi è dedicato ai pazienti con tumore solido refrattario ai trattamenti convenzionali, per i quali non è prevista indicazione all'allo-TCSE.

La preparazione *in vitro* di linee linfocitarie T per utilizzo in approcci di terapia cellulare (prodotti medicinali per terapia avanzata a base di cellule) deve essere eseguita in ottemperanza alle norme di *good manufacturing practice* (GMP) e a quanto disposto dalle specifiche normative Nazionali e della Comunità Europea.

Strategie metodologiche per la preparazione di prodotti medicinali per terapia cellulare (PMTC)

PMTC patogeno-specifici - PMTC specifici per tumori virus-correlati

Il primo approccio d'immunoterapia T-cellulare adottiva dedicata a pazienti sottoposti ad allo-TCSE è stato sviluppato agli inizi degli anni '90 dal gruppo di Seattle (Riddell, Greenberg et al.), allo scopo di prevenire le gravi patologie correlate all'infezione post-trapianto da citomegalovirus.

I risultati più entusiasmanti in termini di prevenzione ed effetto terapeutico sono stati ottenuti, tuttavia, con l'immunoterapia T-cellulare adottiva delle patologie correlate all'infezione da virus di Epstein-Barr (EBV). Una pietra miliare in questo specifico settore è rappresentata dagli studi del gruppo guidato da Rooney e Brenner (Huston, USA), iniziati a metà degli anni '90 che hanno dimostrato l'efficacia a lungo termine della terapia cellulare adottiva con linee policlonali di linfociti T citotossici (CTL) EBV-specifici, di origine del donatore di allo-TCSE, sia per la prevenzione sia per la terapia della malattia linfoproliferativa post-trapianto (PTLD) EBV-correlata. Questi primi studi sono stati, in seguito, confermati da altri gruppi e la terapia cellulare adottiva con CTL EBV-specifici è stata utilizzata principalmente per la cura delle PTLT refrattarie al trattamento con retuximab (Figura 1); l'esperienza maturata in ambito di allo-TCSE è stata estesa in seguito, al trattamento della PTLT EBV-correlata in pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido e alla terapia di altre neoplasie EBV correlate, ad esempio il carcinoma naso-faringeo, resistente alle terapie convenzionali. Recentemente, utilizzando opportuni accorgimenti metodologici, è stato dimostrato che efficienti CTL CD8+ EBV-specifici possono essere attivati ed espansi *in vitro* anche dal sangue periferico di individui adulti o in età pediatrica EBV-sieronegativi (Figura 2).

Approcci alternativi all'utilizzo delle cellule infettate con virus nella fase di *priming* dei linfociti T del donatore consistono nell'utilizzo di proteine o lisati del

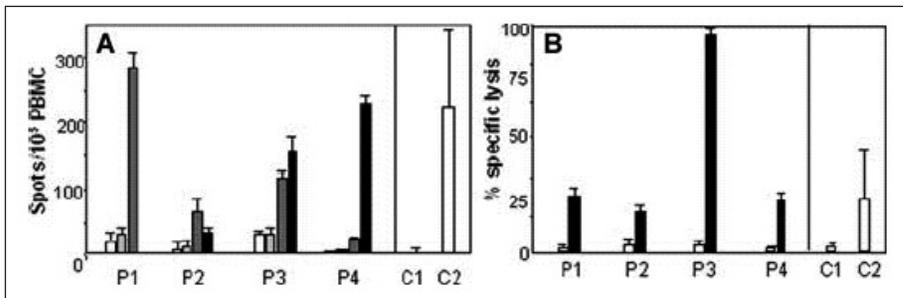


Fig. 1 - Da: Comoli et al. American J Transplantation 2007; 7: 1648-55.

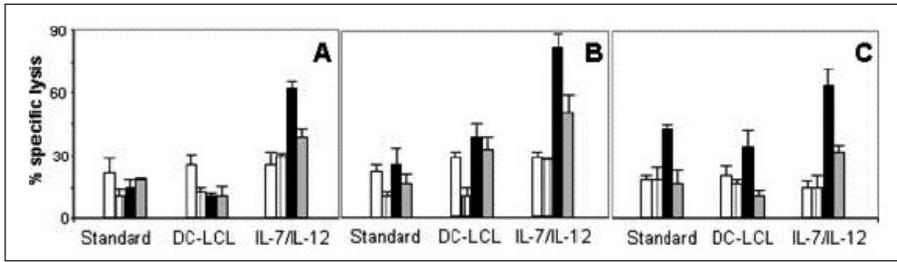


Fig. 2 - Da: Comoli et al. American J Transplantation 2006; 6: 2169-76.

patogeno, di patogeno inattivato o di peptidi o miscele di peptidi immunogenici derivati da proteine associate al patogeno in questione. Quest'ultimo approccio metodologico è stato utilizzato con successo, ad esempio, per la preparazione di cloni linfocitari T specifici per AdV, l'utilizzo della miscela di peptidi, anziché del singolo peptide immunogenico permette di preparare linfociti patogeno-specifici la cui funzione immunologica non è ristretta da un singolo aplotipo HLA.

PMTc anti-tumore

Il fondamento logico dell'uso, per i pazienti sottoposti ad allo-TCSE, di protocolli d'immunoterapia cellulare adottiva con linfociti T capaci di aggredire selettivamente le cellule tumorali, risparmiando quelle sane, poggia sulla dimostrazione dell'efficacia, in assenza d'effetti collaterali rilevanti, della terapia cellulare adottiva, virus-specifica, soprattutto nella prevenzione e cura di PTLD EBV-correlate. In entrambi i casi, le cellule potenzialmente utilizzabili per generare ed espandere linee linfocitarie T policlonali, o derivate da singoli cloni linfocitari T, sono d'origine del donatore di allo-TCSE e derivano, quindi, da un individuo immunocompetente in grado di sviluppare un repertorio immunologico completo ed efficiente. Nel caso di terapia cellulare adottiva antivirale, esperienze cliniche hanno dimostrato come le cellule somministrate abbiano la possibilità d'incontrare numerosi antigeni virali immunodominanti, capaci di stimolare una considerevole espansione numerica dei linfociti T virus-specifici e di favorire lo sviluppo di memoria immunologica, utile al controllo delle eventuali successive riattivazioni del virus stesso.

Nel caso di terapia cellulare adottiva anti-tumore, la possibilità di successo è ostacolata dall'evidenza dei numerosi potenziali meccanismi con cui la cellula tumorale potrebbe, anziché attivare, bloccare la risposta immunitaria anti-neoplastica (*immune escape*) trasferita mediante immunoterapia cellulare adottiva. La prima scelta strategica, utile per impostare un programma di terapia cellulare adottiva anti-tumore riguarda il tipo d'antigene utilizzato, nella fase di *priming*, per la generazione *in vitro* sia di CTL selettivamente diretti verso il tumore sia di altre sottopopolazioni linfocitarie T, necessarie per l'espansione a lungo termine dei CTL stessi. Nel corso degli anni, svariati approcci metodologici sono stati studiati, per esplorarne la potenzialità d'indurre *in vitro* una risposta immunitaria anti-tumore a lungo termine:

- antigeni tumore-specifici non-polimorfici;
- antigeni minori d'istocompatibilità polimorfici (mHAg);
- antigeni non-polimorfici di differenziazione cellulare iperespressi sulle cellule tumorali;
- lisato della cellula tumorale;
- cellule tumorali rese apoptotiche mediante irradiazione.

Nel 1999 Falkenburg et al. (Leiden, NL) hanno descritto la prima esperienza di terapia cellulare adottiva antileucemia in un paziente con leucemia mieloide cronica, in fase accelerata di malattia dopo trapianto. I CTL antileucemia, d'origine del donatore di allo-TCSE, sono stati preparati utilizzando la cellula tumorale apoptotica quale fonte di antigeni tumorali. Lo studio ha dimostrato la possibilità di ottenere, mediante l'infusione di un ragguardevole numero di cellule coltivate *in vitro*, uno stato di remissione ematologia completa. Questo risultato ha rappresentato una pietra miliare per la sperimentazione di un simile approccio di terapia cellulare adottiva, anche per pazienti affetti da leucemia acuta. Studi successivi si sono, perciò, focalizzati sull'ottimizzazione di metodologie che consentissero di espandere efficientemente *in vitro*, CTL capaci di mantenere attività anti-tumore anche dopo parecchi cicli di ristimolazione, utilizzando la cellula tumorale apoptotica quale fonte di antigeni tumore-associati. In particolare un interessante protocollo metodologico, ottimizzato e descritto da Montagna et al. (Pavia), utilizza:

- cellule dendritiche - le *antigen presenting cells* professioniste - d'origine del donatore;
- cellule leucemiche del paziente rese apoptotiche mediante irradiazione, quale fonte d'antigeni tumorali;
- popolazioni arricchite in linfociti CD8+ d'origine del donatore quali cellule effettrici dell'attività citotossica antitumore;
- aggiunta, ad opportuni tempi di coltura, di cellule *feeder* irradiate (cellule mononucleate del donatore) e miscele di citochine (IL-7, IL-12, IL-2, IL-15) importanti per l'induzione ed espansione a lungo-termine di varie sottopopolazioni di CTL *memory* ed effettori.

Un ulteriore approfondimento nel processo di ottimizzazione di questo approccio metodologico ha consentito di dimostrare che, mediante l'utilizzo di opportune tecniche di clonaggio e propagazione di linee linfocitarie T, derivate da una singola cellula, è possibile separare *in vitro* i linfociti T capaci di aggredire selettivamente la cellula neoplastica (effetto *graft-versus-leukemia*, GVL) da quelli potenzialmente in grado di indurre la *graft-versus-host disease* (GVHD). I risultati ottenuti *in vitro*, hanno dimostrato come la strategia metodologica d'utilizzo di cellule tumorali apoptotiche, presentate da cellule dendritiche del donatore di allo-TCSE indipendentemente dal suo aplotipo HLA, non richieda la definizione di uno specifico antigene tumorale e consenta di generare, dalle cellule mononucleate del donatore stesso, CTL anti-tumore policlonali capaci di espandersi per parecchi cicli replicativi senza perdere le caratteristiche intrinseche di specificità e funzionalità. L'uso della cellula tumorale apoptotica quale fonte di antigeni tumorali, presentati presumibilmente con un meccanismo di *cross-priming* dalle

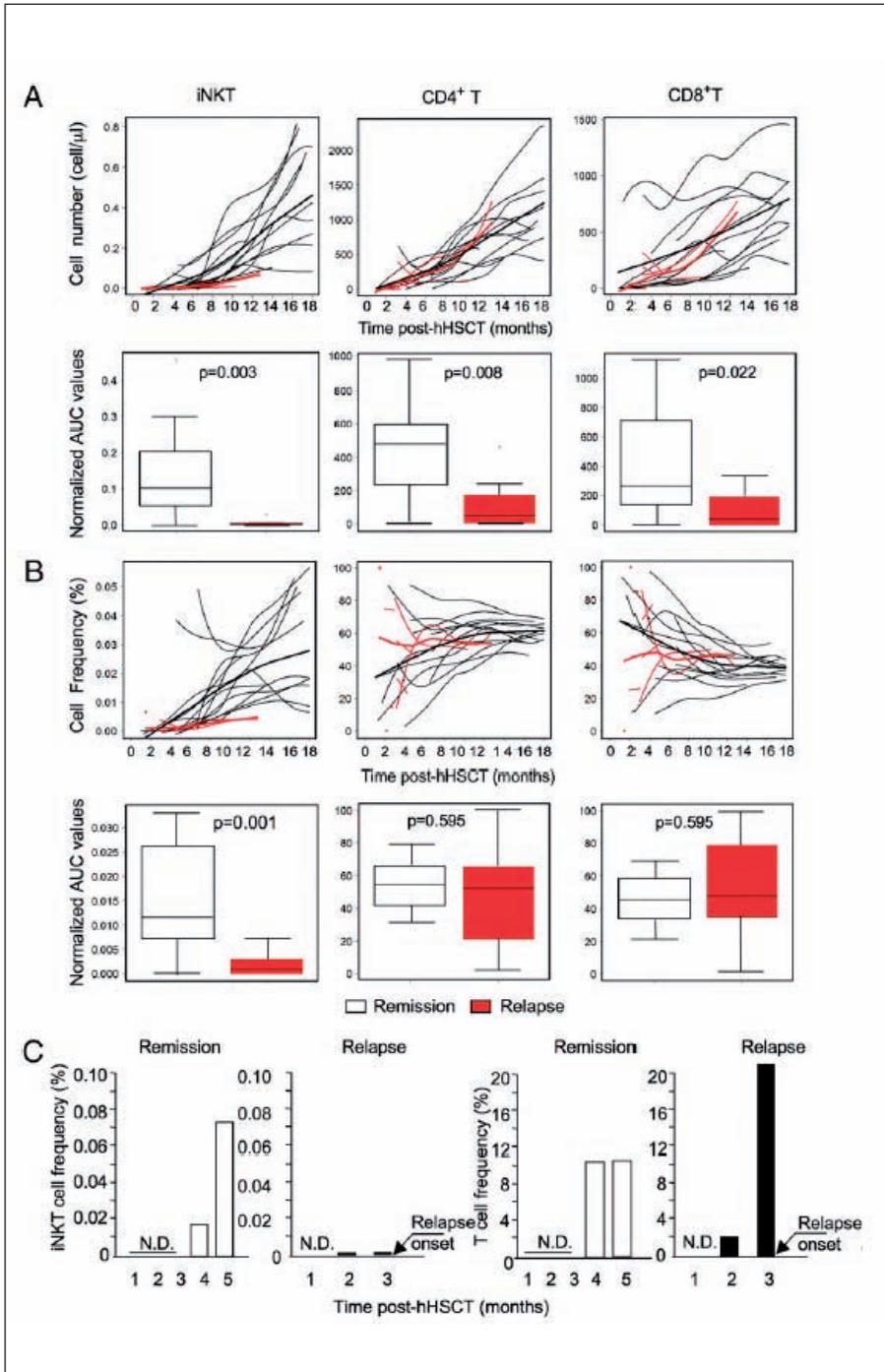


Fig. 3 - Da: de Lalla et al. J Immunology 2011; 186: 4490-99.

cellule dendritiche, non permette, d'altro canto, di definire la natura degli antigeni riconosciuti dai CTL antitumore che potrebbero comprendere proteine tumore-specifiche, mHAg e antigeni non-polimorfici di differenziazione cellulare iperespressi sulle cellule tumorali. La policlonalità della risposta evocata rappresenta, tuttavia, un vantaggio considerevole in termini di potenziale efficacia dei CTL anti-tumore *in vivo* poiché diminuisce la possibilità che la risposta T citotossica possa essere bloccata da meccanismi d'*immune escape*. L'approccio metodologico sopra descritto è stato utilizzato con successo anche per l'attivazione ed espansione *in vitro* di CTL specifici per alcune tipologie di tumore solido.

Studi recenti (Riva et al.) hanno documentato la presenza di CTL BCR-ABL-specifici, dotati di capacità citolitica nei confronti di blasti leucemici autologhi BCR-ABL+, nel midollo osseo di pazienti con leucemia linfoblastica acuta Ph+ in trattamento a lungo termine con *imatinib mesylate* e con bassi livelli di malattia residua minima. I risultati di questi studi suggeriscono l'opportunità di ottimizzare una metodologia idonea per l'espansione *in vitro* dei CTL BCR-ABL-specifici in prospettiva del loro utilizzo in protocolli di immunoterapia adottiva.

È stato recentemente dimostrato (de Lalla et al.) che la mancata ricostituzione dopo allo-TCSE dei linfociti *invariant* NKT (iNKT), una sottopopolazione linfocitaria implicata nell'immunosorveglianza anti-patogeno e anti-tumore, correla con la recidiva della malattia neoplastica dopo trapianto (Figura 3). I risultati dello studio suggeriscono la possibilità di ottimizzare una metodologia idonea per l'espansione *in vitro* di iNKT del donatore di allo-TCSE, in prospettiva del loro utilizzo in protocolli di immunoterapia adottiva per i pazienti che non ricostituiscono queste cellule immuni dopo trapianto allo scopo di prevenire la recidiva della malattia neoplastica.

Bibliografia

1. Riddell SR, Greenberg PD. Principles for adoptive T cell therapy of human viral disease. *Annu Rev Immunol.* 1995; 13: 545-586.
2. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, et al. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 1995; 345: 9-12.
3. Comoli P, Labirio M, Basso S, Baldanti F, Grossi P, Furione M, Viganò M, Fiocchi R, Rossi G, Ginevri F, Gridelli B, Moretta A, Montagna D, Locatelli F, Gerna G, Maccario R. Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood.* 2002; 99: 2592-8.
4. Comoli P, Pedrazzoli P, Maccario R, Basso S, Carminati O, Labirio M, Schiavo R, Secondino S, Frasson C, Perotti C, Moroni M, Locatelli F, Siena S. Cell therapy of stage IV nasopharyngeal carcinoma with autologous Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 8942-9.
5. Comoli P, Basso S, Zecca M, Pagliara D, Baldanti F, Bernardo ME, Barberi

- W, Moretta A, Labirio M, Paulli M, Furione M, Maccario R, Locatelli F. Preemptive therapy of EBV-related lymphoproliferative disease after pediatric haploidentical stem cell transplantation. *Am J Transplant*. 2007; 7: 1648-55.
6. Comoli P, Schilham MW, Basso S, van Vreeswijk T, Bernardo ME, Maccario R, van Tol MJ, Locatelli F, Veltrop-Duits LA. T-cell lines specific for peptides of adenovirus hexon protein and devoid of alloreactivity against recipient cells can be obtained from HLA-haploidentical donors. *J Immunother*. 2008; 31: 529-36.
 7. Comoli P, Basso S, Labirio M, Baldanti F, Maccario R, Locatelli F. T cell therapy of Epstein-Barr virus and adenovirus infections after hemopoietic stem cell transplant. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2008; 40: 68-70.
 8. Locatelli F, Comoli P, Montagna D, Rossi F, Daudt L, Maccario R. Innovative approaches of adoptive immune cell therapy in paediatric recipients of haematopoietic stem cell transplantation. *Best Practice Res. Clin. Haematol*. 2004; 17: 479-92.
 9. Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, Smit WM, van Bergen CA, Bongaerts R, Lurvink E, van der Hoorn M, Kluck P, Landegent JE, Kluin-Nelemans HC, Fibbe WE, Willemze R. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 1999; 94: 1201-1208.
 10. Montagna D, Maccario R, Locatelli F, Rosti V, Yang Y, Farness P, Moretta A, Comoli P, Montini E, Vitello A. Ex vivo priming for long-term maintenance of antileukemia human cytotoxic T cells suggests a general procedure for adoptive immunotherapy. *Blood* 2001; 98: 3359-66.
 11. Montagna D, Maccario R, Montini E, Tonelli R, Lisini D, Pagani S, Comoli P, Moretta A, Assirelli E, Basso S, Vitiello A, Pession A, F Locatelli F. Generation and ex vivo expansion of cytotoxic T lymphocytes directed toward different types of leukemia or myelodysplastic cells using both HLA-matched and partially matched donors. *Exp Hematol*. 2003; 31: 1031-38.
 12. Montagna D, Maccario R, Locatelli F, Montini E, Pagani S, Bonetti F, Daudt L, Turin I, Lisini D, Garavaglia C, Dellabona P, Casorati G. Emergence of anti-tumor cytolytic T cells is associated with maintenance of hematologic remission in children with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 108: 3843-50.
 13. Montagna D, Daudt L, Locatelli F, Montini E, Turin I, Lisini D, Giorgiani G, Bernardo ME, Maccario R. Single-cell cloning of human, donor-derived antileukemia T-cell lines for in vitro separation of graft-versus-leukemia effect from graft-versus-host reaction. *Cancer Res*. 2006; 66: 7310-6.
 14. Turin I, Pedrazzoli P, Tullio C, Montini E, La Grotteria MC, Schiavo R, Perotti C, Locatelli F, Carretto E, Maccario R, Siena S, Montagna D. GMP production of anti-tumor cytotoxic T-cell lines for adoptive T-cell therapy in patients with solid neoplasia. *Cytotherapy* 2007; 9: 499-507.
 15. Daudt L, Maccario R, Locatelli F, Turin I, Silla L, Montini E, Percivalle E, Giugliani R, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D. Interleukin-15 favors the expansion of central memory CD8+ T cells in ex vivo generated, antileukemia human cytotoxic T lymphocyte lines. *J Immunother*. 2008; 31: 385-93.

16. Montagna D, Maccario R, Locatelli F. Expansion of antileukaemia CTL lines and clones for adoptive cell therapy in paediatric patients given allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet.* 2008; 35: 389-93.
17. Riva G, Luppi M, P Barozzi, Quadrelli C, S Basso, Vallerini D, Zanetti E, Morselli M, Forghieri F, Maccaferri M, Volzone F, Del Giovane C, D'Amico R, Locatelli F, Torelli G, Comoli P, Potenza L. Emergence of BCR-ABL specific cytotoxic T cells in the bone marrow of patients with Ph+ acute lymphoblastic leukemia during long-term imatinib mesylate treatment. *Blood* 2010; 115: 1512-8.
18. de Lalla C, Rinaldi A, Montagna D, Azzimonti L, Bernardo ME, Sangalli LM, Paganoni AM, Maccario R, Di Cesare-Merlone A, Zecca M, Locatelli F, Dellabona P, Casorati G. Invariant NKT Cell Reconstitution in Pediatric Leukemia Patients Given HLA-Haploidentical Stem Cell Transplantation Defines Distinct CD4+ and CD4neg Subset Dynamics and Correlates with Remission State. *J Immunol.* 2011; 186: 4490-9.

Possibile impiego terapeutico di cellule NK alloreattive in pazienti affetti da emopatie maligne o tumori solidi

Daniela Pende

Unità di Immunoterapia Cellulare Personalizzata, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova

Introduzione alle cellule NK

Le cellule Natural Killer (NK) rappresentano un importante componente dell'immunità innata. Sono regolate da una serie di recettori, che trasducono segnali attivatori o inibitori, capaci di modulare finemente potenti funzioni effettrici, quali la citotossicità e il rilascio di citochine. Un gruppo di recettori inibitori interagisce specificamente con molecole MHC-classe I prevenendo così l'attacco NK contro cellule normali autologhe MHC-classe I⁺, che risultano quindi protette. In seguito a trasformazione neoplastica o infezione da patogeni, le cellule possono perdere o down-regolare MHC-classe I e quindi risultare suscettibili alla lisi NK per mancanza di segnale inibitorio ("Missing self recognition"). Le cellule patologiche in seguito a stress possono anche sovraesprimere molecole che rappresentano i ligandi dei recettori attivatori e quindi essere uccise dalle NK per eccesso di segnale attivatorio ("Induced self recognition") (1). Nell'uomo, i recettori inibitori HLA-specifici comprendono:

- 1) i KIR, che appartengono alla superfamiglia delle Ig e sono specifici per determinanti condivisi da gruppi di allotipi HLA-A, -B e -C, denominati "KIR-ligandi" (KIR-L);
- 2) LIR1/ILT-2 (CD85j), che riconosce vari alleli HLA;
- 3) CD94/NKG2A, un eterodimero appartenente alla famiglia delle lectine di tipo C, che riconosce HLA-E (2).

Strutturalmente, i KIR inibitori (iKIR) hanno due o tre domini Ig-like extracellulari (KIR2D e KIR3D, rispettivamente), una porzione transmembrana e una coda citoplasmatica lunga (KIR2DL e KIR3DL) contenente motivi ITIM. Riguardo alla specificità HLA, KIR2DL1 è specifico per un gruppo di alleli HLA-C caratterizzato da lisina in posizione 80 (definito epitopo C2), mentre KIR2DL2/3 riconoscono con alta affinità alleli HLA-C caratterizzati da asparagina in posizione 80 (epitopo C1). Recentemente, è stato dimostrato che KIR2DL2 e KIR2DL3 riconoscono a bassa affinità anche molecole HLA-C del gruppo C2. KIR3DL1 riconosce epitopo Bw4 presente in alcuni alleli HLA-B e anche pochi alleli HLA-A, mentre KIR3DL2 riconosce alcuni alleli HLA-A, in particolare -A3 e -A11.

Esistono anche forme attivatorie dei KIR (aKIR), caratterizzati da coda citoplasmatica corta (KIR2DS e KIR3DS) e da porzione trans-membrana con residuo carico che permette la loro associazione con molecole adattatrici (DAP12) richieste per generare segnali attivatori. Nonostante la straordinaria omologia nella regione extracellulare tra alcuni aKIR e le loro controparti inibitorie, la specificità per HLA classe I è stata chiaramente dimostrata solo per KIR2DS1, che riconosce l'epitopo C2. I geni KIR sono organizzati in un locus del cromosoma 19 e sono ereditati come alplotipi. Gli alplotipi KIR esibiscono variabilità nel numero e tipo di geni e nel polimorfismo allelico dei vari geni KIR, risultando in un'estensiva diversità genetica. Sulla base del loro contenuto genico, sono stati definiti due gruppi di alplotipi KIR: A e B. Alplotipi KIR di gruppo A hanno pattern fisso genico e hanno come KIR attivatorio solo KIR2DS4. Al contrario, gli alplotipi B differiscono l'uno dall'altro riguardo al contenuto genico, più variabile e contenente vari aKIR. Il repertorio NK è primariamente determinato dal genotipo KIR ed è clonalmente distribuito, cioè i differenti KIR possono essere espressi da una variabile percentuale di cellule NK e possono essere co-espressi o no con altri KIR o NKG2A. Sebbene i loci KIR e HLA segregano indipendentemente, il genotipo HLA-classe I influenza il repertorio KIR. Infatti, per assicurare la tolleranza verso le cellule autologhe, ciascuna cellula NK deve esprimere almeno un recettore inibitorio specifico per il self HLA-classe I, altrimenti è ipo-reattiva. Quindi, durante la maturazione, solo cellule NK esprimenti recettori inibitori specifici per il self HLA-classe I acquisiscono una piena funzione effettrice. Questo fenomeno è detto "licensing" o "education" (3). In un contesto autologo le cellule NK licenziate possono lisare solo cellule target che hanno perso o down-regolato molecole HLA-classe I. Inoltre, cellule NK licenziate sono alloreattive quando esprimono esclusivamente iKIR che non riconoscono nessuna molecola HLA classe I (KIR-L) espressa da cellule target allogeneiche tramite il riconoscimento del "missing self".

Le cellule NK sono anche equipaggiate con vari recettori attivatori responsabili per l'attivazione NK nel processo della citotossicità naturale (4). Un ruolo importante nell'uccisione di cellule tumorali è esercitato da Nkp46, Nkp30 e Nkp44 (chiamati collettivamente Recettori della Citotossicità Naturale, NCR), primariamente ristretti alle cellule NK. I ligandi cellulari riconosciuti dagli NCR sono ancora non noti, con l'eccezione di B7-H6, un ligando per Nkp30. Un altro recettore che ha un ruolo maggiore nel riconoscimento e uccisione di alcuni tumori è NKG2D, una proteina di membrana di tipo II, che riconosce proteine inducibili da stress quali MICA/B o ULBP. Altri recettori attivatori includono 2B4 (specifico per CD48), NTB-A (che media interazioni omotipiche) e DNAM-1 (specifico per PVR, CD155, e Nectina-2, CD112) (5).

Analisi delle interazioni recettore-ligando nella lisi NK-mediata di blasti leucemici

Abbiamo analizzato un ampio pannello di cellule leucemiche, sia AML che ALL, appena isolate dal sangue periferico o midollare dei pazienti (6). All'analisi cito-

fluorimetrica, abbiamo spesso rilevato livelli più bassi delle molecole di HLA-classe I sulla superficie dei blasti leucemici, soprattutto tra le AML, rispetto alle cellule normali. È stata poi valutata l'espressione dei ligandi dei recettori attivatori. PVR e Nectina-2 sono risultati consistentemente espressi in AML, mentre queste molecole sono meno frequenti in ALL. Riguardo ai ligandi di NKG2D, MICA/B e ULBP sono o assenti o debolmente espressi. Nella maggioranza delle leucemie sia CD48 che NTB-A sono down-regolati rispetto alle cellule mononucleate normali del sangue periferico. Questi particolari pattern di espressione molecolare permettono spesso di distinguere fenotipicamente cellule leucemiche dalle cellule normali. Abbiamo quindi testato i blasti leucemici come target di citotossicità NK ed effettivamente la down-regolazione di molecole HLA-classe I e l'up-regolazione di ligandi dei recettori attivatori determina la suscettibilità alla lisi NK. In aggiunta, la grandezza della sottopopolazione NK alloreattiva (vedere paragrafo seguente per la sua caratterizzazione) correla con il grado di citotossicità contro le cellule leucemiche. In questo modo è possibile selezionare donatori più appropriati di cellule NK, sia per trapianto di cellule staminali emopoietiche (TCSE) sia per immunoterapia. Abbiamo anche valutato il ruolo relativo dei vari recettori attivatori NK nell'indurre la lisi delle leucemie. È risultato che il ruolo maggiore nell'indurre la lisi NK-mediata è esercitato da NKp46 e NKp30. Esiste poi una correlazione tra l'espressione in superficie di PVR e Nectina-2 su leucemie e un ruolo di DNAM-1 nell'indurre la loro lisi. Quindi queste molecole rappresentano importanti marcatori funzionali. Consistente con l'evidenza sporadica di ligandi di NKG2D sulle leucemie, questo recettore è molto raramente coinvolto nella loro lisi (6).

Definizione e caratterizzazione dell'alloreattività NK nel trapianto aploidentico

Nella cura di pazienti con leucemie ad alto rischio, il trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore aploidentico (aplo-TCSE), cioè da familiare che condivide con il paziente solo un alotipo HLA, rappresenta una valida alternativa qualora manchi un donatore HLA-compatibile. Rispetto a questi ultimi trapianti in cui si infonde midollo non manipolato, gli aplo-TCSE si basano su un più forte condizionamento pre-trapianto e sull'infusione di megadosi di cellule staminali deplezionate da cellule T, grazie a selezione positiva di cellule CD34⁺. Le cellule T vanno eliminate perchè possono essere alloreattive e causare gravi problemi di GvHD. Il donatore aploidentico può risultare NK alloreattivo qualora esprima nell'aplotipo HLA incompatibile un KIR-L mancante invece nel ricevente. In aggiunta, il donatore deve esprimere l'iKIR specifico per quel particolare KIR-L. L'alloreattività NK risulta quindi dal KIR/KIR-L mismatch in direzione GvH.

Nel contesto di aplo-TCSE, ci sono stati studi fondamentali da parte del gruppo di Perugia, che hanno dimostrato con dati clinici e sperimentali che questi trapianti avevano un decorso clinico più favorevole quando il donatore era NK alloreattivo. Infatti, la sopravvivenza era del 67% verso 18% mentre la recidiva del 3% verso

47% nei casi di AML trapiantati da donatore NK alloreattivo verso non-NK alloreattivo, rispettivamente (7). Le basi biologiche si fondano sul ruolo delle NK alloreattive di uccidere la leucemia (GvL) ma di non aggredire i tessuti (no GvHD), che invece i linfociti T alloreattivi possono causare. Inoltre, queste cellule NK promuovono il trapianto e prevengono GvHD grazie alla capacità di uccidere cellule presentanti l'antigene e bloccando quindi il priming delle cellule T (8).

Nel gruppo diretto da F. Locatelli (Ospedale Bambin Gesù, Roma) con cui collaboriamo, negli aplo-TCSE a pazienti leucemici in età pediatrica si è osservata una sopravvivenza del 73%, se donatore NK alloreattivo, contro 42%, se donatore non NK alloreattivo, per ALL, mentre 42% contro 22%, rispettivamente, per AML (9). Per studiare l'alloreattività NK occorrono diversi tipi di analisi: genetica, fenotipica e funzionale (Figura 1). Lo studio del KIR/KIR-L mismatch a livello genetico prevede l'analisi degli aplotipi HLA del donatore e ricevente e la relativa definizione dei KIR-L. Inoltre, il donatore viene tipizzato per i geni KIR, per conoscere l'intero repertorio di KIR presenti, in particolare valutando la presen-

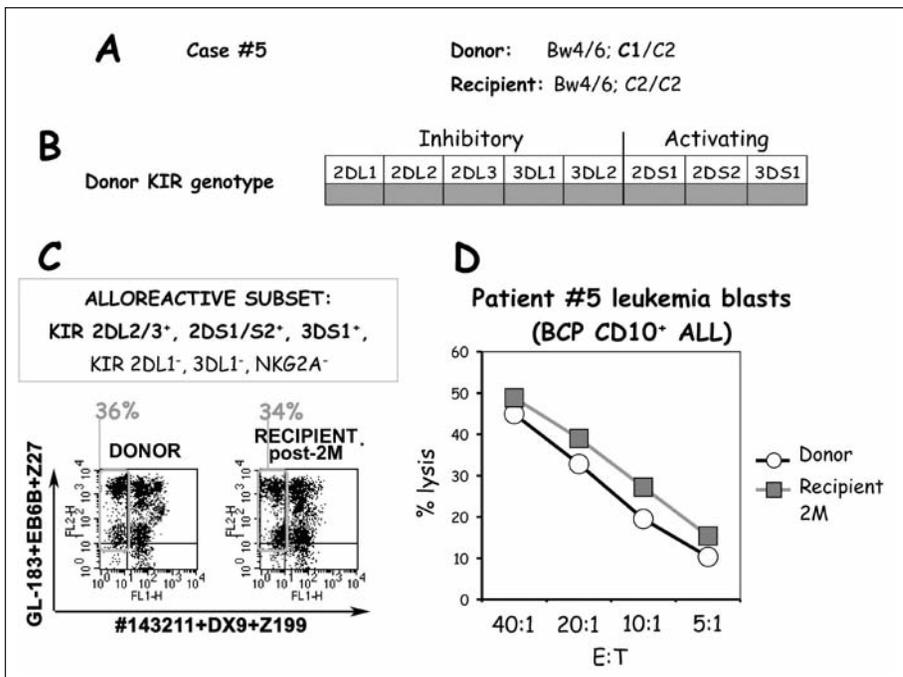


Fig. 1 - Caratterizzazione dell'alloreattività NK in aplo-TCSE. Il caso di trapianto #5 è esemplificativo del tipo di analisi genetiche, fenotipiche e funzionali necessarie per caratterizzare l'alloreattività NK del donatore verso il ricevente. A: identificazione dell'espressione dei KIR-L analizzando gli aplotipi HLA in cui si rivela un KIR-L mismatch, rappresentato da C1 che è presente nel donatore e assente nel ricevente. B: analisi del genotipo KIR del donatore che rivela l'espressione di tutti i geni KIR inibitori e attivatori più rappresentativi. C: con analisi citofluorimetrica in doppia fluorescenza è possibile determinare la grandezza della sottopopolazione alloreattiva nel repertorio NK del donatore, dimostrandone la ricostituzione nel ricevente anche precocemente (2 mesi) post-trapianto. D: attività citotossica delle cellule NK attivate derivate dal donatore e ricevente a 2 mesi post-trapianto contro i blasti leucemici del paziente stesso.

za dell'iKIR specifico per il KIR-L mismatch. Con analisi citofluorimetriche è possibile definire la grandezza della sottopopolazione alloreattiva, grazie all'opportuna combinazione di mAb anti-KIR, alcuni capaci anche di discriminare tra forme inibitorie e attivatorie dei KIR. Questo subset è costituito dalle cellule che esprimono esclusivamente iKIR che non riconoscono alcun KIR-L del paziente in aggiunta a eventuali aKIR. Test citotossici usando come target cellule leucemiche e/o B-EBV esprimenti gli stessi KIR-L del paziente rendono conto dell'attività funzionale (10).

Aplo-TCSE: analisi dell'alloreattività NK nei donatori e riceventi post-trapianto

Abbiamo analizzato casi di pazienti leucemici in età pediatrica che hanno ricevuto TCSE da donatore aploidentico NK alloreattivo, valutando il repertorio NK sia del donatore che del paziente dopo ricostituzione a vari tempi post-trapianto (10). Sono stati considerati casi con C1, C2 e Bw4 come KIR-L mismatch. In alcuni casi di mismatch per Bw4, abbiamo riscontrato l'assenza del gene *KIR3DL1* o l'allele *KIR3DL1*004*, che viene trattenuto nel reticolo endoplasmico e quindi non è espresso in superficie. In un solo caso di mismatch per C2, si è rivelata l'assenza del *KIR2DL1*. In questi casi si annulla l'alloreattività NK. Nel primo mese post-trapianto, le cellule che ripopolano il sangue periferico sono primariamente NK anche se sono tutte NKG2A positive e con pochi KIR. Nella maggioranza dei casi analizzati la grandezza del subset alloreattivo derivato dal donatore sembra essere conservato nel ricevente post-trapianto, compare intorno al secondo mese ed è persistente nel tempo (anche oltre un anno). Abbiamo anche dimostrato che la capacità di uccidere i blasti leucemici è mantenuta nel paziente post-trapianto (Figura 1). Questo dovrebbe significare che le cellule alloreattive sono state "licenziate" anche nel ricevente allogenico, consistente con l'ipotesi che le megadosi di cellule staminali infuse del donatore possano costituire il microambiente che determina l'educazione. Per quanto riguarda l'alloreattività verso target C2/C2 (i.e. mismatch per C1), l'alloreattività delle cellule NK che esprimono solo *KIR2DL2/3* può essere bassa perchè questi recettori riconoscono, pur se a bassa affinità, anche C2. In questi casi, la presenza di *KIR2DS1* nel genotipo del donatore può essere vantaggioso perchè *KIR2DS1* riconosce positivamente C2 e quindi rappresenta un ulteriore recettore attivatorio a supporto dell'alloreattività. Infine, possiamo affermare che esiste una correlazione positiva tra alloreattività NK e decorso clinico favorevole (9, 10). Dal momento che intercorre un intervallo di tempo di circa due mesi prima che si osservino in circolo cellule NK alloreattive, esistono nuovi approcci di aplo-TCSE, che prevedono l'infusione di PBSC depletate di cellule TCRalfa/beta e CD19, invece che arricchite in cellule CD34⁺. Le cellule che si recuperano con questa nuova procedura contengono: cellule staminali sia CD34⁺ che CD34⁻, cellule NK mature e linfociti T con TCRgamma/delta. I vantaggi consistono in una maggiore completezza del pool di cellule staminali e inserimento di cellule immunocompetenti con attività contro infezioni (NK e T gamma/delta) e contro leucemia (NK alloreattive).

Immunoterapia basata sulle cellule NK

È stato provato che la produzione di cellule NK umane clinical-grade è possibile, sicura e promettente (11, 12). I linfociti NK possono essere purificati clinical-grade con la tecnologia Miltenyi-Biotech e Clinimacs, con due possibili metodologie:

- a) deplezione di CD3 e arricchimento di CD56;
- b) deplezione di CD3 e CD19.

In queste purificazioni occorre che vengano eliminati i linfociti T, per evitare rischi di GvHD, e i linfociti B, per evitare malattie linfoproliferative B. Mentre nel primo tipo di separazione le NK sono estremamente pure, nella seconda rimangono i monociti che però non dovrebbero essere dannosi, anzi potrebbero essere di beneficio qualora i linfociti NK siano messi in coltura. Effettivamente, la coltura di linfociti NK in presenza di IL-2 e, ancor meglio, di IL-15, anche solo per pochi giorni, può incrementare notevolmente la capacità citotossica, come dimostrato da esperimenti di citotossicità sia contro linee tumorali sia contro blasti leucemici freschi. Questa coltura rappresenta però una modificazione maggiore, che sottosta a normative severe con necessità di protocolli validati, di locali GMP dove attuarli e autorizzazioni. Alternativamente, se si infondono NK appena purificate (resting) è possibile promuovere l'attivazione ed espansione *in vivo* iniettando IL-2 sottocute. In uno studio fondamentale del gruppo di Miller, le cellule NK aploidentiche trasferite adottivamente si espandevano *in vivo* solo se i pazienti erano preparati con un regime immunosoppressivo (alte dosi di ciclofosfamide e fludarabina), che causavano linfopenia e alte concentrazioni di IL-15 endogena (11). Le NK non hanno mai causato GvHD, confermando i risultati dei modelli murini e dei trapianti aploidentici umani. In aggiunta, 5 dei 19 pazienti AML con scarsa prognosi che sono stati trattati con immunoterapia NK hanno conseguito remissione completa. Più recentemente, è stata osservata l'insorgenza di Treg nel paziente che può limitare l'espansione delle NK.

Una terapia basata sulle NK dovrebbe beneficiare da una migliore conoscenza della biodistribuzione e "homing" delle cellule NK *in vivo*, l'identificazione dei ligandi per alcuni recettori attivatori, e i meccanismi immunosoppressivi e immunomodulatori NK-specifici. Ulteriori studi sul ruolo dell'educazione NK e KIR mismatch possono anche fornire strategie ottimali per l'impiego di cellule NK in terapie anti-tumorali. Recentemente, è stata messa a punto un'alternativa per manipolare il riconoscimento del "missing-self" NK-mediato, usando l'infusione di un anticorpo monoclonale umano specifico per i KIR in pazienti con tumore (13). Questi protocolli si stanno testando in trial clinici di fase II in pazienti con leucemia mieloide acuta e mieloma multiplo. È possibile anche prevedere la combinazione di trasferimento adottivo di cellule NK con anticorpi monoclonali terapeutici.

Bibliografia

1. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011; 331: 44-9.

2. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Receptors for HLA-class I molecules in human Natural Killer cells. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14: 619-48.
3. Anfossi N, André P, Guia S, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity.* 2006; 25: 331-342.
4. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Activating receptors and co-receptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 197-223.
5. Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol.* 2006; 18: 151-158.
6. Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoid leukemias. Evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD122). *Blood.* 2005; 105(5): 2066-2073.
7. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood.* 2007; 110: 433-40.
8. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002; 295: 2097-2100.
9. Moretta L, Locatelli F, Pende D, Marcenaro E, Mingari MC, Moretta A. Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2011; 117: 764-71.
10. Pende D, Marcenaro S, Falco M, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood.* 2009; 113: 3119-3129.
11. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-Mortari A, et al: Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood.* 2005; 105: 3051-3057.
12. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 329-39.
13. Romagné F, André P, Spee P, et al. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood.* 2009; 114: 2667-2677.

Vaccinoterapia antitumorale: a che punto siamo

Antonio Curti

Istituto di Ematologia e Oncologia Medica "L. & A. Seràgnoli", Università degli Studi di Bologna

Per vaccinazione si intende una procedura medica avente lo scopo di attivare, per lo più in via preventiva, una risposta immunitaria specifica nei confronti di agenti ritenuti nocivi per l'organismo. L'idea di utilizzare la risposta immunitaria per contrastare lo sviluppo di un tumore risale alla fine del XIX secolo e coincide con la dimostrazione dell'efficacia dei primi vaccini contro patogeni di natura microbica. Per molte malattie neoplastiche, tra cui quelle del sangue e del sistema linfemopoietico, la terapia basata sull'impiego di farmaci citotossici, sia a dosi standard che ad alte dosi con successiva reinfusione di cellule staminali autologhe od allogeniche, non è in grado di eliminare completamente la malattia se non in una minoranza di pazienti. Si pone, quindi, con forza la necessità di individuare quelle strategie - e tra queste un ruolo importante è rappresentato da quelle incentrate sulla modulazione della risposta immunitaria - capaci di agire sulla malattia minima residua nella prevenzione della ricaduta e quindi nella definitiva eradicazione della malattia.

Negli ultimi 15-20 anni la vaccinazione anti-tumorale ha vissuto una fase di rivisitazione alimentando un rinnovato interesse, soprattutto grazie all'identificazione di antigeni tumore-associati, che possono costituire un bersaglio verso il quale indirizzare la risposta immunitaria, nonché uno strumento per rendere obiettiva e misurabile la risposta immune evocata dal vaccino e alla migliore comprensione dei meccanismi biologici, cellulari e molecolari, che regolano lo sviluppo della risposta immune, nonché i meccanismi di tipo soppressorio che ne limitano l'efficacia. Su questo punto, appare fondamentale l'identificazione e la caratterizzazione delle cellule dendritiche, come principali attori nel processo di presentazione dell'antigene.

Molti degli antigeni tumorali identificati sono espressi anche in tessuti normali e sono pertanto antigeni tumore-associati piuttosto che tumore-specifici. Poiché, gran parte degli antigeni tumore-associati sono proteine endogene e quindi fanno parte del repertorio antigenico di qualunque altra cellula sana dell'organismo, nei confronti di molti antigeni tumorali è attivo un meccanismo di tolleranza, che li rende deboli antigeni di rigetto. Al contrario, gli antigeni che contengono epitopi che sono sfuggiti ai più comuni meccanismi di tolleranza, quali l'anergia e la delezione clonale (epitopi subdominanti o criptici), hanno più possibilità di atti-

vare una efficace risposta T-cellulare. Per questo, grande interesse viene posto nell'identificazione di epitopi immunogenici contenuti in proteine che sono il prodotto di geni di fusione coinvolti in modo specifico nel processo di trasformazione neoplastica.

Le cellule dendritiche rappresentano una popolazione estremamente eterogenea in termini morfologici, fenotipici e funzionali. Presentano un caratteristico aspetto citologico contraddistinto da numerose estroflessioni citoplasmatiche che aumentano la superficie di contatto con i linfociti. Rispetto ad altre *antigen presenting cells* (APC), quali i monociti, le cellule dendritiche sono più potenti nello stimolare una risposta T cellulare e sono le uniche APC capaci di attivare linfociti T naive. Il grado di maturità delle cellule dendritiche definisce caratteristiche fenotipiche e funzionali diverse. Le cellule dendritiche immature si localizzano nei tessuti periferici al di fuori degli organi linfatici e si caratterizzano per l'alta specializzazione nel catturare l'antigene e trasformarlo in peptidi attraverso un complicato meccanismo di processazione intracellulare. Le cellule dendritiche, dopo avere efficientemente internalizzato e processato l'antigene, acquistano capacità migratorie verso i linfonodi e vanno incontro ad un processo di maturazione, che le porta ad esprimere sulla propria superficie molecole di costimolazione e di adesione (cellule mature). In questo nuovo stato, le cellule dendritiche sono in grado di stimolare efficientemente i linfociti T che esprimono il recettore specifico per l'antigene e ne inducono attraverso una fase di espansione clonale la successiva specializzazione in cellule effettrici o cellule memoria.

La comprensione più approfondita dei meccanismi biologici che regolano la risposta immunitaria contro i tumori ha consentito di sviluppare una serie di strategie basate sull'induzione di una risposta immunitaria tumore-specifica. La conoscenza o meno degli antigeni tumorali nei confronti dei quali attivare la risposta immunitaria rappresenta un elemento discriminante nella scelta della tecnica di vaccinazione da adottare. Per questo, si distinguono vaccini cellulari, basati sull'impiego di cellule, ad esempio tumorali, delle quali non è noto il repertorio antigenico e vaccini antigene-specifici, rivolti contro uno o più antigeni. Questi ultimi possono essere vaccini peptidici, vaccini basati su virus e batteri ricombinanti, vaccini basati su DNA, vaccini basati su cellule dendritiche, caricate con l'antigene tumorale.

I recenti studi clinici di vaccinazione antitumorale possono essere divisi in due periodi, a partire dalla metà degli anni novanta e in particolare dalla migliore definizione del ruolo delle cellule dendritiche, con la possibilità di un loro utilizzo a scopo terapeutico. In particolare, possiamo considerare il periodo compreso tra il 1996 e il 2007, durante il quale gran parte degli studi spontanei, accademici, basati su strategie terapeutiche estremamente eterogenee e in categorie di pazienti affetti da tumore in fase molto avanzata, hanno dimostrato la prova di principio che la modulazione del sistema immunitario mediante un vaccino può determinare in alcuni casi una regressione del tumore, associata alla dimostrazione di una risposta immunitaria specifica. Questi studi non sono però riusciti a fornire informazioni sulla reale efficacia dei vaccini antitumorali nel migliorare la sopravvivenza dei pazienti e quindi non hanno fornito ai clinici la base per inserire la vac-

cinazione antitumorale nel *management* clinico dei pazienti. A partire dal 2007, una nuova stagione di studi clinici, spesso supportati e gestiti da aziende di biotecnologia e farmaceutiche, stanno producendo risultati nell'ambito di protocolli di fase II e III randomizzati. In particolare, tre studi (carcinoma della prostata, melanoma e linfoma non-Hodgkin) sembrano indicare un vantaggio della vaccinazione rispetto al braccio di controllo nell'incrementare la sopravvivenza globale e libera da malattia. Questi rappresentano una nuova generazione di studi, che potrebbero fornire la base per introdurre la vaccinoterapia nella gestione clinica dei pazienti. Ciò sarà possibile se le aziende farmaceutiche saranno disponibili a investire in questo campo, con nuovi vaccini e soprattutto nuovi adiuvanti.

**RISPOSTA IMMUNE
E INDUZIONE DI TOLLERANZA
IN TRAPIANTI ALLOGENICI**

Cellule staminali del cordone ombelicale e tolleranza immunologica

Laura Salvaneschi

Servizio di Immunoematologia e Centro Trasfusionale, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Il sangue del cordone ombelicale (CB) è una fonte di cellule staminali ematopoietiche primitive (CSE) e di cellule progenitrici, e come tale è utilizzato in alternativa al midollo osseo (MO) e ai progenitori ematopoietici del sangue periferico per un'efficace terapia trapiantologica in pazienti con malattie ematologiche e non ematologiche, maligne e non maligne (1). Il successo del trapianto di CSE è limitato in parte dalla *graft-versus-host disease* (GVHD), dal rigetto e dalla ritardata ricostituzione immunologica.

Come evidenziato nella Tab.1, il CB presenta lo svantaggio, rispetto alle altre sorgenti di CSE, di contenere un numero limitato di cellule nucleate totali e di cellule CD34⁺, tanto che nei pazienti adulti, per promuovere l'attecchimento del *graft*, sono state intraprese strategie trapiantologiche innovative, in particolare l'infusione di unità multiple di CB (2). Tuttavia l'incidenza della GVHD dopo trapianto di CB è più bassa rispetto a quella rilevata dopo infusione di MO. Ciò può essere messo in relazione alla natura tollerogena delle cellule presenti nel CB (linfociti T, cellule mononucleate (MNC) e cellule specificamente immunoregolatriche) (3).

Trapianto di CB e GvHD

La *GvHD* rappresenta la più importante causa di morbilità e mortalità dopo trapianto allogenico di CSE; il fattore di rischio maggiore è rappresentato dalla disparità HLA, quindi dalla risposta alloreattiva dei linfociti T del donatore nei confronti degli antigeni di istocompatibilità del ricevente. Il numero di antigeni HLA di classe I non compatibili correla con la comparsa di *GvHD* e con la cinetica del mancato attecchimento.

È stato dimostrato che incidenza di *GvHD* e sopravvivenza di pazienti trapiantati con CB da donatori non imparentati con fino a tre disparità HLA risultano sovrapponibili con quelli rilevati in pazienti trapiantati con CSE da donatori non imparentati perfettamente compatibili (6/6) (4).

Anche se il meccanismo che determina questo tipo di comportamento è ancora in molta parte sconosciuto, si ritiene che siano i linfociti T a essere responsabili della *GvHD*. I linfociti T del CB possiedono un elevato grado di tolleranza immu-

nologica nei confronti delle disparità HLA e minore alloreattività. I linfociti T del CB sono sicuramente coinvolti nella permissività verso trapianti parzialmente compatibili: infatti, la citotossicità dei linfociti T CD8+ del CB è significativamente inferiore a quella osservata nei donatori adulti di cellule staminali periferiche e midollari, suggerendone la correlazione con la minore incidenza di GvHD (5). È stato anche postulato che possano essere coinvolti un difetto di attivazione di trascrittori specifici e una marcata riduzione della produzione di citochine. Infine, è possibile che cellule immunoregolatorie, come i linfociti Tregs, possano svolgere un ruolo preminente nel controllo della GvHD.

Risposta Th1 delle cellule del CB

Le cellule del sistema immunitario presenti nel sangue cordonale sono caratterizzate da una spiccata “naiveté”. Infatti, le cellule CD45RA+ sono largamente rappresentate e danno conto della minore responsività immunologica ad alloantigeni.

- Rispetto ai linfociti T dell’adulto, quelli del CB producono meno Interferon- γ (IFN- γ), a causa di una ridotta espressione e per l’attivazione di specifici fattori di trascrizione; è dimostrato che l’espressione di T-bet, un fattore di trascrizione Th1-specifico, è bassa nel CB, mentre si mantiene l’espressione di GATA-3, fattore di trascrizione correlato con l’espressione delle citochine Th2 (6).
- Si osserva marcata riduzione:
 - dell’espressione di STAT 4 (a livello di mRNA e proteico), che contribuisce alla diminuita produzione di IFN- γ dopo stimolazione allogenica (7),
 - dell’espressione dei geni NFAT-associati e dei fattori di trascrizione correlati alla risposta Th1 (8, 9).
- Le cellule del CB hanno la potenzialità di secernere in quantità rilevante IL-10, un’importante citochina anti-infiammatoria, con conseguente riduzione dell’incidenza di GvHD (probabilmente attraverso la produzione di popolazioni di linfociti Treg).

Tab. 1 - Vantaggi e svantaggi: ricerca e identificazione di un donatore di M0/CB non imparentato.

	MO	CB
Tipizzazione A+B+DRB1 (DNA)16-56%	16-56%	50-80%
Tempo di ricerca (mediana)	3-6 mesi	<1 mese
Donatore identificato ma non disponibile	30%	<1%
Presenza di aplotipi rari	2%	29%
Principali fattori limitanti l’attecchimento	Compatibilità HLA	Dose cellulare
Facilità di organizzare l’infusione del graft	Difficile	Facile
Potenziale seconda infusione di CSE/DLI	Si	No
Potenziale - Trasmissione virale	Si	No
- Malattie congenite	Si	No
Rischio per il donatore	Si	No
Effetto GVL (linfocito T- dipendente)	Si	Si
Effetto GVL (NK-dipendente)	Raro	No ?
Presenza di linfociti T della memoria	Si	No

Ridotta attività delle cellule dendritiche di derivazione cordonale nella risposta alloreattiva T-dipendente

L'attività di presentazione dell'antigene delle cellule dendritiche (CD) del sangue placentare è ridotta, per effetto dell'immaturità cellulare. La dimostrazione del debole effetto di stimolazione sui linfociti T è evidenziabile in coltura mista linfocitaria.

Monociti del sangue periferico (CD14+) isolati dal sangue cordonale e sottoposti a stimolazione in vitro mostrano di essere meno suscettibili a una completa maturazione in CD, se confrontati con i monociti isolati da soggetti adulti. Sono inoltre caratterizzati da una capacità ridotta di produrre TNF- α e IL-12.

Le cellule mononucleate (MNC) del CB hanno una limitazione intrinseca nella differenziazione in CD mature, confermata dalla bassa espressione sulla superficie cellulare di HLA-DR, CD40, CD86 e CD83. Queste caratteristiche delle CD del CB possono causare un ritardo nell'attivazione dei linfociti T *naive*. La debole capacità di presentazione dell'antigene da parte delle CD del CB ai linfociti T alloreattivi può essere considerata un ulteriore importante fattore nel determinare la relativamente bassa incidenza di GVHD nei trapianti di CSE da CB (10).

Proprietà tollerogeniche delle cellule dendritiche del CB

Le CD immature esercitano attività immunosoppressiva attraverso l'induzione di una tolleranza antigene-specifica nei linfociti T, il conferimento di proprietà regolatorie ai linfociti T effettori ed l'espansione di cloni di linfociti Treg (CD25+). A ciò si aggiunge che il sangue cordonale è ricco di *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), che gioca un ruolo importante nel mantenere e nell'indurre CD immature tollerogeniche. Quindi, le DC sono caratterizzate non solo dalla perdita dell'attività di presentare l'antigene ma anche dalla capacità di indurre ed espandere i Treg (11).

Cellule immunomodulatorie

I linfociti T CD25+CD4+ sono chiamati Treg per le loro caratteristiche funzionali di cellule ad azione soppressoria della risposta immune. Uno dei marcatori specifici dei Treg è Foxp3, un fattore di trascrizione *helix-loop-helix*. Inoltre i Treg esprimono il CD25 e rappresentano il 5-10% delle cellule CD4+ del sangue periferico (12).

I Treg modulano la risposta immune attraverso una migrazione selettiva e accumulo in specifici tessuti, infatti esprimono la molecola CD62L (L-selectina) e il recettore chemochinico CCR7, cruciale per l'*homing* nei tessuti linfoidi secondari. I Treg esprimono anche i recettori chemochinici CCR4 e CCR8 che li guidano nelle sedi dei processi infiammatori per modulare l'attivazione T-linfocitaria. Questa funzione soppressiva dipende in parte dal contatto cellule-cellula. Si postula, infatti, che l'attività soppressiva dei Treg sia legata ad altre citochine non note, attive con modalità paracrina. Regolatore negativo dei Treg è il target della rapamicina nei mammiferi (mTOR). In vivo la somministrazione di rapamicina riduce la produzione di IL-6 e promuove l'attività dei Tregs, aumentando la

sopravvivenza dell'organo trapiantato in riceventi immunocompetenti di trapianto cardiaco. L'inibizione di mTOR rappresenta un potenziale approccio per il controllo della GvHD e migliorare la sopravvivenza degli organi trapiantati (13). Le proprietà dei Treg sono state a lungo descritte soprattutto nei topi. Oggi è noto che Foxp3 è espresso anche nell'uomo in linfociti T CD4+ attivati, anche se la sua espressione nelle cellule CD4+CD25+ non riflette completamente la capacità regolatoria di queste cellule.

Il fenotipo CD127 correla strettamente con l'espressione di FoxP3 nella popolazione CD4+CD25+; anche l'espressione di CD45RA permette di distinguere Treg dai linfociti T attivati CD4+. Tuttavia CD127 e CD45RA non identificano in modo assoluto nell'uomo i Treg. Questi nell'adulto sono identificati in larga misura (80% circa) come cellule CD45RO+CD4+CD25+CD27+.

I linfociti Treg sono stati identificati anche nel sangue del cordone ombelicale, dove sono presenti con elevata frequenza come cellule CD4+CD25^{bright}, un sottotipo poco rappresentato nell'adulto. I linfociti T CD4+CD25+ del CB sono caratterizzati da un'elevata espressione di Foxp3, suggestiva per una maggiore presenza di Treg rispetto all'adulto (14).

Nei topi è stato dimostrato l'effetto positivo indotto dai Treg sull'andamento della GvHD, mentre la loro rimozione dal *graft* accelererebbe la comparsa di GvHD nel ricevente. I tentativi di utilizzare i Treg in terapia, tuttavia, non hanno avuto esito altrettanto favorevole, a causa della difficoltà di isolare questa popolazione cellulare nell'uomo, in quanto non identificabile mediante la sola espressione di CD25. Poiché il numero di Treg isolati dal sangue del CB con metodi di selezione immunomagnetica consente di ottenere una quota esigua di cellule, è stata percorsa la via dell'espansione *ex vivo*. Nel modello murino, le cellule espanse mantengono la capacità soppressiva e incrementano la secrezione di TGF- β (15).

Cellule staminali mesenchimali (CSM)

Le cellule staminali mesenchimali sono caratterizzate da bassa immunogenicità e capacità immunosoppressiva, in quanto inibiscono la proliferazione dei linfociti T e la produzione di citochine. Grazie alla loro funzione regolatoria, sono coinvolte nel controllo della GVHD. Non esprimono le molecole MHC di classe II e molecole co-stimolatorie (B7 e CD40) necessarie per l'attivazione di linfociti T. Pertanto, non innescano risposte allogeniche *in vitro* e non sono rigettate rapidamente *in vivo*, anche se non è noto quanto a lungo si mantengano dopo trapianto e dove si insedino. È poco noto anche l'esatto meccanismo immunosoppressivo che mettono in atto. Sono anche in grado di indurre la generazione *de novo* di linfociti Treg antigene-specifici CD4+CD25+Foxp3+, capaci di sopprimere la risposta di linfociti T effettori.¹⁶ Sono state isolate da unità di sangue cordonale, dove sono presenti in numero basso e variabile da raccolta a raccolta. Sono state ottenute anche dal cordone ombelicale e dalla gelatina di Wharton, in numero più elevato che dal sangue cordonale. Tuttavia le CSM ottenute da questa sorgente, che esprimono i marcatori propri di questa popolazione cellulare, inclusi i recettori della matrice e dell'integrina, non presentano i marcatori di linea ematopoietica

e, pur essendo multipotenti e coltivabili in colture a lungo termine, hanno un profilo diverso dalle CSM del sangue cordonale, per espressione del profilo citochinico e per una più rilevante secrezione di G-CSF, GM-CSF, HGF, LIF, IL-1 α , IL-6, IL-8, e IL-11 (17).

Le CSM del CB mostrano in coltura un'elevata capacità proliferativa, maggiore di quella evidenziata per analoghe di cellule del sangue periferico e del midollo osseo, con ciò dimostrando una staminalità superiore.

Il potenziale impiego clinico delle CSM nell'uomo è stato proposto nel trattamento di malattie autoimmuni, quali l'encefalomielite sperimentale autoimmune ed alcune varietà di artrite, sulla base delle conoscenze attuali che caratterizzano queste cellule come dotate di attività immunosoppressiva, utile nella modulazione della GvHD e nell'attecchimento del trapianto (18).

Gli esperimenti sui modelli murini evidenziano infatti gli effetti benefici delle CSM sulla GvHD, ma non sono efficaci come trattamento profilattico e devono essere somministrate a più riprese, probabilmente perché il loro effetto è transitorio. I dati sperimentali sono a sostegno anche di un loro impiego futuro nelle malattie neurodegenerative.

Nell'uomo sono disponibili numerosi trial sull'uso di CSM nel trattamento della GvHD, ma i risultati non sono chiari ed univoci (19).

Cellule Natural killer (NK)

Le cellule NK costituiscono una linea di cellule linfoidi, diversa dai linfociti T e B, in grado di riconoscere cellule " anormali", quali cellule tumorali o cellule infettate da virus o sottoposte a "stress". Sono coinvolte attivamente nella risposta immuno-mediata che precede la risposta immune adattativa dei linfociti T e B, alla quale contribuiscono anche con la produzione di citochine e chemochine. Le cellule natural killer (NK) umane sono linfociti CD3-, CD16+, e/o CD56+. Sulla base dell'espressione di superficie di CD56 e CD16, le cellule NK si possono classificare in quattro sottopopolazioni, con funzioni distinte, che sono associate all'espressione di marcatori specifici, quali NKG2A, NKG2D, CD95. Questi sottotipi sono particolarmente abbondanti nel sangue cordonale rispetto al sangue midollare e si possono identificare anche dopo allotrapianto cordonale (20).

L'impatto delle cellule NK del donatore sui linfociti T alloreattivi nello sviluppo di GvHD è stato studiato in modelli murini: gli animali che ricevevano cellule NK in aggiunta ai linfociti T dimostravano una più lunga sopravvivenza, con diminuzione di GvHD rispetto al gruppo trattato con i soli linfociti T. È stato dimostrato che le cellule NK hanno un effetto citotossico diretto nei confronti dei linfociti T autoantigene-specifici e riconoscono e distruggono linfociti CD4+ e CD8+ singenici attivati da cellule presentanti l'antigene. Ciò conferma la funzione regolatoria delle cellule NK sulla alloreattività mediata dai linfociti T nella GvHD, mediante la riduzione della proliferazione e l'incremento dell'apoptosi dei linfociti T (21).

Il trasferimento di queste evidenze scientifiche alla prevenzione della GvHD nei pazienti trapiantati non è previsto a breve scadenza, in quanto rimangono da chia-

rire molti dubbi, in particolare quanto i linfociti T alloreattivi siano suscettibili alla lisi mediata dalle cellule NK CD56–CD16+.

La molecola HLA-G dall’impianto allo xeno-trapianto

Il rapporto materno-fetale si basa su un delicato equilibrio immunologico in cui la madre deve sia mantenere una normale immunocompetenza, sia mostrarsi tollerante nei confronti del feto che, essendo portatore di un corredo cromosomico per metà diverso, risulta potenzialmente immunogeno (22, 23).

Per evitare che i naturali meccanismi immunologici materni attacchino l’embrione semi-allogeneico, importanti variazioni avvengono a livello dell’interfaccia materno-fetale: il riassetto nell’utero delle popolazioni di cellule immunocompetenti, come le cellule Natural Killer (NK); la variazione dei *pathways* citochinici locali con cambio da risposta di tipo Th1 a risposta di tipo Th2; l’induzione dell’apoptosi nelle cellule immunocompetenti materne.

A livello del trofoblasto, la protezione del feto dal rigetto materno dipende anche dalla sottoespressione di molecole HLA classiche di classe I e II. Tuttavia, cellule che non esprimono molecole HLA possono andare incontro a citolisi mediata dalle cellule NK. La protezione del feto dall’attacco delle NK uterine (uNK) avviene tramite l’espressione di molecole HLA non classiche di classe Ib, quali HLA-G, -E, -F. In particolar modo, la molecola HLA-G è in grado sia di reprimere le funzioni citotossiche delle cellule uNK, sia di stimolare la produzione di citochine e fattori angiogenici che favoriscano l’impianto e la vascolarizzazione della placenta (24-26). La molecola HLA-G mostra caratteristiche che la rendono unica rispetto alle molecole HLA di classe I classiche. Essa mostra un basso livello di polimorfismo genomico, viene espressa fisiologicamente solo in alcuni tessuti (trofoblasto, cornea, timo) ed è prodotta in 7 isoforme tramite splicing alternativo di un unico trascritto primario. Le forme transmembrana sono: G1 (legata a b2m), G2, G3, G4. Le forme solubili sono: G5 (legata a b2m), G6, G7. Esiste inoltre una forma solubile detta G1 shed, che deriva dal taglio proteolitico della forma G1 transmembrana (27, 28).

La molecola HLA-G svolge multiple funzioni inibitorie attraverso il legami con recettori presenti sulla superficie di cellule effettrici del sistema immune (29). HLA-G lega:

1. KIR2DL4, con l’effetto di inibire la funzione citotossica delle cellule Natural Killer (NK) e, se internalizzato, di stimolare la produzione di fattori pro-angiogenici.
2. ILT2, con l’effetto di inibire la proliferazione delle cellule NK, dei linfociti CD8+ e dei linfociti CD4+, e inibire anche l’alloreattività dei linfociti CD4+.
3. ILT4, con l’effetto di inibire l’alloreattività dei linfociti CD4+ e, sulle cellule APC, di inibire la maturazione delle dendritic cells (DC).
4. CD8, con l’effetto di stimolare l’apoptosi delle cellule NK e dei linfociti CD8+;
5. CD160, con l’effetto di stimolare l’apoptosi delle cellule endoteliali.

Queste interazioni mostrano come la molecola HLA-G giochi un ruolo primario sia nell'immunità adattativa, sia in quella innata, nell'indurre tolleranza a livello del trofoblasto placentare.

Poiché il feto può essere considerato a tutti gli effetti un allotrapianto nell'utero materno, l'effetto tollerogenico indotto dalla molecola HLA-G è stato invocato anche a scopo curativo, in primis nei trapianti di organo solido.

Recenti studi hanno mostrato una correlazione diretta tra la presenza della molecola sHLA-G nel siero e nei tessuti biotipici di pazienti trapiantati di cuore e una diminuita incidenza di rigetto. La stessa correlazione, tra alti livelli di sHLA-G e minor incidenza di rigetto, è stata osservata nei trapianti di rene e rene/pancreas (30-32).

Infine, anche nei trapianti di cellule staminali emopoietiche si è osservato come alti livelli di sHLA-G pre-trapianto fossero associati a minor incidenza di Graft versus Host Disease acuta (aGvHD) (33).

Le caratteristiche della molecola HLA-G, ovvero il basso grado di polimorfismo genomico, la presenza di isoforme anche solubili, la funzione immunosoppressoria svolta come ligando di recettori inibitori presenti su linfociti T, cellule NK e cellule APC, hanno stimolato ricerche sul potenziale tollerogenico di HLA-G anche nel campo degli xeno-trapianti, ovvero trapianti di organi solidi da animali all'uomo. A tal riguardo, sono stati condotti studi pionieristici sullo xenotrapianto di fegato suino nell'uomo e il possibile utilizzo di HLA-G come induttore di tolleranza. Anche se la presenza di HLA-G negli organi per xeno-trapianto non può essere considerata la soluzione unica alle reazioni di rigetto, tuttavia suini transgenici per HLA-G potrebbero fornire organi con un minor potenziale di rigetto, soprattutto nei confronti delle risposte immunitaria mediata dai linfociti T.

Bibliografia

1. Broxmeyer HE, Srour EF, Hangoc G, et al. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 645-50.
2. Larghero J, Garcia J, Gluckman E. Sources and procurement of stem cells. In: Apperly J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T, eds. *EBMT Hematopoietic cell transplantation*. 5th edition. 2008; 112-27.
3. Kim Y-J, Broxmeyer HE. Immune regulatory cells in umbilical cord blood and their potential roles in transplantation tolerance. *Crit Rev Oncol/Hematol*. 2010; doi:10.1016/j.critrevonc. 2010.07.009.
4. Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2276-85.
5. Trenado A, Charlotte F, Fisson S, et al. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favour immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest*. 2003; 112: 1688-96.
6. Nitsche A, Zhang M, Clauss T, et al. Cytokine profiles of cord and adult blood

- leukocytes: differences in expression are due to differences in expression and activation of transcription factors. *BMC Immunol.* 2007; 8: 18.
7. Chen L, Cohen AC, Lewis DB. Impaired allogeneic activation and T-helper 1 differentiation of human cord blood naive CD4 T cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006; 12: 160-71.
 8. Kaminski BA, Kadereit S, Miller RE, et al. Reduced expression of NFAT-associated genes in UCB versus adult CD4+ T lymphocytes during primary stimulation. *Blood.* 2003; 102: 4608-17.
 9. Yi T, Chen Y, Wang L, et al. Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood.* 2009; 114: 3101-12.
 10. Chunduri S, Mahmud D, Abbasian J, et al. Cord blood nucleated cells induce delayed T cell alloreactivity. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008; 14: 872-9.
 11. Steinbrink K, Mahnke K, Grabbe S, et al. Myeloid dendritic cell: from sentinel of immunity to key player of peripheral tolerance? *Human Immunol.* 2009; 70: 289-93.
 12. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005; 22: 329-41.
 13. Raimondi G, Sumpter TL, Matta BM, et al. Mammalian target of rapamycin inhibition and alloantigen-specific regulatory T cells synergize to promote long-term graft survival in immunocompetent recipients. *J Immunol.* 2010; 184: 624-36.
 14. Lee C-C, Lin S-J, Cheng P-J, et al. The regulatory function of umbilical cord blood CD4+CD25+ T cells stimulated with anti-CD3/anti-CD28 and exogenous interleukin(IL)-2 or IL-15. *Pediatric Allergy and Immunology.* 2009; 20: 624-32.
 15. Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA, et al. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity.* 2009; 31: 772-86.
 16. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 2008; 2: 313-9.
 17. Schugar RC, Chirieleison SM, Wescoe KE, et al. High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *J Biomed Biotechnol.* Volume 2009; doi:10.1155/2009/789526.
 18. Djouad F, Fritz V, Apparailly F, et al. Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 1595-603.
 19. Von Bonin M, Stolzel F, Goedecke A, et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant* 2008; 43: 245-51.
 20. Fan YY, Yang BY, Wu CY. Phenotypic and functional heterogeneity of natural killer cells from umbilical cord blood mononuclear cells. *Immunol Invest* 2008; 37: 79-96.

21. Fan YY, Yang BY, Wu CY. Phenotypic and functional heterogeneity of natural killer cells from umbilical cord blood mononuclear cells. *Immunol Invest* 2008; 37: 79-96.
22. Kammerer U, et al. Immunology of human endometrium. *Immunobiology*. 2004; 209: 569-74.
23. Billingham RE et al. "Actively acquired tolerance" of foreign cells. *Nature*. 1953; 172: 603-6.
24. Hoskin DW, et al. Specific maternal anti-fetal lymphoproliferative responses and their regulation by natural immunosuppressive factors. *Clin Exp Immunol* 1989; 76: 262-7.
25. Sacks G, et al. An innate view of human pregnancy. *Immunol Today*. 1999; 20: 114-8.
26. Petraglia F, et al. Peptide signalling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocr Rev*. 1996; 17: 156-86.
27. Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update*. 2006; 12: 209-32.
28. Sheshgiri R, et al. Myocardial HLA-G reliably indicates a low risk of acute cellular rejection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2008; 27 (5): 522-7.
29. Lila N, et al. Soluble human leukocyte antigen-G: a new strategy for monitoring acute and chronic rejections after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2007; 26 (4): 421-2.
30. Luque J, et al. sHLA-G levels in the monitoring of immunosuppressive therapy and rejection following heart transplantation. *Transpl Immunol*. 2006; 17 (1): 70-3.
31. Crispim JC, et al. Human leukocyte antigen-G expression after kidney transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. 2008; 18 (4): 361-7.
32. Rebmann V, et al. Soluble total human leukocyte antigen class I and human leukocyte antigen-G molecules in kidney and kidney/pancreas transplantation. *Hum Immunol*. 2009; 70 (12): 995-9.
33. Le Maux A, et al. Soluble human leukocyte antigen-G molecules in peripheral blood haematopoietic stem cell transplantation: a specific role to prevent acute graft-versus-host disease and a link with regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 2008; 152 (1): 50-6.

Tolleranza al trapianto: ci siamo negli animali, a quando nell'uomo?

Giuseppe Remuzzi

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Centro Anna Maria Astori,
Parco Scientifico Tecnologico Kilometro Rosso, Bergamo

La tolleranza al trapianto è una condizione ormai facilmente raggiungibile nei modelli animali ed il successo di ognuna di queste strategie è riconducibile all'espansione ed all'attivazione delle cellule T regolatrici, cellule T CD4⁺ che esprimono alti livelli di CD25 e di Foxp3.

Nonostante questi studi abbiano contribuito notevolmente alla comprensione dei meccanismi di sviluppo, funzione ed efficacia terapeutica delle cellule T regolatrici, la rilevanza di queste cellule nel trapianto in clinica rimane per il momento oscura (1).

Gli ultimi studi in pazienti con trapianto di rene suggeriscono che la presenza di cellule T regolatrici nell'organo trapiantato non correla con una migliore funzione renale, anzi paradossalmente potrebbe predirne il peggioramento (2).

Questo risultato sottolinea come sia difficile traslare nell'uomo le strategie che si rivelano efficaci nell'animale, conseguenza probabile della maggiore complessità del sistema immunitario umano.

Le barriere all'induzione della tolleranza in clinica sono rappresentate principalmente dalle cellule T memoria, dall'immunità eterologa e dalla proliferazione omeostatica delle cellule memoria che segue alla linfopenia indotta dalle terapie d'induzione correntemente impiegate (3).

Inoltre la condizione infiammatoria che si sviluppa in seguito all'ischemia/riperfusion e la concomitante presenza dei farmaci immunosoppressori sono entrambe situazioni che potrebbero ostacolare l'induzione della tolleranza nell'uomo (4).

Negli ultimi anni grande interesse è scaturito dalle cellule staminali mesenchimali. Le MSC posseggono capacità immunomodulatorie, sono in grado di inibire le cellule T memoria e di espandere cellule regolatrici e inducono tolleranza in modelli sperimentali di trapianto d'organo solido (5).

Questi risultati hanno posto basi solide per l'utilizzo di MSC come nuova terapia cellulare nella clinica del trapianto e sono in corso i primi studi clinici (6).

Bibliografia

1. Casiraghi F, et al. *J Nephrol*. 2010; 23: 263-270.
2. Bunnag S, et al. *Am J Transpl* 2008; 8: 1423-1433.
3. Ruggenti P, et al. *Transplantation* 2007; 84: 956-964.
4. Valujskikh A, et al. *J Am Soc Nephrol* 227; 18: 2252-2261.
5. Zhou X, et al. *Nat Immunol* 2009; 10: 1000-1008.
6. La Rosa DF. *J Immunol* 2007; 178: 7503-7509.
7. Casiraghi F, et al. *J Immunol* 2008; 181: 3933-3946.
8. Perico N, et al. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010; Oct 7 Epub ahead of print.

