

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

DOTTORATO in Embriologia Medica, Patologia ed Ematologia

Sperimentale. Ciclo XXIII.

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE - SEZIONE DI PATOLOGIA

GENERALE

**Ruolo dell' Inotuzumab Ozogamicin (CMC-544)
nell'induzione dell'apoptosi in cellule CD22-positive di
patologie linfoproliferative**

FIDILIO ANNAMARIA

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Alfredo Ferro

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Manzella Livia

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

INDICE

INTRODUZIONE	4
EMOPOIESI E LEUCEMIA	4
DIAGNOSI E TERAPIA DELLA LEUCEMIA	8
TERAPIA MIRATA O TARGETED THERAPY	9
CD22	12
INOTUZUMAB OZOGAMICINA (CMC-544)	14
<u>MATERIALI E METODI</u>	<u>17</u>
LINEE CELLULARI E COLTURE PRIMARIE	17
TRATTAMENTI CON GLI IMMUNOCONIUGATI E CON GLI INIBITORI	18
IMMUNOBLOTTING	20
CITOFLUORIMETRIA PER L'ANALISI DELLA MORTE CELLULARE CON FITC-ANNESSINA V E DEL CICLO CELLULARE CON PROPIDIO IODURO	21
VETTORE LENTIVIRALE, CLONAGGIO E TRASDUZIONE	22
ESTRAZIONE DEI LINFOCITI DA SANGUE PERIFERICO	23
<u>SCOPO DEL LAVORO</u>	<u>24</u>
<u>RISULTATI</u>	<u>25</u>
LA CONCENTRAZIONE IC₅₀ DEL CMC-544 INDUCE MORTE PER APOPTOSI NELLA MAGGIOR PARTE DELLE LINEE CELLULARI IMMORTALIZZATE DI LINFOMA A CELLULE B CD22-POSITIVE	25
LA CONCENTRAZIONE IC₅₀ DEL CMC-544 INDUCE ARRESTO IN FASE G₂/M DEL CICLO CELLULARE NELLE LINEE IMMORTALIZZATE DI LINFOMA A CELLULE B CD22-POSITIVE	30
CMC-544, ARRESTO IN FASE G₂/M E P53: UNA QUESTIONE DI VITA E DI MORTE	32
IL CMC-544 GENERA UN ARRESTO IN FASE G₂/M CHE RICHIEDE ATM/CHK2 E L'INIBIZIONE DELL'ATTIVITÀ CATALITICA DI CHK2 INDUCE MORTE IN LINEE CELLULARI DI LINFOMA CD22-POSITIVE	35
L'INIBIZIONE TARDIVA DELLA PROTEINA CHK2 INDUCE MORTE SOLO IN LINEE CELLULARI CHE ESPRIMONO P53 WILD TYPE	40

IL CMC-544 NON È EFFICACE SULLE LINEE CELLULARI DI LINFOMA CD22-POSITIVE CHE PRESENTANO MUTAZIONI NELLA PROTEINA P53	44
L'ESPRESSIONE ECTOPICA DI P53 WILD TYPE RIPRISTINA L'EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO DEL CMC-544 IN LINEE CELLULARI DI LINFOMA CD22-POSITIVE CHE PRESENTANO MUTAZIONI NELLA PROTEINA P53	50
EFFETTO CITOTOSSICO DEL CMC-544 SU LINEE PRIMARIE DI CAMPIONI SANI E DI PAZIENTI AFFETTI DA LINFOMA A CELLULE B CD22-POSITIVE	53
<u>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</u>	56
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	58

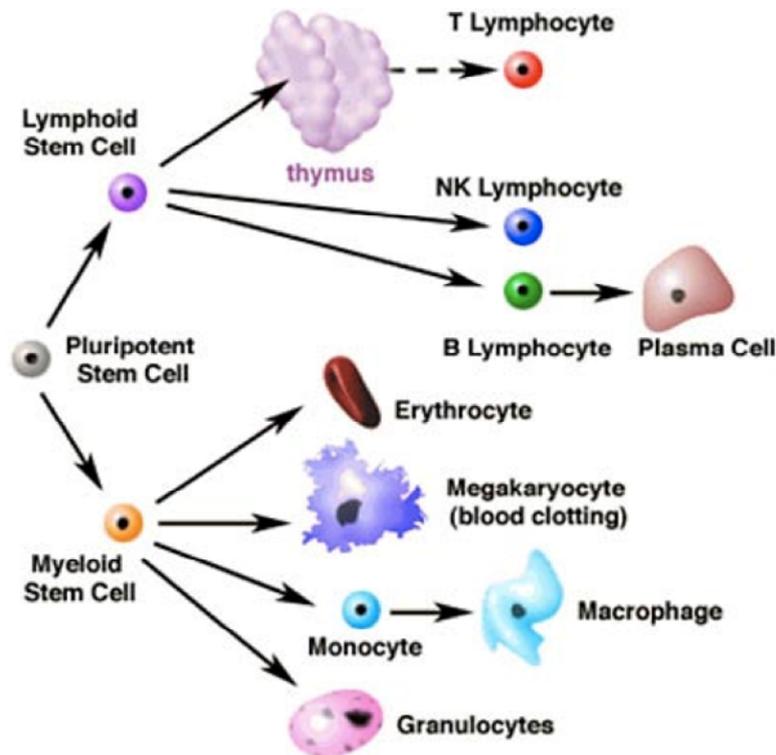
Introduzione.

Emopoiesi e Leucemia.

Il termine Leucemia deriva dal greco *λευκός* “bianco” e *αίμα* “sangue”, letteralmente “sangue bianco”, ed è utilizzato per indicare emopatie maligne caratterizzate dalla proliferazione neoplastica di una cellula staminale emopoietica.

L’Emopoiesi è il processo mediante il quale le cellule staminali emopoietiche che risiedono nel midollo osseo e negli organi linfatici secondari, (milza, timo e linfonodi) danno origine alle linee cellulari del sangue. Le cellule ematiche si dividono in:

- globuli rossi (o eritrociti), elementi cellulari anucleati con la funzione di trasportare l’ossigeno;
- globuli bianchi (o leucociti), distinguibili in granulociti (neutrofilo, basofilo ed eosinofilo) e cellule mononucleate (macrofagi e linfociti) che hanno il compito di difendere l'organismo dagli attacchi di agenti patogeni quali batteri o virus;
- piastrine (o trombociti), che svolgono un ruolo essenziale nel processo di coagulazione del sangue.



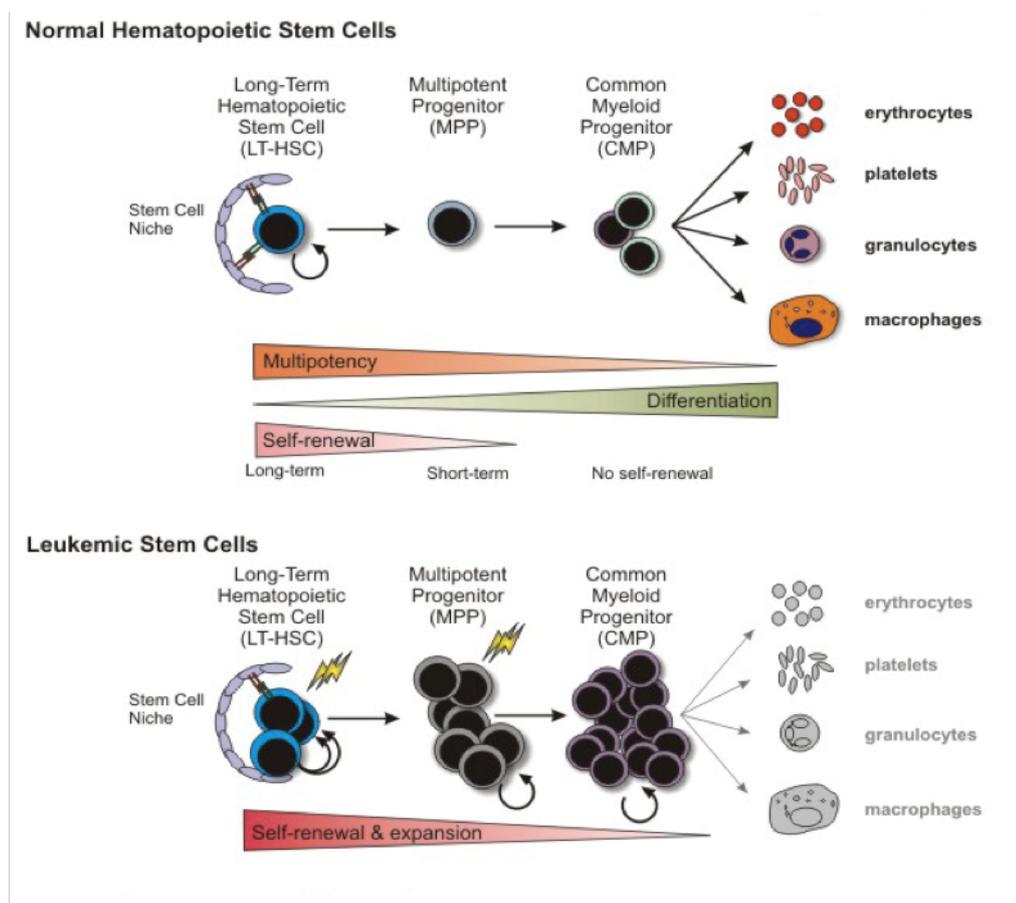
1. Emopoiesi: Formazione e differenziamento delle diverse linee cellulari del sangue a partire dalla cellula staminale.

A seconda della linea cellulare verso cui si evolve il clone leucemico, si parla di leucemia mieloide (ML) o di leucemia linfoide (LL).

Un'altra classificazione della leucemia si basa sul grado di differenziazione delle cellule leucemiche e sul decorso più o meno rapido della malattia.

Si parla, infatti, di leucemia acuta quando le cellule neoplastiche sono immature o poco differenziate. In questo caso, la velocità di proliferazione del clone leucemico è molto alta e la progressione della malattia rapida.

Si parla, invece, di leucemia cronica quando le cellule neoplastiche sono ben differenziate e morfologicamente simili alle corrispondenti cellule normali. In questo caso, il decorso della malattia è più lento anche se, con il tempo, le cellule maligne diventano aggressive e aumentano progressivamente di numero.



2. Autorinnovoamento e differenziazione delle cellule staminali normali e leucemiche

E' quindi possibile distinguere quattro tipi di leucemia: **la leucemia linfoblastica acuta (LLA)**, **la leucemia linfocitica cronica (LLC)**, **la leucemia mieloide acuta (LMA)** e **la leucemia mieloide cronica (LMC)**.

Il quadro clinico della leucemia è essenzialmente attribuibile all'invasione del midollo da parte del clone neoplastico e alla conseguente soppressione dell'espansione delle cellule emopoietiche normali.

Il paziente affetto da leucemia può sviluppare astenia, anemia, facile affaticabilità, pallore cutaneo, dispnea (a causa del ridotto numero di globuli rossi), palpitazioni (da anemia), rigonfiamento dei linfonodi (i più esposti sotto l'ascella ed in sede sovra e sottoclaveare), disturbi addominali, anoressia, sensazione di precoce riempimento gastrico, dolori al fianco sinistro causati da splenomegalia, febbre, sudorazioni eccessive specialmente notturne, calo ponderale, dolori ossei o muscolari e predisposizione all'emorragia (per ridotta produzione di piastrine).

In assenza di opportuni presidi terapeutici, la leucemia acuta ha una prognosi rapidamente infausta, ma la chemioterapia e l'eventuale trapianto di midollo osseo hanno migliorato le prospettive di sopravvivenza di questi pazienti.

La leucemia cronica presenta invece quadri molto eterogenei che oscillano dall'indolenza di alcune varianti di LLC alla estrema aggressività delle crisi blastiche della LMC.

La leucemia linfocitica cronica (LLC) a cellule B è un disturbo emopoietico clonale, caratterizzato dalla proliferazione e dall'accumulo di linfociti. E' la forma di leucemia più comune nel Nord America ed in Europa.

Diagnosi e terapia della leucemia.

La diagnosi di leucemia può essere effettuata rilevando alterazioni in alcuni degli esami sotto indicati:

- Esame emocromocitometrico completo (esame del sangue: numero dei globuli rossi, globuli bianchi e piastrine, livello di Hb);
- Striscio di sangue periferico (esame al microscopio di campione di sangue per accertare presenza di blasti);
- analisi citogenetica (studio dei cromosomi dei blasti presenti nel midollo osseo);
- biologia molecolare qualitativa per verificare la presenza di alterazioni genetiche specificamente associate a queste patologie;
- prelievo di midollo osseo;
- analisi immunofenotipica (tramite citometria a flusso delle cellule presenti in un campione di sangue o midollo osseo allo scopo di identificarle sulla base di specifici antigeni di superficie).

L'approccio terapeutico nel trattamento delle patologie leucemiche dipende dallo stadio e dall'attività della malattia.

Il trattamento di scelta è la chemioterapia eventualmente associata alla radioterapia. I pazienti giovani con donatore compatibile possono essere eventualmente indirizzati al trapianto allo genico di midollo osseo.

Terapia mirata o targeted therapy

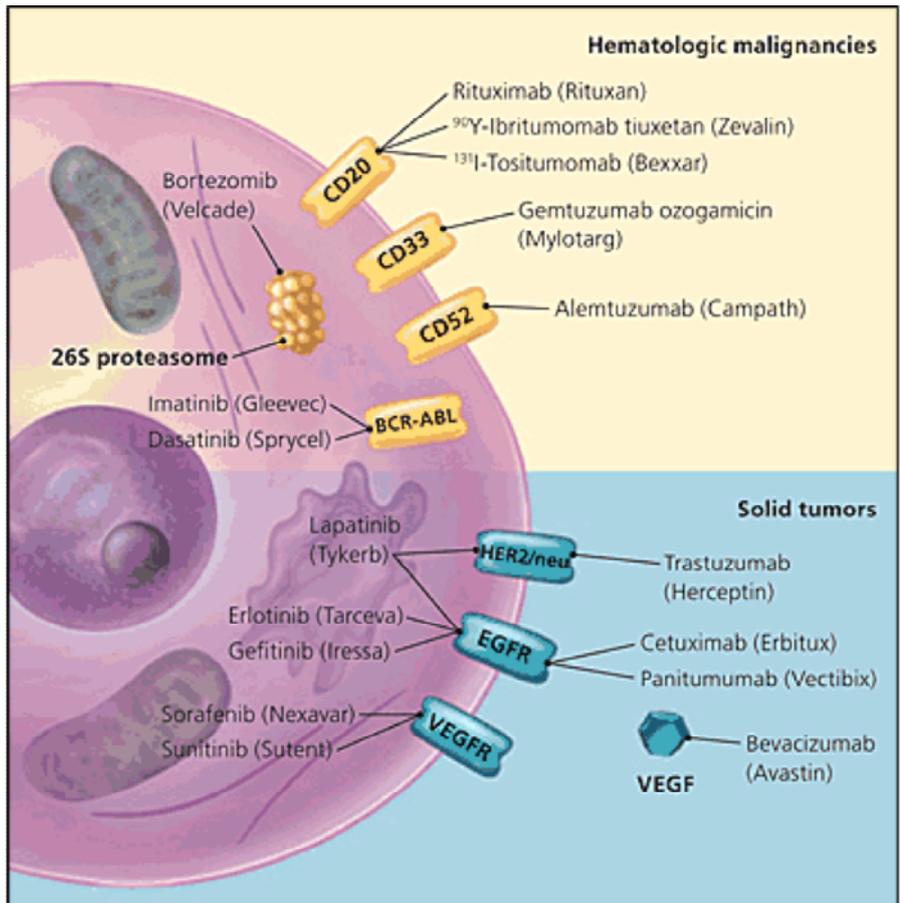
Nuovi approcci sperimentali hanno migliorato le conoscenze riguardanti i meccanismi eziopatologici alla base di molte neoplasie e i costanti progressi nell'ambito della genetica e delle bioingegnerie hanno permesso, il “disegno” di farmaci selettivi “mirati” contro le cellule neoplastiche. La terapia mirata (o targeted therapy) è un approccio farmacologico che blocca la crescita delle cellule neoplastiche bloccando il funzionamento di molecole bersaglio necessarie per la carcinogenesi e la crescita tumorale. L'impiego di anticorpi monoclonali per il riconoscimento di bersagli prevalentemente o esclusivamente espressi dalle cellule neoplastiche ha inaugurato l'era delle terapie molecolari mirate. Successivamente, l'impiego di tecniche di ingegneria genetica ha consentito di generare anticorpi coniugati con tossine naturali e/o sintetiche che possono così essere veicolate selettivamente contro le cellule tumorali.

Pregresse evidenze citogenetiche e molecolari hanno evidenziato la comparsa di marker B-cellulari, CD19, CD20, CD22, CD23 e CD5 nel linfoma diffuso a grandi cellule B ed in diverse varianti di LLC. Questi marcatori, in condizioni normali, sono praticamente assenti sui linfociti B. Per tale motivo si è pensato di sfruttarne l'espressione impropria da parte delle cellule tumorali per impiegarli come bersagli per una terapia mirata.

Una classificazione ampiamente accettata in ambito internazionale prevede la definizione di “*immunotossine*” per quei complessi nati dalla fusione della tossina con un anticorpo o una frazione di esso.

Negli ultimi quindici anni numerosi studi clinici sono esitati nell’approvazione dei seguenti anticorpi monoclonali per la terapia di varie forme di neoplasie onco-ematologiche:

- Alemtuzumab (o Campath): il bersaglio è il CD52 e l’anticorpo è impiegato nella terapia della CLL.
- Gemtuzumab Ozogamicin (o Mylotarg): il bersaglio è il CD33 e l’anticorpo è impiegato nella terapia della AML.
- Rituximab (o Rituxan): il bersaglio è il CD20 e l’anticorpo è impiegato nella terapia del Linfoma non-Hodgkin (N-HL) .
- Trastuzumab (o Herceptin): il bersaglio è ErbB2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2). L’anticorpo è impiegato nella terapia del cancro al seno.
- Bevacizumab (o Avastin) : il bersaglio è VEGF (Vascular Epidermal Growth Factor) e l’anticorpo è impiegato nella terapia del carcinoma metastatico del colon e del retto.

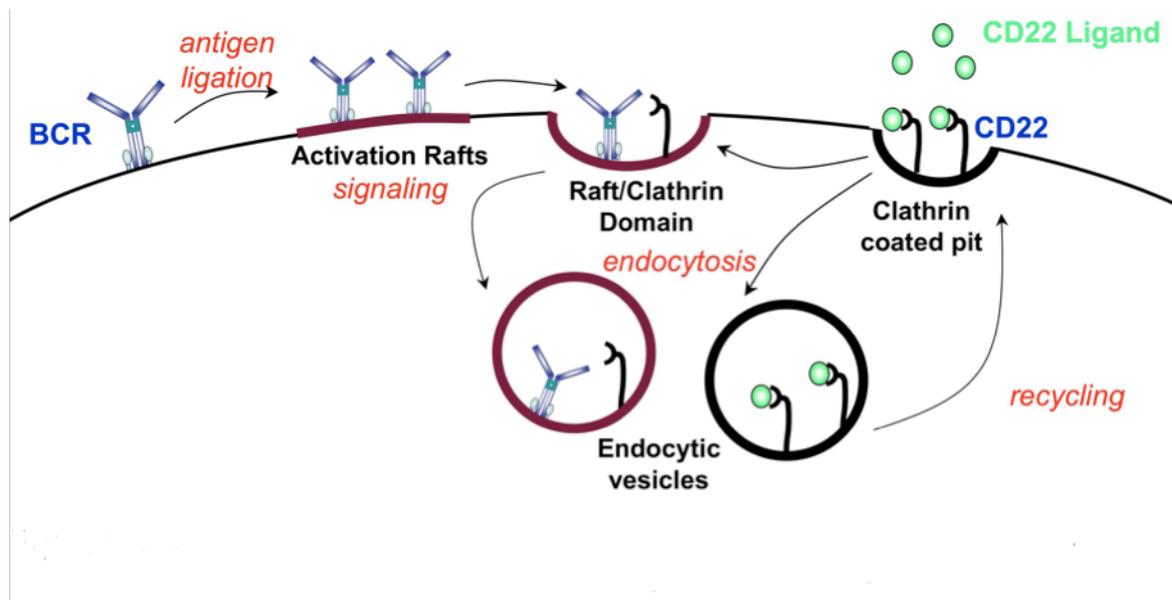


3. Terapia mirata contro il cancro . Meccanismo d'azione di alcuni anticorpi monoclonali e di piccole molecole.

CD22

L'antigene di superficie CD22 è un corecettore, con attività inibitoria, del recettore presente sulle cellule B (BCR, *B-Cell Receptor*) e modula la risposta del recettore agli stimoli microambientali. In questo modo viene garantita un'adeguata risposta umorale contro i patogeni, evitando reazioni autoimmuni.

La capacità di modulare il segnale di BCR è garantito dall'interazione tra il dominio extracellulare di BCR ed il suo ligando.



4. Interazione tra il recettore delle cellule B (*BCR B Cell Receptor*) ed il CD22 (Siglec-2)

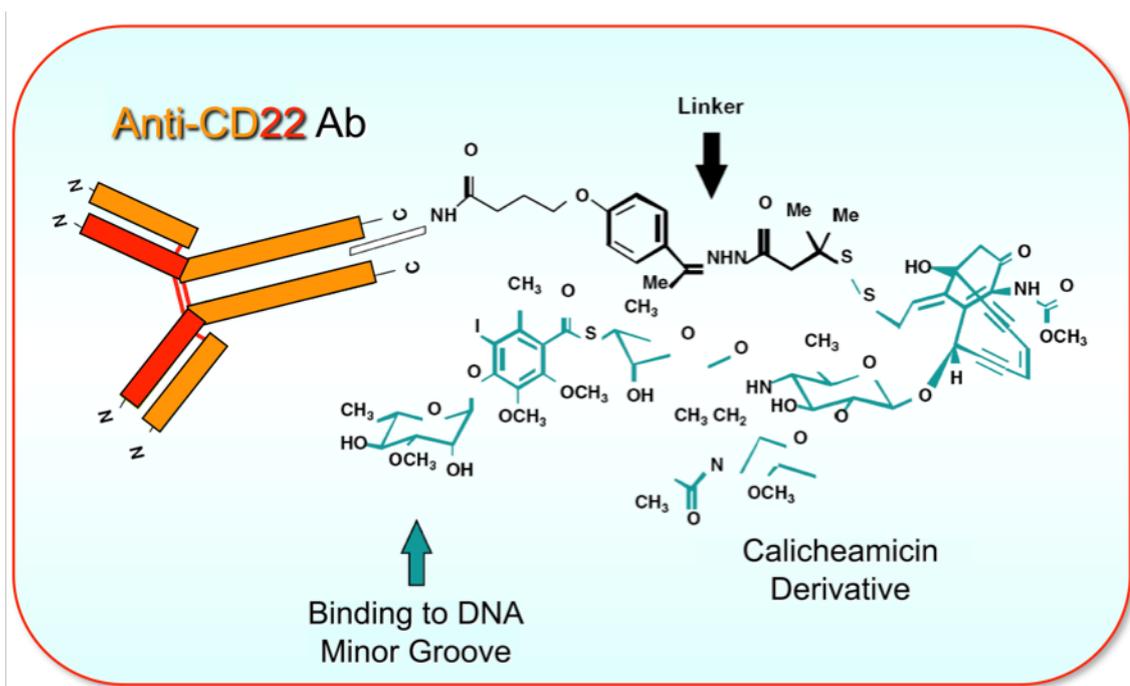
Il CD22 è una proteina di membrana di tipo I, con un peso molecolare di 140kD; è espresso a bassi livelli sulle cellule B immature, mentre è presente sulla membrana plasmatica delle cellule B mature (1, 2, 3).

La porzione extracellulare del CD22 è composta da sette domini di immunoglobuline e nella maggior parte dei casi, la parte distale è un'immunoglobulina V, responsabile del legame con l'acido sialico in posizione 2,6 del ligando. Infatti, in questo dominio, due residui di Arginina (R130 ed R137 nel topo) sono necessari per garantire il legame. Dopo l'interazione con il ligando, il CD22 ad esso associato, viene rapidamente fosforilato con attivazione dei segnali di trasduzione del segnale di BCR.

Il CD22 è anche coinvolto nel processo di localizzazione delle cellule B nei linfonodi tramite l'attivazione delle tirosino-chinasi della famiglia Src.

Inotuzumab Ozogamicina (CMC-544)

Nel nostro progetto di ricerca abbiamo valutato il ruolo dell' Inotuzumab Ozogamicina (CMC-544) nell'induzione dell'apoptosi in cellule CD22- positive di patologie linfoproliferative.



5. Struttura molecolare del CMC-544. La calicheamicina è legata, mediante una molecola di acido n-butanoico, stabile a pH fisiologico, all'anticorpo CD22.

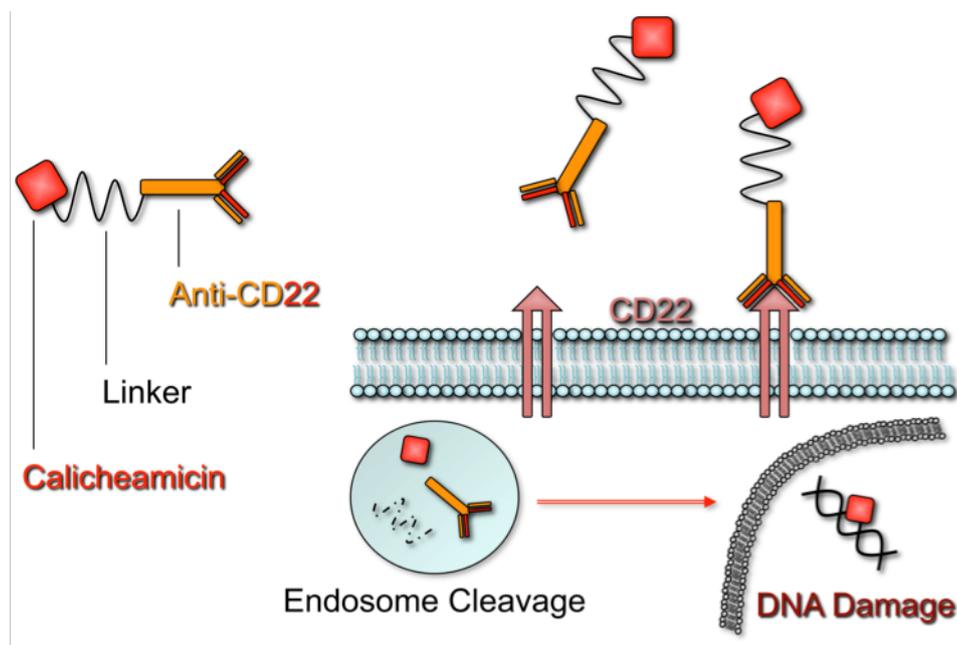
Il CMC-544 è un farmaco prodotto dall'azienda farmaceutica Wyeth ed è sintetizzato legando la tossina calichemicina, , con un anticorpo specifico per la cellule leucemiche.

La calichemicina è stata scoperta nel 1981 da un ricercatore che prelevò uno strato (il “caliche”) di argilla e dall'analisi di questo campione di terra furono isolati dei batteri (*Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis*) che producevano questa tossina, una sostanza in grado d'uccidere anche l'organismo da cui veniva prodotta, generando punti di rottura della doppia elica di DNA. Data l'elevata tossicità della calichemicina, è risultato subito evidente che questa molecola non poteva essere direttamente somministrata al paziente malato di cancro. E' stato quindi, studiato un metodo per legare la molecola ad un anticorpo e stabilizzarla. Per il caratteristico rilascio selettivo nelle cellule neoplastiche, l'uso di immunotossine garantisce una bassa incidenza di effetti collaterali tipici della chemioterapia (4), come perdita di capelli e mucositi..

Il CMC-544 è un immunoconiugato citotossico della calicheamicina, diretto contro il CD22. L'anticorpo è coniugato alla calicheamicina

mediante un linker di acido n-butanoico, che rende stabile il composto a pH fisiologico.

Dopo il legame con il corrispondente recettore di membrana, il composto viene internalizzato nella cellula e trasferito nei lisosomi, all'interno dei quali il pH acido e l'azione del glutatione riducono la calicheamicina in radicale 1-4-diidrossibenzene (specie reattiva della calicheamicina). Quest'ultimo, quindi, si posiziona sul solco minore del DNA causando ossidazione del deossiribosio ed una cascata di eventi che esitano nella rottura in siti specifici e/o di una specifica conformazione del doppio filamento (5).



6. Legame del CMC-544, internalizzazione ed attivazione della calicheamicina all'interno delle cellule bersaglio

Materiali e metodi.

Linee cellulari e colture primarie.

Le linee cellulari immortalizzate BL-2, RAJI, NAMALWA, RAMOS (derivate da pazienti con Linfoma di Burkitt) ed HL-60 (derivata da un paziente con Leucemia Mieloide Acuta) sono state coltivate, a 37 °C con il 5% di CO₂, in RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO), mentre le SUP-B15 (derivate da un paziente con Leucemia a precursori linfoidi B) sono state cresciute in Mc Coy 5A (Sigma). Ai terreni di coltura sono stati aggiunti il 10% (RAJI e NAMALWA ed HL-60) ed il 20% (BL-2, RAMOS e SUP-B15) di FBS (Fetal Bovine Serum) (Cambrex, East Rutherford, NJ), 100 U/mL di penicillina, 100 µg/mL di streptomicina e 4mmol/L di glutammina (Sigma).

Le cellule sono state sottoposte ad analisi citofluorimetrica per misurare la percentuale dell'antigene di superficie CD22 e CD33, usando i rispettivi anticorpi, producendo i seguenti risultati:

BL-2	CD22 92% positivo	CD33 assente
RAJI	CD22 75% positivo	CD33 assente
NAMALWA	CD22 95% positivo	CD33 assente
RAMOS	CD22 98% positivo	CD33 assente
SUP-B15	CD22 85% positivo	CD33 assente
HL-60	CD22 assente	CD33 94% positivo

Le linee primarie umane (normali o neoplastiche) sono state ottenute dal sangue periferico mediante Ficoll (Stem Cell Thecnologies), seguendo il protocollo di separazione, secondo gradiente di densità, delle PBMC (o Peripheral Blood Mononuclear Cell). I linfociti isolati sono stati coltivati in RPMI 1640 con 10% di FBS, 100 U/mL di penicillina, 100 µg /mL di streptomina e 4mmol/L di glutamina (Sigma). La percentuale dell'antigene di superficie CD22 sui linfociti dei pazienti è del 75-88%.

Trattamenti con gli immunoconiugati e con molecole inibitrici.

Le cellule sono state piastrate in triplicato con dosi crescenti dei due immunoconiugati, CMC-544 e, come controllo, con il Mylotarg (CMA-676, α -CD33 coniugato con la calicheamicina) (6) in rapporto ai ng/mL di Calicheamicina presenti e con l'anticorpo α -CD22 non coniugato con la calicheamicina (G5/44) in rapporto ai ng/mL di anticorpo presente nell'immunoconiugato di riferimento (CMC-544). Dopo trattamento per 48 ore, l'effetto antiproliferativo dei due immunoconiugati e dell' α -CD22 non coniugato è stato valutato utilizzando il saggio dell'ATP Lite (Perkin Elmer).

L'ATP è un indicatore dell'attività proliferativa delle cellule, in quanto prodotto da cellule metabolicamente attive e la sua concentrazione diminuisce quando le cellule muoiono o si bloccano in una fase del ciclo cellulare. Il saggio dell'ATP Lite è basato sulla misurazione della quantità di luminescenza emessa dalle cellule mediante la reazione tra l'ATP prodotto dalle cellule e la luciferasi/D-luciferina (enzima/substrato) aggiunte nel sistema. La luminescenza emessa è direttamente proporzionale alla concentrazione di ATP prodotta, quindi alla percentuale di proliferazione.

L'IC50 è stato calcolato utilizzando il metodo dell'effetto mediano mediante il Software CalcuSyn (Biosoft, UK).

Gli inibitori usati in questo progetto sono: inibitore di ATM (KU-55933) (Selleck Chemicals, Houston, TX), inibitore di ChK1/2 (7-idrossistaurosporina o UCN-01) (Merck Biosciences, Germany) e inibitore di p53 (Pifithrin- α) (Sigma). Le cellule sono state piastrate e trattate con gli immunoconiugati; dopo 12 o 48 ore è stato aggiunto il KU-55933 (10 μ M) per 24 ore. Alternativamente, le cellule sono state trattate con UCN-01 (100 nM) per 24 ore, dopo aver rimosso dal terreno di coltura il CMC-544. Invece, la Pifithrin- α è stata usata (15 μ M) in cotrattamento con il CMC-544 e dopo 24 ore è stata nuovamente aggiunta (60 μ M) per le successive 24 ore. Per tutti gli esperimenti, le cellule sono state raccolte e preparate per l'analisi di citofluorimetria e /o di immunoblotting.

Immunoblotting.

I pellet cellulari è stato risospeso in Laemmli Buffer [0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), Glicerolo, 10% (w/s) SDS, 0.1% (w/s) Blue di Bromofenolo, Beta-Mercaptoetanololo (2.5-5%), acqua pura], sono stati sonicati e raccolti dopo centrifugazione a 14,000 rpm per 10 minuti a 4 °C. Per gli esperimenti di immunoblotting, 50 μ g di lisato proteico è stato separato in SDS-PAGE, trasferito in una membrana di nitrocellulosa e “bloccato” (blocking) con

5% di dry milk in TBS con 0.2% di Tween 20 (Sigma). Gli anticorpi usati per gli esperimenti sono: policlonali anti-P-ChK1 e anti-P-ChK2 e monoclonali anti-ChK1 e anti-ChK2 (Cell Signaling Thecnology, Danvers, MA); monoclonali anti-p53, anti-Actina e policlonale anti-p21 (Santa Cruz Biotechnology, CA); sono stati usati gli appropriati anticorpi secondari coniugati con HRP (horseradish peroxidase) (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) e le proteine sono state visualizzate usando l'ECL (enhanced chemiluminescence reagent) (Amersham Biosciences).

Citofluorimetria per l'analisi della morte cellulare con FITC-Annexin V e del ciclo cellulare con Propidio Ioduro.

Per valutare la percentuale d'apoptosi, le cellule non trattate e trattate con i farmaci sono state centrifugate a 1,000 rpm per 5 minuti, risospese in Annexin V Binding Buffer, sono stati aggiunti FITC-Annexin V e PI, in accordo con il protocollo aziendale (BD Biosciences); le cellule sono state quindi incubate per 15 minuti a temperatura ambiente. Parallelamente, per analizzare la distribuzione del ciclo cellulare, le cellule sono state centrifugate a 1,000 rpm per 5 minuti, risospese in 70 μ L di PBS e fissate e permeabilizzate con EtOH (70%) a -20 °C per 12 ore. Successivamente, sono state centrifugate a 1,000 rpm per 5 minuti a 4 °C, risospese in un

buffer contenente RNasi, 20 µg/mL di Propidio Ioduro (PI) in PBS (Phosphate buffered saline) (Sigma) ed incubate per 30 minuti a temperatura ambiente.

L'apoptosi e la distribuzione del ciclo cellulare sono state analizzate mediante analisi citofluorimetrica.

Vettore lentivirale, clonaggio e trasduzione.

Per ottenere la proteina umana p53-GFP è stata amplificata l'intera sequenza mediante PCR usando la Pfx DNA polimerasi (Invitrogen) ed i seguenti primers:

EGFP forward 5^I- CCGCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3^I

EGFP reverse 5^I- CGACGCGTCCTAGGTAATACGACTCACTAT
AGGGTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3^I

P53 forward 5^I- CGCACCGGTGCCACCATGGAGGAGCCGCAG
TCAGA-3^I

P53 reverse 5^I- CCGCTCGAGGTCTGAGTCAGGCCCTTCTG-3^I

L' amplicone di ...bp è stato caricato su gel d'agarosio, purificato con QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) e, successivamente clonato nei siti di restrizione XhoI-EcoRI del vettore inducibile lentivirale pTRIPZ (Open Biosystem, Huntsville, AL).

Le cellule NAMALWA sono state, quindi, trasdotte con P53-GFP, in accordo con il protocollo aziendale.

Estrazione dei linfociti da sangue periferico.

I linfociti sono stati isolati da campioni sani e da pazienti con Linfoma a cellule B CD22-positive. A tal fine, è stata usato il Ficoll-PAQUE Premium (Stem Cell), un reagente con una densità di 1.077 g/mL, ottimizzato per isolare le cellule mononucleate da sangue periferico mediante gradiente di densità.

Il campione di sangue periferico è stato diluito da due a quattro volte aggiungendo PBS Ca-MG Free contenente 2mM di EDTA pH7.2, in modo d'avere circa $5-10 \times 10^6$ cellule per mL di sangue diluito. Questo è stato, successivamente, stratificato su Ficoll e centrifugato a 2500 rpm per 40 minuti a 20 °C. L'anello dei linfomonociti è stato prelevato e per garantire

una soddisfacente deplezione piastrinica è stato lavato in PBS Ca-MG Free con 2mM di EDTA pH7.23-4 volte mediante centrifugazione a 200 RCF per 10 minuti a 20 °C. Le cellule ottenute sono state quindi coltivate, a 37 °C con il 5% di CO₂, in RPMI 1640 con 10% di FBS, 100 U/mL di penicillina, 100 µg /mL di streptomina e 4mmol/L di glutamina (Sigma) ed usate per gli esperimenti.

Scopo del lavoro.

Nel nostro progetto di ricerca abbiamo valutato gli effetti antiproliferativi del CMC-544 (Inotuzumab Ozogamicina) in linee cellulari umane immortalizzate di Linfoma Non-Hodgkin (BL-2 e RAJI) e di Leucemia a linfociti B (SUP-B15) ed in campioni di colture primarie di pazienti affetti da Linfoma a cellule B CD22-positive.

Abbiamo altresì indagato i meccanismi molecolari indotti dal trattamento con il CMC-544, analizzando eventuali meccanismi di “resistenza e/o insensibilità cellulare” delle cellule neoplastiche CD22-positive.

Risultati.

La concentrazione IC₅₀ del CMC-544 induce morte per apoptosi nella maggior parte delle linee cellulari immortalizzate di Linfoma a cellule B CD22 positive.

Per valutare l'effetto antiproliferativo del CMC-544 (Inotuzumab Ozogamicina), abbiamo calcolato, mediante il saggio ATP Lite, la concentrazione dell'immunoconiugato in grado d'inibire il 50% della proliferazione cellulare (IC₅₀). Per eliminare risultati aspecifici dovuti alla possibile rottura, in condizioni fisiologiche, del linker di acido butanoico con liberazione aspecifica della calicheamicina abbiamo esposto le cellule

CD22-positive (CD33-negative), anche al CMA-676 (Gemtuzumab Ozogamicina), un α -CD33 coniugato con la calicheamicina. Inoltre per valutare se l'eventuale riduzione della percentuale di proliferazione fosse dovuta all'azione della calicheamicina o semplicemente all'internalizzazione dell'anticorpo, abbiamo usato come controllo il G5/44 (Epratuzumab), l'anticorpo α -CD22 privo del legame con la calicheamicina.

Un ulteriore controllo preso in considerazione è stato quello d'acquistare, oltre a linee cellulari di Linfoma CD22-positive, anche le HL-60 (7), una linea cellulare di Leucemia Mieloide Acuta (AML) CD33-positiva (CD22-negativa), al fine di determinare la selettività e specificità dell'anticorpo (α -CD22 e α -CD33) coniugato alla tossina. In questo caso, infatti, mentre le linee CD22-positive dovevano mostrare maggiore sensibilità al trattamento con il CMC-544 rispetto a quello con il CMA-676, di contro, le HL-60 dovevano risultare sensibili all' α -CD33 coniugato con la calicheamicina (7, 8).

Negli esperimenti iniziali, abbiamo, quindi, esposto le linee cellulari BL-2, SUP-B15, RAJI (CD22-positive) e le HL-60 (CD33-positive) ai tre composti per 48 ore. Abbiamo quindi valutato la percentuale di proliferazione delle cellule trattate con i tre composti rispetto alle cellule non trattate.

Come atteso, abbiamo riscontrato che il CMC-544 è stato più efficace del CMA-676 sulle linee cellulari CD22-positive. Infatti, nelle BL-2 il valore IC_{50} del CMC-544 (0.98 nM) è stato 45 volte più basso rispetto a quello ottenuto dopo trattamento con il CMA-676 (44.97 nM). Allo stesso modo, nella linea cellulare SUP-B15, il valore IC_{50} dell' α -CD22 coniugato con la calicheamicina (0.17 nM) è risultato 7.7 volte più basso rispetto a quello del CMA-676 (1.32 nM). Abbiamo tuttavia osservato che le cellule RAJI sono, tra le linee CD22-positive, quelle con una più bassa sensibilità al trattamento con il CMC-544, mostrando un valore di IC_{50} dell'immunoconiugato (54.56 nM) soltanto 1,4 volte più basso rispetto a quello ottenuto con il CMA-676 (77.67 nM). Come atteso, le cellule HL-60 hanno invece mostrato maggiore sensibilità al trattamento con il CMA-676 (IC_{50} dell'immunoconiugato 0.44 nM), rispetto al CMC-544 (38.78 nM).

In tutte le linee, l'esposizione al G5/44, anche ad alte concentrazioni, non ha influito sulla proliferazione cellulare (Figura 1).

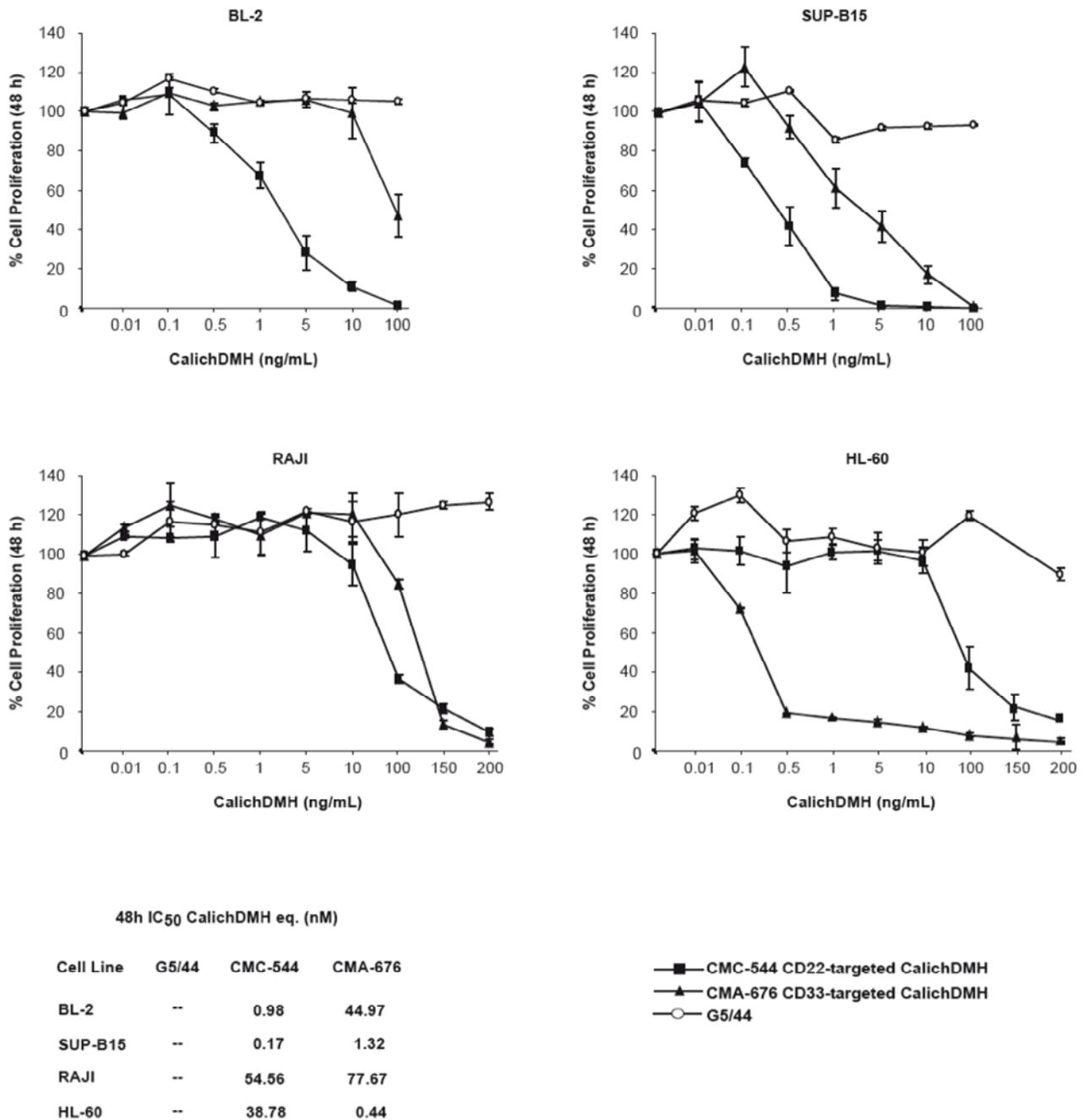


Figure 1. Effetto del CMC-544 sulla proliferazione di cellule di Linfoma CD22 positive e di LMA. La riduzione della proliferazione è stata calcolata, mediante ATP Lite, dopo 48 ore di trattamento con dosi crescenti dei composti indicati. Alla luce dei risultati ottenuti, abbiamo voluto stabilire se il ridotto numero di cellule CD22-positive (e CD33-positive) proliferanti dopo trattamento con CMC-544 (e CMA-676) fosse attribuibile a fenomeni di morte

di cellule CD22-positive (e CD33-positive) proliferanti dopo trattamento con CMC-544 (e CMA-676) fosse attribuibile a fenomeni di morte

cellulare o di senescenza. Abbiamo, quindi, incubato le cellule utilizzando la dose IC_{50} del CMC-544, con le dosi equivalenti di calicheamicina per il CMA-676 ed il G5/44 . Dopo 48 ore abbiamo effettuato il saggio di morte con Annessina V e Propidio Ioduro. I dati ottenuti hanno evidenziato che il trattamento con CMC-544 induce apoptosi in una consistente frazione cellulare. Infatti, l'89% e l'88% di BL-2 e SUP-B15 si distribuisce nella fase precoce e tardiva dell'apoptosi. Diversamente da quest'ultime, ed in accordo con la bassa responsività mostrata al CMC-544 nel saggio di proliferazione, nelle RAJI il trattamento con l'immunoconiugato ha prodotto solo il 25% di cellule apoptotiche.

Come atteso, la linea cellulare di controllo HL-60 ha mostrato una più alta sensibilità al CMA-676, (Figura 2).

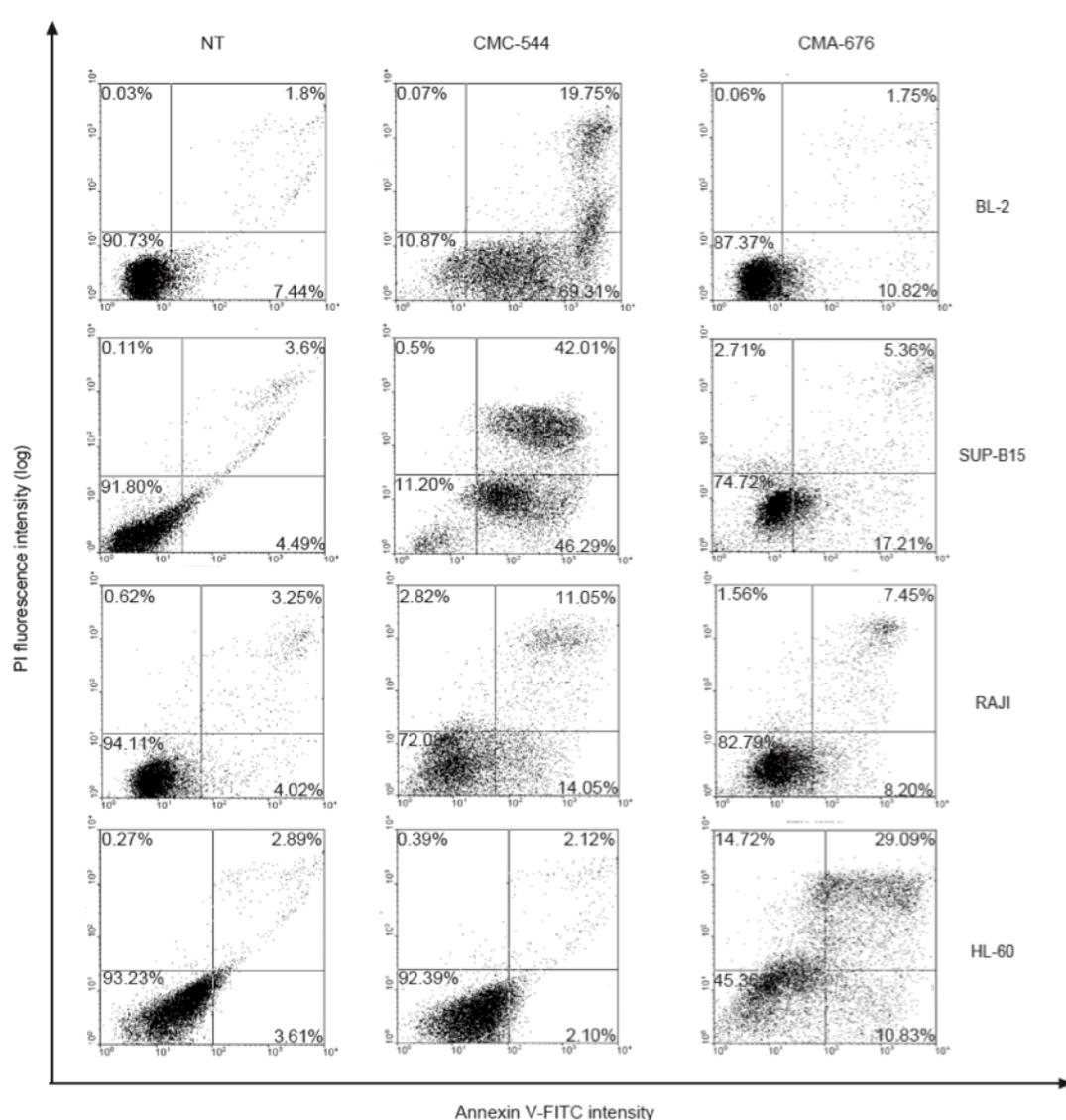


Figura 2. Effetto del CMC-544 sulla vitalità di cellule di Linfoma CD22 positive e di LMA. La morte cellulare è stata valutata mediante saggio citofluorimetrico usando Annessina V/PI. Le cellule indicate sono state trattate per 48 ore, con la dose IC₅₀ del CMC-544 o del CMA-676, e con il G5/44 in rapporto alla concentrazione dell'anticorpo presente nell'immunoconiugato di riferimento (CMC-544).

La concentrazione IC₅₀ del CMC-544 induce arresto in fase G₂/M del ciclo cellulare nelle linee immortalizzate di Linfoma a cellule B CD22-positive.

Dopo aver verificato che l'esposizione al CMC-544 per 48 ore era in grado d'innescare il processo apoptotico in oltre il 50% delle linee cellulari immortalizzate CD22-positive, abbiamo analizzato la distribuzione del ciclo cellulare di BL-2, SUP-B15 e RAJI. Abbiamo osservato che, dopo trattamento con CMC-544 per 48 ore, le cellule rimaste vitali avevano subito una variazione nella distribuzione del ciclo. Infatti, le BL-2 e le

SUP-B15 mostravano un significativo incremento nella percentuale di cellule bloccate nella fase G2/M (rispettivamente, 45% e 50%).

Tuttavia, anche in questo esperimento, le RAJI hanno dato risultati difformi da quelli ottenuti nelle linee sopra citate; infatti, in queste cellule non abbiamo osservato un arresto in fase G2/M, ma solo un significativo incremento nella frazione di cellule poliploidi(9). Come atteso, nelle linee cellulari CD22-positive, il trattamento con G5/44 non ha generato alcuna variazione della distribuzione del ciclo cellulare. (Figura 3 A-B-C)

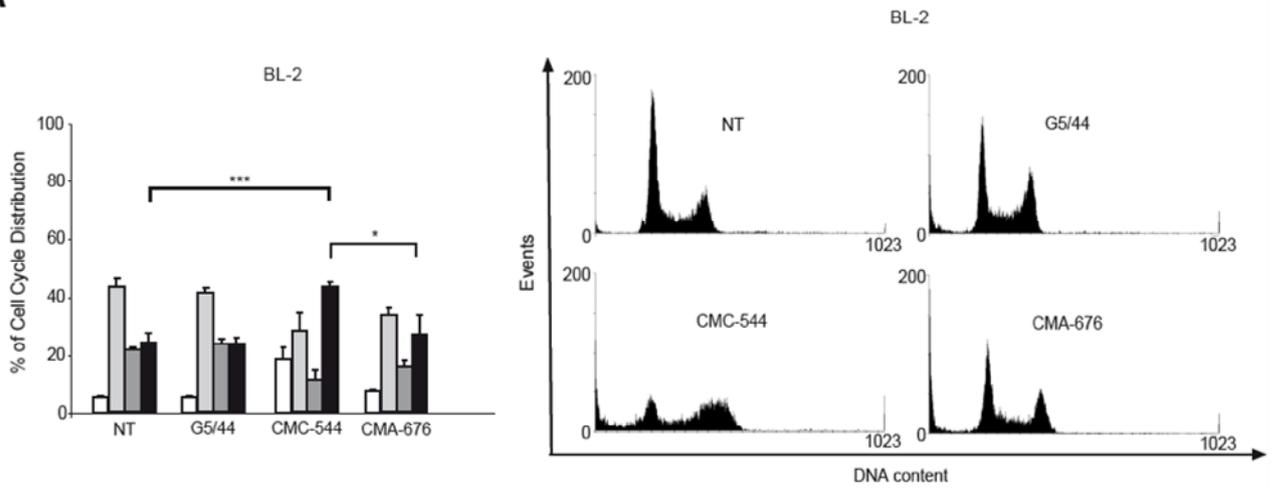
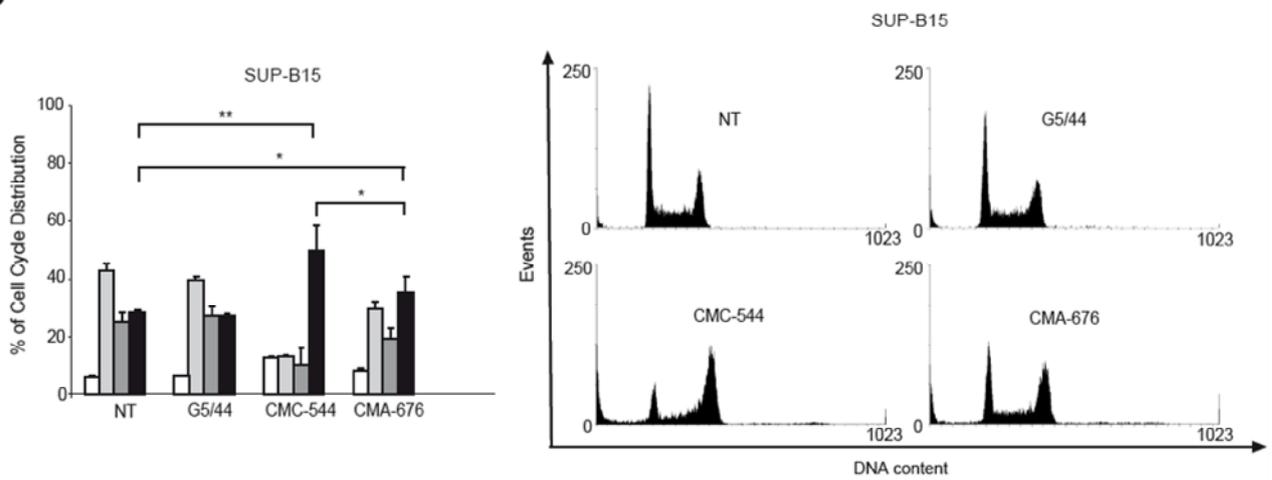
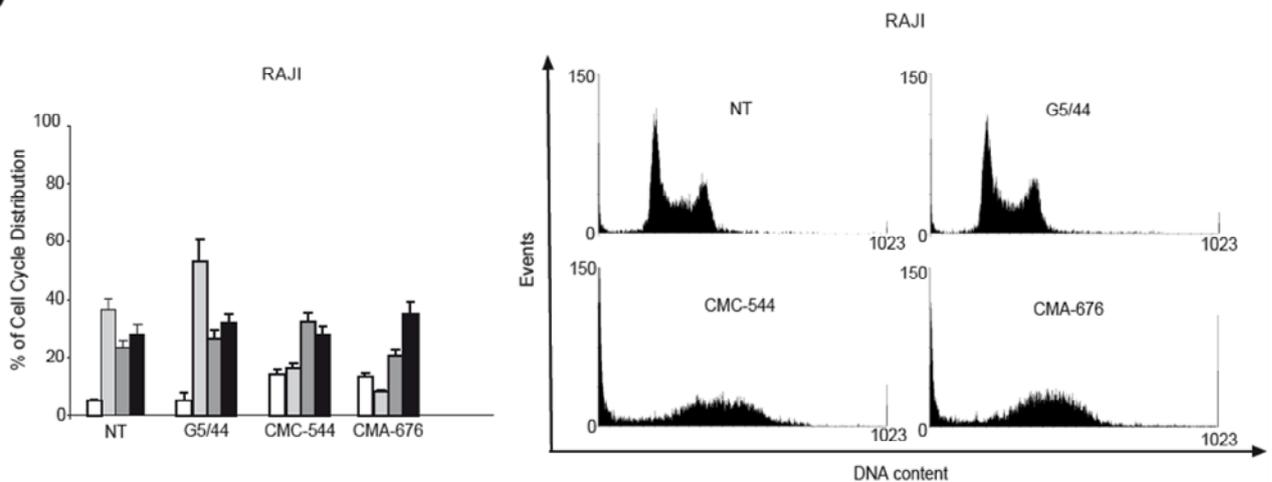
A**B****C**

Figura 3. Il CMC-544 induce arresto in fase G₂/M del ciclo cellulare solo in BL-2 e SUP-B15.

Le linee cellulari indicate sono state esposte ai tre composti specificati. La distribuzione del ciclo cellulare è stata analizzata mediante saggio citofluorimetrico usando il PI. I grafici a barre, a sinistra, mostrano la media \pm deviazione standard di tre esperimenti indipendenti (SubG₁ bianco, G₁ grigio chiaro, S grigio scuro, G₂/M nero). I plots, a destra, mostrano un esperimento rappresentativo per ciascuna linea cellulare. . * p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

CMC-544, arresto in fase G2/M e p53: una questione di vita e di morte.

Le linee cellulari usate nel nostro progetto sono state scelte per il loro diverso profilo di espressione di p53.

Le BL-2 esprimono la proteina p53 wild-type, le SUP-B15 mostrano bassi livelli d'espressione di p53 wild-type a causa dell'amplificazione del gene MDM2 (il principale antagonista cellulare della proteina p53) e le RAJI presentano la mutazione R213Q (10, 11) nel dominio di legame al DNA (*DBD: DNA Binding Domain*) che conferisce alla proteina tradotta mancanza di attività trascrizionale.

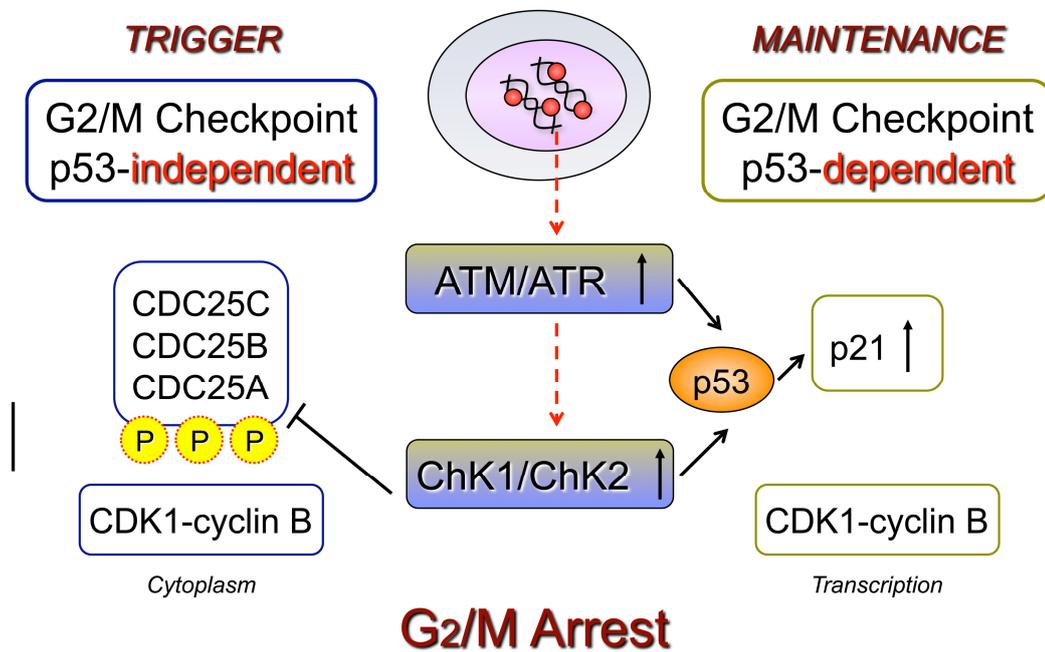
Numerose pubblicazioni hanno dimostrato che il trattamento con agenti che causano danno al DNA induce le chinasi ATM/ATR che, direttamente o indirettamente, attivano vie di trasduzione del segnale che convergono sulle protein chinasi ChK1 e ChK2.

A loro volta, queste due protein chinasi hanno ruoli distinti. L'attivazione di Chk2 è più marcata in risposta a danni al DNA che causano rotture di entrambi i filamenti della doppia elica del DNA (12, 13). Per contro, l'attivazione di Chk1 è solitamente maggiore dopo danni al DNA causati che danneggiano un singolo filamento di DNA (14, 15). E' comunque evidente che ChK1 e ChK2 cooperano tra loro per permettere l'attivazione di segnali intracellulari che esitano nell'arresto del ciclo cellulare (16). Infatti, entrambe le protein chinasi, fosforilano la fosfatasi CDC25 sulle

serina 216 (12, 13, 16, 17), un evento cruciale per innescare l'arresto in fase G2/M del ciclo cellulare. La fosforilazione di CDC25, ne inattiva l'attività catalitica creando un sito di legame per le proteine 14-3-3 (18, 19, 20) che ne causano la ritenzione nel citoplasma. Questa serie di eventi blocca l'attivazione di Cdc2, una chinasi critica per la progressione attraverso la fase G2 del ciclo cellulare (18). E' inoltre noto che ChK2 e ChK1 fosforilano p53 sulla serina 20 (21, 22, 23), stabilizzandone l'emivita (24).

L'attivazione della via ATM/ATR-ChK1/2 induce un arresto del ciclo cellulare temporaneo (8-12 ore) (*fase d'innescio*); questo blocco è p53-indipendente. Superata questa fase, se le cellule non hanno riparato il DNA, hanno due possibilità: a) andare in apoptosi; b) *stabilizzare* l'arresto in G2/M per un tempo più lungo (36-48 ore), avendo quindi un'ulteriore possibilità di riparare i danni al DNA. Tuttavia, diversamente dalla breve fase d'innescio, il *processo di stabilizzazione* dell'arresto in G2/M dipende da p53 che deve indurre trascrizionalmente i livelli di p21 (25, 26).

G2/M CELL CYCLE CHECKPOINT



6. Checkpoint in fase G2/M del ciclo cellulare

Il CMC-544 genera un arresto in fase G₂/M che richiede ATM/ChK2 e l'inibizione dell'attività catalitica di ChK2 induce morte in linee cellulari di Linfoma CD22-positive.

Abbiamo ipotizzato che nelle linee cellulari (BL-2 e SUP-B15) esprimenti p53 wild type fossero mantenute sia la fase d'innescamento che la fase di stabilizzazione dell'arresto in G₂/M del ciclo cellulare. Pensatola contrario, abbiamo supposto che la mancata responsività delle RAJI al CMC-544 fosse conseguenza diretta della mutazione di p53 e, quindi, dell'impossibilità, per questa linea cellulare, di stabilizzare l'eventuale arresto innescato nelle prime ore (12-24 ore) successive al trattamento.

Per verificare le nostre ipotesi abbiamo trattato le tre linee cellulari con i rispettivi valori di IC₅₀ del CMC-544. Il trattamento è stato sospeso dopo 12 e 24 ore. Le cellule sono state quindi raccolte ed impiegate per valutare, mediante western blot, il potenziale contributo di ChK2 nella fase d'innescamento del blocco in G₂/M.

Gli esperimenti di immunoblot hanno mostrato che, in tutte le linee cellulari, il trattamento con il CMC-544 per 12 e 24 ore ha generato un aumento della fosforilazione della proteina ChK2.

Inoltre, in BL-2 e SUP-B15, abbiamo anche osservato un aumento dell'espressione di p53 e p21 dopo esposizione all'immunocongiugato. Al contrario, nelle RAJI, la proteina p53 mutata era altamente espressa nelle

cellule non trattate e mostrava un lieve aumento dopo trattamento; in queste cellule, a causa della mancata attività trascrizionale di p53, la proteina p21 non risultava mai essere espressa (Figura 4).

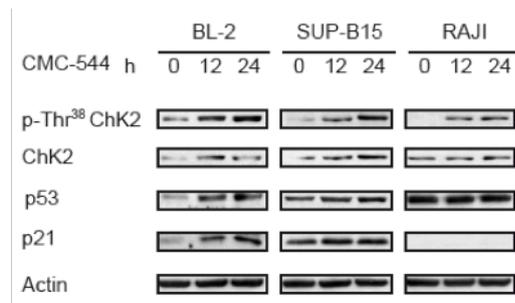


Figura 4. L'esposizione al CMC-544 genera un incremento della fosforilazione della protein chinasi ChK2 ed un aumento dell'espressione di p53 e p21.

BL-2, SUP-B15 e RAJI sono state trattate con il CMC-544 per 12 e 24 ore, quindi analizzate, mediante immunoblot, per valutare la fosforilazione di ChK2 e l'espressione di p53 e p21.

Abbiamo anche valutato la distribuzione del ciclo cellulare dopo breve esposizione al CMC-544 (12-24 ore), osservando, in BL-2 e SUP-B15, un aumento della percentuale di cellule arrestate in fase G2/M direttamente proporzionale alla durata del trattamento.

Sorprendentemente, dopo 12 ore di CMC-544, le cellule RAJI hanno mostrato un significativo incremento nella frazione di cellule (circa il 60%) arrestate in fase G2/M; questo evento ha perso significatività dopo 24 ore di trattamento, mostrando una riduzione del numero di cellule arrestate (circa il 40%) (Figura 5).

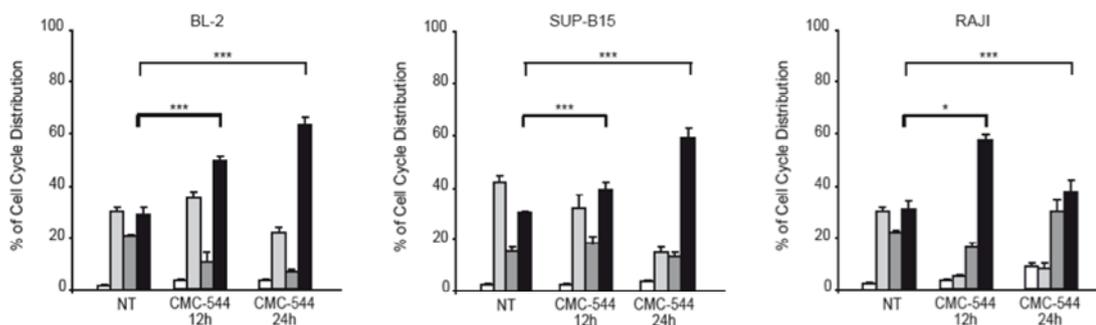


Figura 5. Una breve esposizione al CMC-544 genera un arresto in fase G₂/M del ciclo cellulare in tutte le linee immortalizzate di Linfoma CD22-positive.

Le cellule indicate sono state trattate con il CMC-544 per i tempi specificati. La distribuzione del ciclo cellulare è stata analizzata mediante saggio citofluorimetrico usando il PI. I grafici a barre mostrano la media ± la deviazione standard di tre esperimenti indipendenti (SubG₁ bianco, G₁ grigio chiaro, S grigio scuro, G₂/M nero). * p< 0.05; **p< 0.01; ***p< 0.001.

I dati ottenuti hanno indicato che, oltre che nelle BL-2 e nelle SUP-B15, l'innescò ChK2-dipendente dell'arresto in G₂/M è preservato anche nelle cellule RAJI.

Per validare ulteriormente la nostra ipotesi abbiamo analizzato la distribuzione del ciclo cellulare trattando le cellule con l'UCN-01, un noto inibitore di ChK1/2. L'UCN-01 (o 7-idrossistaurosporina) è un agente antitumorale in Fase II di sviluppo clinico che aumenta la sensibilità delle cellule tumorali agli agenti chemioterapici ed alle radiazioni, mediante l'abrogazione dell'arresto del ciclo cellulare dopo danno al DNA (27, 28, 29).

Abbiamo esposto le cellule al CMC-544 per 12 ore e, dopo aver rimosso l'immunoconjugato, abbiamo aggiunto l'UCN-01 per le successive 24 ore. In queste condizioni sperimentali abbiamo osservato che, in tutte le tre linee cellulari, l'esposizione sequenziale al CMC-544 e all'UCN-01, forzando la progressione del ciclo cellulare, induceva un decremento della fosforilazione di ChK2 (Figura 3 B) ma anche un significativo incremento della morte (20% in BL-2, 30% in SUP-B15 e 50% nelle RAJI) ed una drastica riduzione nella percentuale di cellule arrestate in fase G₂/M (Figura 6).

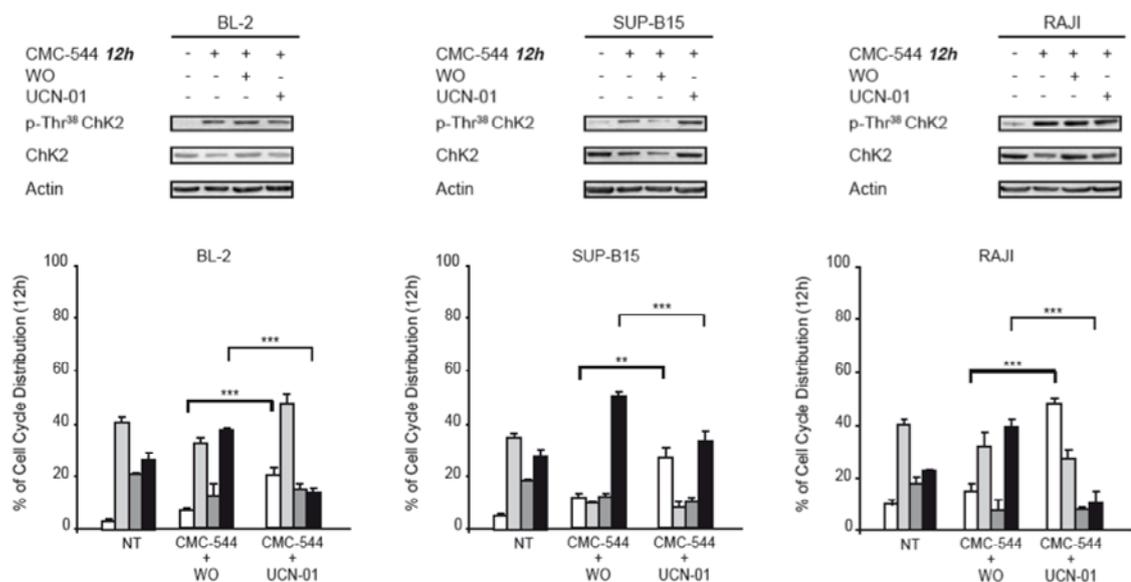


Figura 6. L'UCN-01, dopo breve esposizione al CMC-544, induce morte cellulare e riduzione della frazione di cellule arrestate in fase G₂/M.

BL-2, SUP-B15 e RAJI sono state esposte per 12 ore al CMC-544, quindi piastrate nuovamente, per 24 ore, nel terreno di coltura privo dell'immunoconjugato o in presenza dell'UCN-01. Gli effetti dei trattamenti sono stati valutati mediante western blotting (pannelli in alto), usando gli anticorpi specificati, e attraverso citofluorimetria (pannelli in basso) per analizzare la distribuzione del ciclo cellulare. I grafici a barre, in basso, mostrano la media \pm la deviazione standard di tre esperimenti indipendenti (SubG₁ bianco, G₁ grigio chiaro, S grigio scuro, G₂/M nero). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Questo risultato ha suggerito che l'inibizione di ChK2, la proteina responsabile della fase d'innescio dell'arresto del ciclo cellulare è stata sufficiente per aumentare significativamente la morte dopo danno al DNA (30) indotto da un breve trattamento con il CMC-544.

L'inibizione tardiva della proteina ChK2 induce morte solo in linee cellulari che esprimono p53 wild type

Avendo dimostrato la preservazione della fase d'innescamento dell'arresto in G2/M in tutte le tre linee cellulari impiegate nel nostro studio, abbiamo quindi voluto studiare se fosse preservato anche il meccanismo responsabile della stabilizzazione del blocco.

Gli esperimenti iniziali hanno evidenziato che la stabilizzazione dell'arresto in G2/M del ciclo cellulare era preservata in BL-2 e in SUP-B15 che esprimono p53 wild-type, ma mancava nelle RAJI, nelle quali p53 presenta la mutazione R213Q.

Per confermare il ruolo di ChK2/p53/p21 nella stabilizzazione dell'arresto in G2/M abbiamo, successivamente esposto le tre linee cellulari al CMC-544 ed al KU-55933 (un inibitore di ATM) (31).

Gli esperimenti di immunoblotting hanno mostrato un aumento della fosforilazione di ChK2 in tutte le linee cellulari dopo esposizione al CMC-544. Tuttavia, questo evento è stato abolito dopo trattamento combinato con il KU-55933. Inoltre, abbiamo osservato un aumento dell'espressione

delle proteine p53 e p21 in BL-2 e SUP-B15 (e veniva ridotto solo dopo cotrattamento con l'inibitore di ATM), ma non nelle RAJI, in quanto la proteina p53 mutata non è in grado d'indurre p21 (Figura 7).

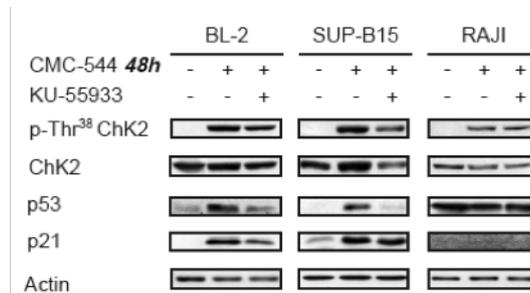


Figura 7. Il trattamento con KU-55933 riduce la fosforilazione di Chk2, indotta dopo prolungata esposizione al CMC-544.

BL-2, SUP-B15 e RAJI sono state esposte, per 48 ore, al CMC-544 da solo, o in combinazione con il KU-5593, quindi analizzate, mediante western blotting, per valutare la fosforilazione di Chk2 e l'espressione di p53 e p21.

Per vedere se l'aumento dell'espressione di p53 fosse conseguenza dell'esposizione al CMC-544, abbiamo anche effettuato un trattamento combinato con Pifitrina- α , un noto inibitore di p53, in grado di destabilizzare la proteina ed inibirne l'importo nucleare (32, 33). I dati ottenuti hanno evidenziato, in BL-2 e SUP-B15, una assai marcata riduzione di p53 dopo cotrattamento con Pifitrina- α . Nelle RAJI, tuttavia, il cotrattamento ha solo indotto un debole decremento dell'espressione di p53, presente già ad alti livelli anche nella linea cellulare non trattata (Figura 8).

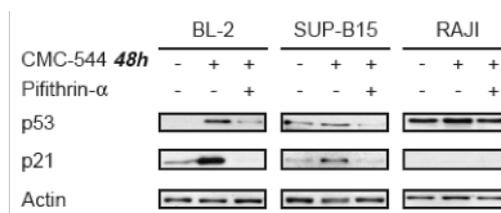


Figura 8. La Pifitrina- α riduce l'espressione della proteina p53, indotta dal CMC-544.

Le linee cellulari indicate sono state esposte, per 48 ore, al CMC-544 da solo, o in 43 combinazione con la Pifitrina- α , un noto inibitore di p53, quindi lisate ed analizzate, mediante western blotting, usando gli anticorpi indicati.

Abbiamo quindi ripetuto gli esperimenti combinati con CMC-544 ed UCN-01, per determinare se, dopo una esposizione prolungata all'immunoconiugato, l'UCN-01 incrementasse ulteriormente l'apoptosi nelle cellule neoplastiche CD22-positive.

Abbiamo osservato una riduzione della fosforilazione di ChK2 dopo il trattamento sequenziale con il CMC-544 e l'UCN-01 (Figura 9).

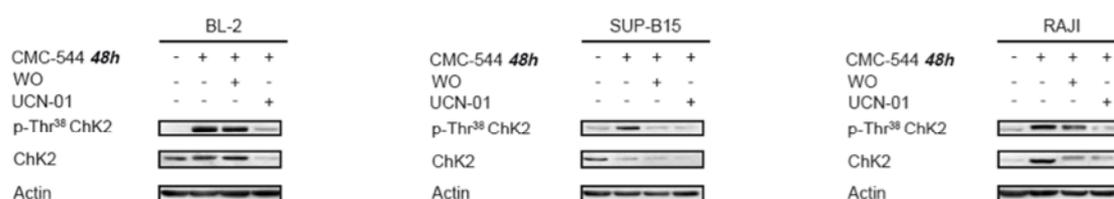


Figura 9. Il trattamento con UCN-01 riduce la fosforilazione della protein-chinasi ChK2, dopo prolungata esposizione al CMC-544, in linee immortalizzate di Linfoma CD22 positive.

Le linee cellulari indicate sono state trattate per 48 ore con il CMC-544 da solo, o in combinazione con l'UCN-01, quindi analizzate, mediante western blotting, per valutare la fosforilazione di ChK2.

Tuttavia, quando abbiamo analizzato la distribuzione del ciclo cellulare in queste condizioni sperimentali abbiamo notato una riduzione dell'arresto in G2/M associato ad un incremento dell'apoptosi solo nelle BL-2 e nelle SUP-B15. Al contrario, nelle cellule RAJI, in assenza di un arresto in G2/M dopo 48 ore d'esposizione al CMC-544, il trattamento con l'UCN-01 non è stato in grado d'aumentare la frazione di cellule apoptotiche (Figura 10).

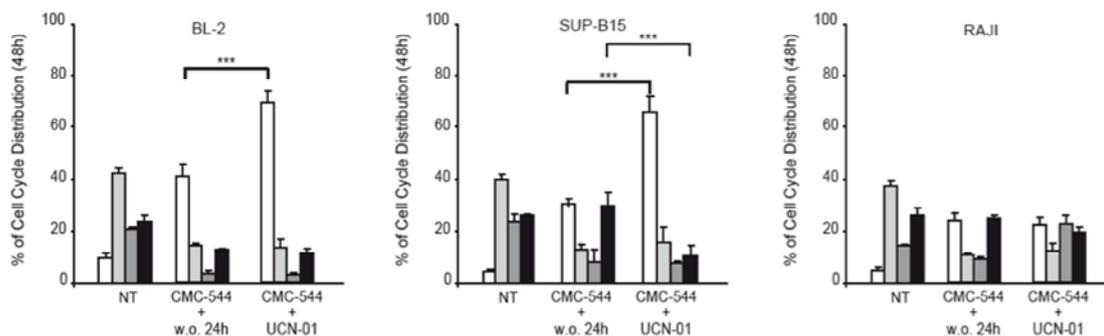


Figura 10. L'UCN-01, dopo prolungata esposizione al CMC-544, genera morte cellulare e riduzione della frazione di cellule arrestate in fase G₂/M del ciclo cellulare solo in linee immortalizzate che esprimono p53 wild type.

BL-2, SUP-B15 e RAJI sono state esposte per 48 ore al CMC-544 da solo, quindi piastrate nuovamente, per 24 ore, in terreno di coltura privo dell'immunoconiugato o in presenza dell'UCN-01. Dopo i trattamenti, le cellule sono state analizzate mediante saggio citofluorimetrico per valutare la distribuzione del ciclo cellulare. I grafici a barre mostrano la media \pm la deviazione standard di tre esperimenti indipendenti (SubG₁ bianco, G₁ grigio chiaro, S grigio scuro, G₂/M nero). * p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

Il CMC-544 non è efficace sulle linee cellulari di Linfoma CD22-positive che presentano mutazioni nella proteina p53.

Per validare ulteriormente la nostra ipotesi di considerare p53 come fattore molecolare di risposta al CMC-544, abbiamo acquistato le NAMALWA e le RAMOS, due ulteriori linee cellulari di Linfoma non-Hodgkin che presentano rispettivamente la mutazione R248Q e I254D nella sequenza amminoacidica di p53, rendendola trascrizionalmente inattiva e capace d'agire come un oncogene.

In queste linee cellulari, abbiamo voluto ripetere gli esperimenti già svolti in BL-2, SUP-B15 e RAJI, per validare l'ipotesi di considerare lo stato mutazionale di p53 come fattore molecolare "limitante" nella terapia dei Linfomi a cellule B CD22-positive mediante l'uso del CMC-544.

Le cellule sono state incubate con dosi crescenti di CMC-544, CMA-676 e G5/44, l'anticorpo α -CD22 non coniugato con l'agente citotossico. Dopo 48 ore d'esposizione ai tre composti, l'effetto antiproliferativo dei due immunoconiugati è stato valutato utilizzando il saggio dell'ATP Lite.

Come nelle RAJI, anche le NAMALWA sono risultate essere poco sensibili al CMC-544, ottenendo un valore IC_{50} dell'immunoconiugato (42.52 nM) 2,7 volte più basso rispetto a quello ottenuto con il CMA-676 (117.08 nM). Per le cellule RAMOS, invece, non siamo riusciti ad ottenere alcun valore IC_{50} per nessuno dei due immunoconiugati, anche utilizzando dosi molto alte dei composti (fino a 3 $\mu\text{g/mL}$ di calicheamicina presenti). Come atteso, il trattamento con il G5/44 non ha influito sulla proliferazione cellulare (Figura 11).

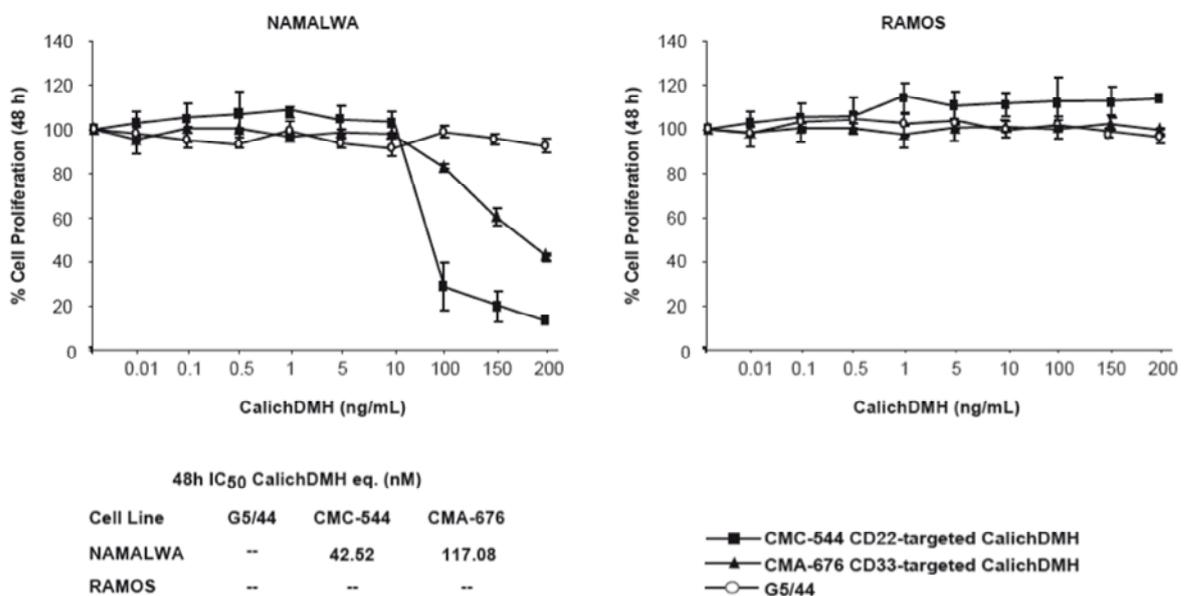


Figura 11. Effetto del CMC-544 sulla proliferazione di cellule NAMALWA e RAMOS che esprimono, rispettivamente, le mutazioni R248Q e I254D nella proteina p53.

La riduzione della proliferazione è stata calcolata, mediante ATP Lite, dopo 48 ore di trattamento con dosi crescenti dell'anticorpo CD22 (G5/44), o dell' α -CD22 e dell' α -CD33 coniugati con la calicheamicina. La tabella sotto i grafici indica le concentrazioni nanomolari di IC_{50} dei tre composti sulle linee cellulari.

Abbiamo quindi effettuato gli esperimenti successivi solo sulle NAMALWA, generando dati sovrapponibili a quelli ottenuti nelle RAJI.

Abbiamo esposto le NAMALWA al dosaggio IC₅₀ del CMC-544 per 12 e 24 ore; le cellule sono state quindi destinate ad esperimenti di immunoblot, per valutare la fosforilazione di ChK2 e/o l'espressione di p53 e p21, e ad un saggio citofluorimetrico, per osservare eventuali variazioni nella distribuzione del ciclo cellulare.

Dopo 12 e 24 ore d'esposizione al CMC-544 abbiamo osservato un aumento della fosforilazione di ChK2 mentre, l'espressione di p53 è rimasta invariata dopo trattamento, essendo presente già ad alti livelli nelle cellule non trattate. Con nostra sorpresa abbiamo notato che, dopo 24 ore di CMC-544, anche l'espressione di p21 risultava essere aumentata rispetto al basale, nonostante l'assenza dell'attività trascrizionale della proteina mutata p53. Questi risultati suggeriscono che in queste cellule sia coinvolto una via di segnalazione alternativa che induce p21, consentendo alle NAMALWA di mantenere il blocco per un tempo più a lungo rispetto alle

RAJI (Figura 12).

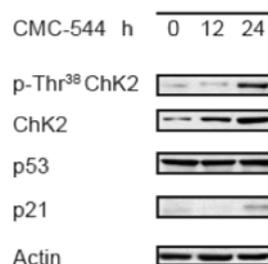


Figura 12. L'esposizione al CMC-544 genera un incremento della fosforilazione della protein chinasi ChK2 ed un aumento dell'espressione delle proteine p53 e p21 nelle cellule NAMALWA.

Le cellule NAMALWA sono state trattate con il CMC-544 per 12 e 24 ore, quindi analizzate, mediante western blotting, per valutare la fosforilazione di ChK2 e l'espressione di p53 e p21.

In citofluorimetria, abbiamo osservato che 12 ore d'esposizione al CMC-544 generano un aumento della frazione di cellule arrestate in fase G₂/M (circa 60%, come osservato nelle RAJI), evento che tende a perdersi quando il trattamento si prolunga fino a 24 ore (Figura 13).

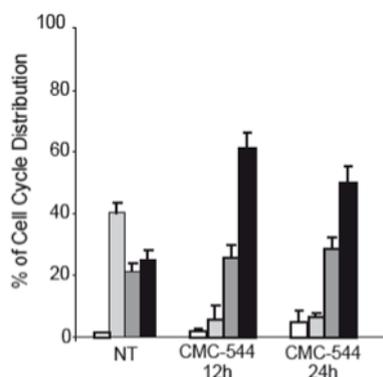


Figura 13. Una breve esposizione al CMC-544 genera, nelle cellule NAMALWA, un arresto in fase G₂/M del ciclo cellulare.

Le cellule sono state trattate con il CMC-544 per i tempi indicati. La distribuzione del ciclo cellulare è stata analizzata mediante saggio citofluorimetrico usando il PI. I grafici a barre mostrano la media \pm la deviazione standard di tre esperimenti indipendenti (SubG₁ bianco, G₁ grigio chiaro, S grigio scuro, G₂/M nero). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Questi esperimenti sono stati ripetuti anche dopo esposizione al CMC-544 per 48 ore.

Negli esperimenti di immunoblotting, abbiamo osservato un aumento della fosforilazione della protein chinasi ChK2; anche in queste condizioni l'espressione di p53 è rimasta invariata, rispetto alle cellule non trattate.

Questi esperimenti hanno mostrato la scarsa sensibilità delle Namalwa ad una lunga esposizione (48 ore) al CMC-544.

Anche in questa linea cellulare, abbiamo usato il KU-55933 e l'UCN-01, al fine d'inibire le protein chinasi ATM e ChK2, responsabili della risposta al CMC-544. Gli esperimenti di immunoblotting mostrano che sia il KU-55933 che l'UCN-01 hanno ridotto drasticamente la fosforilazione di ChK2 e l'espressione di p21, aumentate dopo breve (24 ore) e prolungata (48 ore) esposizione al CMC-544. Inoltre, incubando per 12 ore le cellule con il CMC-544 ed aggiungendo l'UCN-01 per le successive 24 ore, è stata ripristinata la risposta all'immunoconiugato, avendo osservato un aumento della frazione di cellule apoptotiche ed una forte riduzione della percentuale di cellule arrestate in fase G2/M. Questi eventi non si sono tuttavia ripetuti dopo 48 ore di esposizione al CMC-544 in quanto le cellule Namalwa sono sprovviste di p53 wild-type (Figura 14).

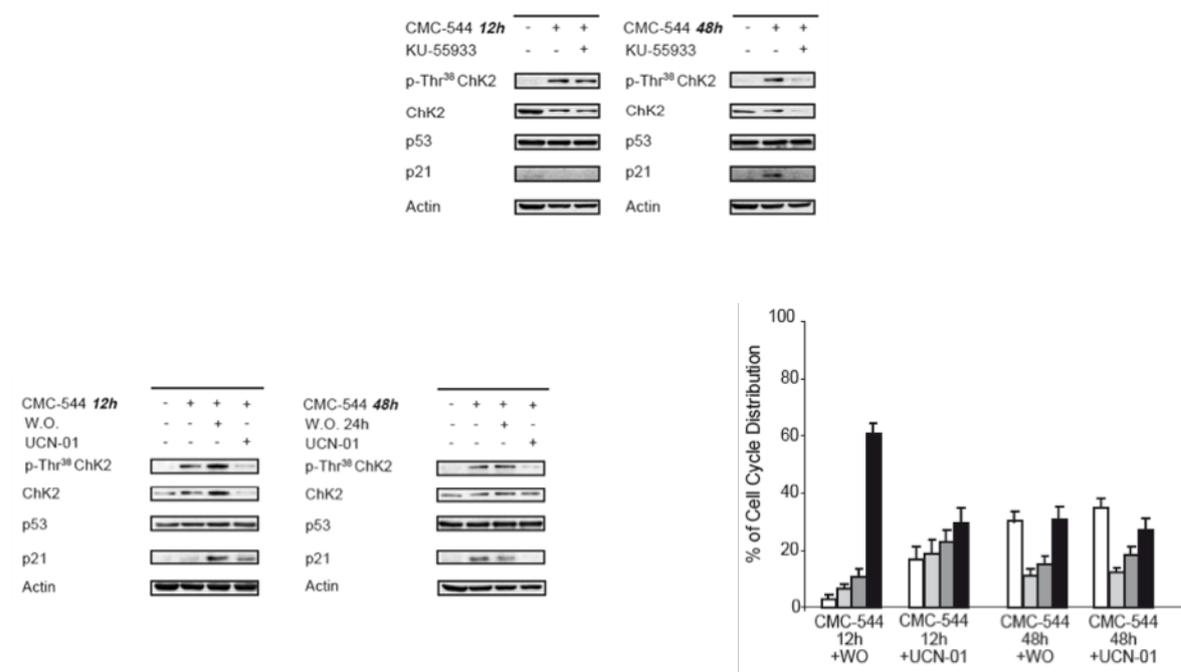


Figura 14. Il KU-55933 e l'UCN-01 riducono la fosforilazione di ChK2, ma l'inibitore di ChK1/2 non è in grado d'indurre la morte delle cellule NAMALWA dopo esposizione prolungata al CMC-544.

La linea cellulare NAMALWA è stata esposta, per 12 e 48 ore, al CMC-544 da solo, o in combinazione con il KU-5593, quindi analizzata, mediante western blotting (pannello in alto), per valutare la fosforilazione di ChK2 e l'espressione di p53 e p21. Le cellule sono state anche trattate per 12 e 48 ore con CMC-544, ripiastrate nuovamente nel terreno di coltura privo dell'immunocongiugato o in presenza dell'UCN-01. Gli effetti dei trattamenti sono stati valutati mediante western blotting (pannello in basso a sinistra) con gli anticorpi indicati, o attraverso saggio citofluorimetrico (pannello in basso a destra), per valutare la distribuzione del ciclo cellulare. I grafici a barre mostrano la media \pm la deviazione standard di tre esperimenti indipendenti (SubG₁ bianco, G₁ grigio chiaro, S grigio scuro, G₂/M nero).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

L'espressione ectopica di p53 wild type ripristina l'effetto antiproliferativo del CMC-544 in linee cellulari che presentano mutazioni nella proteina p53.

In seguito ai dati ottenuti nelle RAJI e nelle NAMALWA che esprimono due differenti mutazioni nella sequenza della proteina p53 (rispettivamente, R213Q e R248Q), abbiamo voluto valutare gli effetti di una iper-espressione di p53 ectopico. A tal scopo abbiamo clonato la sequenza di p53 wild-type dentro il pTRIPZ, un vettore lentivirale inducibile. Per monitorare l'efficienza d'infezione, abbiamo legato in frame a p53 la sequenza della GFP (*Green Fluorescence Protein*).

Abbiamo quindi infettato le cellule NAMALWA con il pTRIPZ-p53GFP ed abbiamo selezionato il clone infettato mediante puromicina (1.5 µg/mL), essendo presente nel vettore la cassetta di resistenza per tale antibiotico.

Il clone stabile (NAMALWA pTRIPZ-p53GFP) è stato poi utilizzato per gli esperimenti successivi.

Inizialmente, abbiamo esposto per 48 ore le cellule, indotte e non indotte, a dosi crescenti di CMC-544 per calcolare il valore IC_{50} mediante saggio ATP Lite. Per le cellule in cui p53 wild-type era stata indotta abbiamo ottenuto un valore IC_{50} del CMC-544 (11.43 nM) 4,8 più basso rispetto a quello ottenuto per le cellule in cui mancava l'induzione della proteina p53 wild-type (55.04 nM) (Figura 15). Questo risultato mostra come l'espressione ectopica di p53 wild type sia in grado d'abbassare il dosaggio del CMC-544 necessario per ottenere una riduzione del 50% della proliferazione cellulare, suggerendo quindi che eventuali mutazioni nella sequenza di p53 rendano questa proteina un fattore molecolare limitante per l'efficacia del trattamento con il CMC-544.

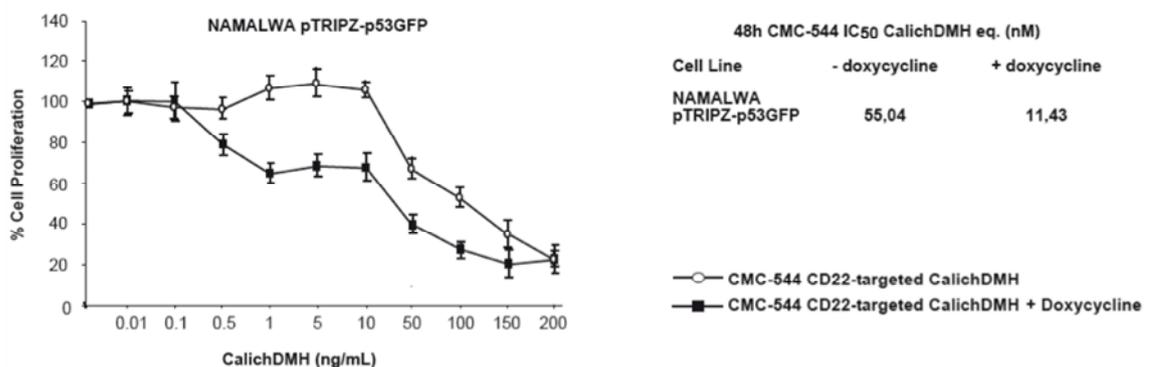
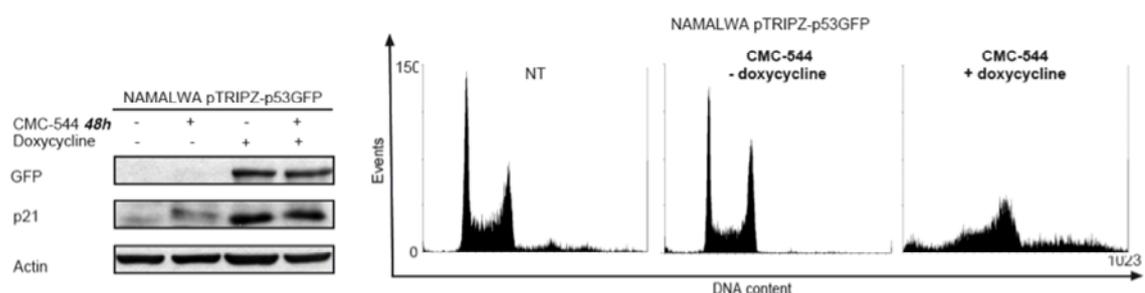


Figura 15. L'espressione ectopica della proteina p53 wild type sensibilizza le cellule NAMALWA, che hanno R248Q p53, al trattamento con il CMC-544.

Dopo infezione lentivirale con il costrutto inducibile pTRIPZ-p53GFP, il clone stabile delle NAMALWA è stato incubato per 48 ore con concentrazioni crescenti di CMC-544, in presenza o in assenza di Doxiciolina. La riduzione della proliferazione cellulare è stata calcolata mediante ATP Lite. La tabella a destra del grafico indica le concentrazioni IC_{50} del CMC-544 sulle NAMALWA pTRIPZ-p53GFP. L'infezione lentivirale è stata monitorata mediante la fluorescenza della GFP (*Green Fluorescence Protein*)

Nell'esperimento seguente abbiamo esposto le cellule per 48 ore con la dose di calichemicina equivalente corrispondente al valore IC₅₀ del CMC-544 ottenuto in seguito all'induzione con Doxiciclina (11.43 nM) in presenza o in assenza dell'induzione di p53. In citofluorimetria abbiamo valutato la distribuzione del ciclo cellulare, osservando, nelle cellule in cui la proteina p53-GFP era stata indotta, un arresto in fase G2/M dopo trattamento con il CMC-544 per 48 ore rispetto al dato ottenuto nelle cellule non indotte e trattate con l'immunoconiugato, nelle quali il ciclo risultava invariato rispetto alle cellule esprimenti p53-GFP e non esposte al CMC-544 (Figura 16).

Questo risultato ha validato i nostri dati precedenti che associavano lo stato mutazionale di p53 alla capacità di predire una risposta al trattamento con il CMC-544.



Effetto citotossico del CMC-544 su linee primarie di campioni sani e di pazienti affetti da Linfoma a cellule B CD22-positive.

L'ultimo obiettivo del nostro progetto di ricerca è stato quello di confermare i dati ottenuti in linee cellulari immortalizzate anche in cellule primarie derivate da pazienti con patologie linfoproliferative CD22 positive. A tal fine, abbiamo isolato i linfociti dal sangue periferico di quattro donatori sani, di quattro pazienti con linfoma alla diagnosi, di un paziente in remissione e di un paziente con linfoma leucemizzato.

Abbiamo, quindi, calcolato il valore IC_{50} del CMC-544 nei campioni riscontrando nei pazienti alla diagnosi un valore IC_{50} (valore medio 17.66 nM) di circa 2 volte più basso rispetto a quello dei donatori sani (valore medio 36.57 nM).

Inoltre il valore IC₅₀ del CMC-544 nel paziente in remissione (77.82 nM) era circa 19 volte più basso rispetto a quello calcolato nel paziente leucemizzato (1456.21 nM) (Figura 17). Questo dato ha dimostrato la scarsa responsività al trattamento con il CMC-544 nei pazienti che presentavano mutazioni nella sequenza della proteina p53. Infatti, i linfociti, isolati dal sangue periferico del paziente con linfoma leucemizzato, trattati con l'immunocongiugato per 48 ore e destinati agli esperimenti di western blot hanno mostrato la presenza della forma tronca della proteina in questione (Figura 18).

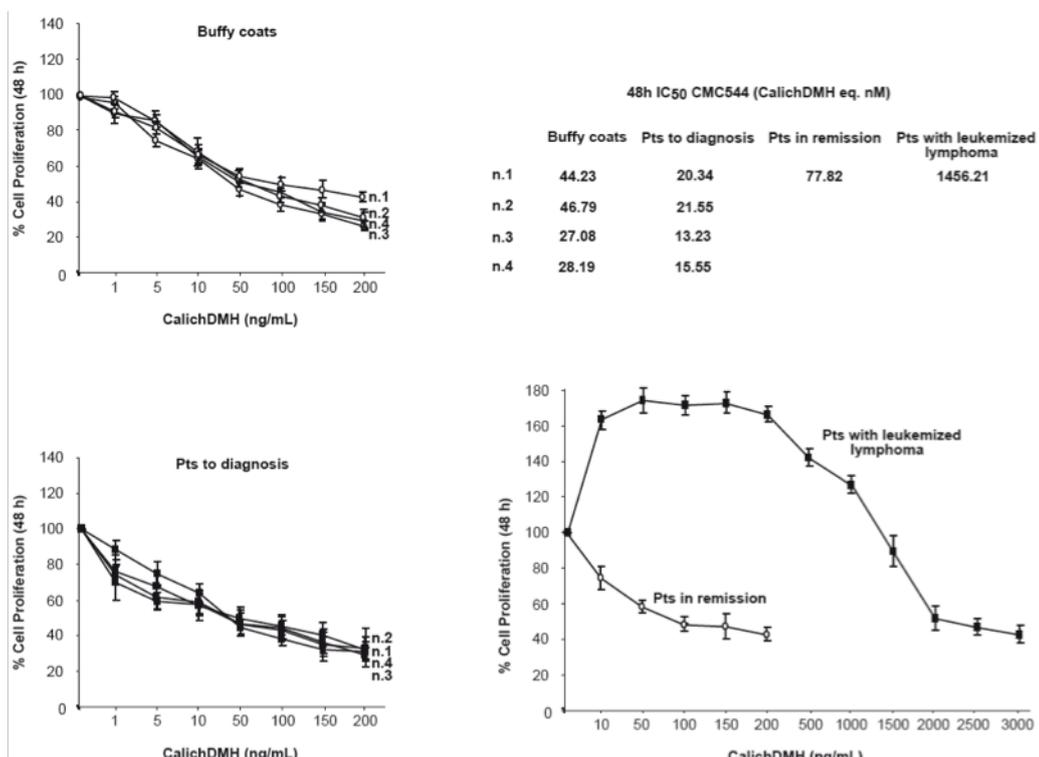


Figura 17. Effetto citotossico del CMC-544 in campioni sani ed in pazienti di Linfoma CD22-positivi.

Campioni di sangue periferico di 4 donatori sani (grafico in alto a sinistra), di 4 pazienti di Linfoma CD22-positivi alla diagnosi (grafico in basso a sinistra), di un paziente in remissione e di un paziente leucemizzato (pannello in basso a destra) sono stati incubati, per 48 ore, con concentrazioni crescenti del CMC-544. La riduzione della vitalità cellulare è stata calcolata mediante ATP Lite. La tabella in alto a destra indica le concentrazioni IC₅₀ del CMC-544, sulle linee primarie.

Gli esperimenti di immunoblot, per valutare l'eventuale aumento dell'espressione delle proteine p53 e p21, sono stati eseguiti anche in tutti gli altri campioni trattati per 48 ore con i rispettivi dosaggi IC₅₀ del CMC-544. Ad eccezione del paziente con linfoma leucemizzato nel quale anche le cellule non trattate presentavano un accumulo della p53 mutata anche in cellule non trattate, negli altri campioni il trattamento con l'immunocongiugato induceva la proteina p53 e p21(Figura 18).

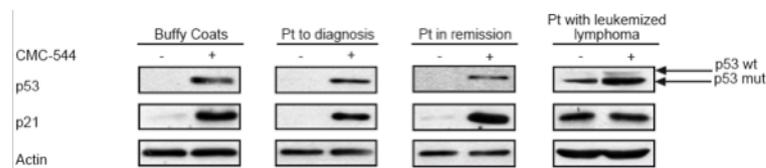


Figura 18. Il CMC-544 induce aumento dell'espressione della proteina p53 su linee primarie di donatori sani e di pazienti di Linfoma CD22-positivi.

Dopo esposizione per 48 ore con le rispettive concentrazioni IC₅₀ del CMC-544, sono state valutate, mediante western blotting, l'espressione di p53 e di p21. La figura mostra l'espressione delle proteine di un esperimento rappresentativo per ciascuna condizione clinica dei campioni analizzati.

Discussione e Conclusioni.

I dati ottenuti nel nostro progetto di ricerca dimostrano che in linee umane immortalizzate e primarie di patologie linfoproliferative CD22-positive , il trattamento con il CMC-544 induce morte cellulare per apoptosi e arresto in fase G2/M del ciclo cellulare. Dopo danno al DNA, si verifica infatti l'induzione di una fase d'innescò del blocco del ciclo cellulare p53-indipendente che richiede ATM-ChK2. La successiva stabilizzazione di questo arresto richiede però p53 wild-type e l'induzione di p21. I nostri dati suggeriscono che l'attività antiproliferativa e citotossica del CMC-544 è correlata con lo status della proteina p53. Infatti, sia nelle cellule immortalizzate che nelle cellule primarie che presentano mutazioni nella sequenza amminoacidica di p53, il CMC-544 non è in grado di indurre un

arresto stabile del ciclo in fase G2/M, causando l'accumulo di una frazione di cellule poliploidi che resistono al trattamento con l'immunoconiugato. E' tuttavia emerso dai nostri dati che una più breve esposizione (12-24 ore) al CMC-544 induce un transitorio arresto in fase G2/M, anche in cellule esprimenti la proteina p53 mutata, grazie all'induzione p53-indipendente di ATM-ChK2. L'esposizione di queste cellule al CMC-544 in combinazione con un inibitore di ChK1/2, l'UCN-01, sensibilizza però queste cellule al trattamento con l'immunoconiugato, aumentando la frazione di morte.

Questi dati suggeriscono, quindi, che la proteina p53 potrebbe rappresentare un fattore molecolare predittivo di risposta alla terapia con il CMC-544 e che, in pazienti di patologie linfoproliferative a cellule B CD22-positive esprimenti mutazioni nella proteina p53, il potenziale terapeutico dell'immunoconiugato può essere ristabilito mediante un cotrattamento con inibitori delle protein chinasi ChK1/2.

BIBLIOGRAFIA

1. Lars Nitschke. CD22 and Siglec-G: B-cell inhibitory receptors with distinct functions. *Immunological Reviews* 230/2009
2. Jennifer A. Walker and Kenneth G. C. Smith. CD22: an inhibitory enigma. *Immunology*, 123, 314–325 (2007)
3. AG Polson. Anti-CD22-MCC-DM1: an antibody-drug conjugate with a stable linker for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma *Leukemia* (2010) 24, 1566–1573
4. JF Di Joseph. Therapeutic potential of CD22-specific antibody-targeted chemotherapy using inotuzumab ozogamicin (CMC-544) for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* (2007) 21, 2240–2245
5. Laurent Ducry and Bernhard Stump. Antibody-Drug Conjugates: Linking Cytotoxic Payloads to Monoclonal Antibodies. *Bioconjugate Chem.* 2010, 21, 5–13
6. RA Larson. Antibody-targeted chemotherapy of older patients with acute myeloid leukemia in first relapse using Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin). *Leukemia* (2002) 16, 1627–1636
7. G.D. Birnie. The HL60 cell line: A model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br. J. Cancer* (1988), 58, Suppl. IX, 41-45

8. Philip R. Hamann, Gemtuzumab Ozogamicin, A Potent and Selective Anti-CD33 Antibody-Calicheamicin Conjugate for Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Bioconjugate Chem.* 2002, 13, 47–58
9. Andrei Ivanov. Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks. *Journal of Cell Science* (2003) 116, 4095-4106
10. Abel Sánchez-Aguilera. p14ARF nuclear overexpression in aggressive B-cell lymphomas is a sensor of malfunction of the common tumor suppressor pathways. *Blood* 2002 99: 1411-1418
11. Paul J. Farrell. p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines. *The EMBO Journal* vol.10 no.10 pp.2879-2887, 1991.
12. Matsuoka, S. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* (Wash. DC), 282: 1893–1897, 1998.
13. Brown A. L. A human Cds1-related kinase that functions downstream of ATM protein in the cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 3745–3750, 1999.
14. Liu, Q. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.*, 14: 1448–1459, 2000.
15. Aziz Sancar. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 2004. 73:39–85
16. Chaturvedi P. Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene*, 18: 4047–4054, 1999.
17. Jinwoo Ahn and Carol Prives. Checkpoint Kinase 2 (Chk2) Monomers or Dimers Phosphorylate Cdc25C after DNA Damage Regardless of Threonine 68 Phosphorylation. *The J. of Biological Chemistry*. Vol. 277, No. 50, pp. 48418–48426, 2002
18. Peng, C. Y. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* (Wash. DC), 277: 1501–1505, 1997.
19. Yang, J. Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-

3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *The EMBO J.*,18: 2174 – 2183, 1999.

20. Christopher J. Lord. Targeting the Double-Strand DNA Break Repair Pathway as a Therapeutic Strategy,. *Clin Cancer Res* 2006;12(15) (August 1, 2006)

21. Hirao, A. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* (Wash. DC), 287: 1824–1827, 2000.

22. Shieh, S. Y. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.*, 14: 289 –300, 2000.

23. Chehab, N. H. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53. *Genes Dev.*, 14: 278 –288,2000.

24. Chehab, N. H. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 13777–13782, 1999.

25. Atsushi Hirao, *et al.* DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2. *Science* 287, 1824 (2000).

26. Kaoru Tominaga. Role of Human Cds1 (Chk2) Kinase in DNA Damage Checkpoint and Its Regulation by p53. *The J. Biol. Chem.* Vol. 274, No. 44. pp. 31463–31467, 1999

27. Bunch, R. T., and Eastman, A. Enhancement of cisplatin-induced cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01), a new G2-checkpoint inhibitor. *Clin Cancer Res.*, 2: 791–797, 1996.

28. Wang, Q. UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. *J. Natl. Cancer Inst.* (Bethesda), 88: 956–965, 1996.

29. Shao, R. G. Abrogation of an S-phase checkpoint and potentiation of camptothecin cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in human cancer cell lines, possibly influenced by p53 function. *Cancer Res.*, 57: 4029–4035, 1997

30. Anne Monks. UCN-01 enhances the *in vitro* toxicity of clinical agents in human tumor cell lines. *Investigational New Drugs* 18: 95–107, 2000.

31. Hickson I, et al. Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res* 2004;64:9152-9.
32. Pavel G. Komarov, *et al.* A Chemical Inhibitor of p53 That Protects Mice from the Side Effects of Cancer Therapy. *Science* 285, 1733 (1999)
33. Patrick J. M. Murphy. Pifithrin-a Inhibits p53 Signaling after Interaction of the Tumor Suppressor Protein with hsp90 and Its Nuclear Translocation. *The J of Biological Chemistry*. Vol. 279, No. 29, pp. 30195–30201, 2004