

Progetto di ricerca: Modelli murini di progressione e terapia mirata del cancro mammario umano.

Assegnista: Dott.ssa Marianna Lucia Ianzano

Tutor: Prof. Pier-Luigi Lollini

Laboratorio di Immunologia e Biologia delle Metastasi, Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale.

1. Valutazione della risposta a terapie mirate contro HER2 in *patient derived xenografts* di carcinoma mammario HER2 positivo

L'attività di ricerca è stata finalizzata allo studio dei meccanismi che potrebbero essere coinvolti nella progressione tumorale del carcinoma mammario HER-2 positivo in un modello murino fortemente immunodeficiente (topi NOD-SCID-IL2rg^{-/-}, NSG o BALB/cRag2^{-/-}Il2rg^{-/-}, RGKO), utile per valutare la progressione di carcinomi mammari HER2-positivi derivanti da impianto di campioni clinici (Patient-Derived Xenograft) e per studiare le vie di segnalazione attivate.

Nell'ambito di una collaborazione con il Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna (Prof. Mario Taffurelli, Prof.ssa Donatella Santini, Dott. Claudio Ceccarelli) e l'Ospedale Bellaria di Bologna (Prof.ssa Maria Pia Foschini) sono stati ricevuti ed impiantati in sede ortotopica in topi immunodeficienti 66 prelievi rappresentativi dei principali sottotipi intrinseci di carcinoma mammario con una percentuale di attecchimento del 14%. Per il 56% dei prelievi attecchiti si è resa inoltre possibile la propagazione *in vivo*, generando 5 linee di PDX mammari. In questo primo anno, tale progetto si è focalizzato sulla caratterizzazione istologica e molecolare di tali linee di PDX e ha inteso verificare l'ottenimento di modelli stabili, che possano essere utilizzati per lo studio pre-clinico di terapie mirate contro HER2.

I tumori di origine delle 5 linee PDX FO4, TA45, TA18, TA7 e TA51 sono carcinomi duttali infiltranti di grado III e presentano alto indice proliferativo. I tumori differiscono tuttavia per il sottotipo intrinseco, essendo il TA18 e il TA7 due luminali B (ER+, PR-, HER2-), il FO4 e il TA45 un carcinoma mammario HER-2 positivo (ER-, PR-, HER-2+) e il TA51 un triplo negativo. Al fine di ottenere delle linee di PDX stabili, sono state analizzate le caratteristiche istologiche e di crescita *in vivo* di tumori di passaggi seriali successivi. I dati di crescita *in vivo* unitamente a quelli forniti dalle rispettive Anatomie Patologiche hanno mostrato una sostanziale conservazione del fenotipo iniziale nella propagazione *in vivo*. Sono stati quindi ottenuti modelli stabili nel tempo e con caratteristiche analoghe al carcinoma originale.

I PDX FO4, TA45 e TA18, a differente espressione di HER2, sono stati selezionati per studiare la sensibilità al neratinib *in vivo*, un pan-HER inibitore tirosin chinasi che potrebbe affiancarsi alle terapie mirate contro HER2 attualmente in uso nella pratica clinica o intervenire in casi di farmacoresistenza. Il TA18 è classificato come luminale ma esprime HER2 con *score* 2+ e può quindi essere classificato anche come *HER2-enriched*. Per valutare la capacità del neratinib di inibire la crescita tumorale, il trattamento è stato condotto per almeno 15 settimane consecutive; esso è stato poi interrotto per valutare la comparsa di ricadute tumorali e la selezione di eventuali varianti HER2 negative. Nella linea PDX TA18 il neratinib è risultato inefficace nell'arrestare e nel rallentare la crescita tumorale invece nella linea PDX TA45 il trattamento con neratinib è stato in grado di far regredire la massa tumorale e di arrestarne completamente la crescita per tutta la sua durata. Al termine del trattamento, tuttavia, la massa tumorale si è ripresentata.

La sensibilità al neratinib della linea PDX FO4 è stata valutata in passaggi seriali diversi di questo tumore. Il PDX FO4 a basso passaggio (IV-VI) è sensibile al neratinib che ha portato a regressione completa la massa tumorale o ne ha contenuto la crescita a volumi < 0.5 cm³ per tutta la durata del trattamento, che in questo caso è stato protratto per 33-39 settimane. Al termine del trattamento, tuttavia, la massa tumorale si è ripresentata e gli animali raggiungevano rapidamente il volume di 1.5 cm³ (3-10 settimane dalla fine del trattamento). Al XII passaggio, il neratinib è stato in grado di

far regredire completamente i tumori FO4 in trattamento. L'effetto del farmaco si è mantenuto nel tempo e un solo animale (33%) ha ripresentato una crescita tumorale che ha raggiunto il volume di 1.5 cm³ dopo 20 settimane dalla fine del trattamento. Gli altri animali del gruppo sono tuttora negativi ed in osservazione. I trattamenti con neratinib, condotti per 16-17 settimane, nella linea PDX FO4 ad alto passaggio (XXI-XXII passaggio) hanno arrestato o contenuto la crescita dei tumori a volumi < 0.5 cm³ per tutta la loro durata. Il trattamento farmacologico era stato appena interrotto al momento di scrivere questa relazione, e gli animali sono in osservazione per la comparsa di ricadute tumorali.

2. Perdita di HER2: ruolo di PDGFR- β in topi transgenici per HER2 umano

Uno dei meccanismi di resistenza alle terapie mirate contro HER2 è rappresentato dalla perdita del bersaglio terapeutico o dell'*oncogene-addiction*, cioè della dipendenza da questo oncogene per il mantenimento del fenotipo maligno. La perdita dell'espressione di HER2 è un problema clinico e una conversione negativa rispetto al tumore primario è stata osservata nelle metastasi locoregionali e a distanza o nelle ricadute nel 13-24% dei casi. Non è tuttavia ancora ben definito il meccanismo alla base di questa perdita di espressione.

Nel Laboratorio di Biologia ed Immunologia delle metastasi diretto dal Prof. Pier-Luigi Lollini, è stato messo a punto un modello di perdita di HER2 costituito da linee cellulari derivate da tumori insorti in topi FVBhuHER2 e caratterizzate da una diversa dinamica dell'espressione di HER2. Le tre principali linee cellulari che costituiscono questo modello sono caratterizzate da un'espressione di HER2 alta e stabile (HER2^{stable}), oppure alta ma labile *in vitro* ed *in vivo* (HER2^{labile}), oppure assente (HER2^{loss}). La linea HER2^{labile} inoculata *in vivo* ha dato origine a un tumore completamente HER2 negativo, da cui è stata ottenuta e stabilizzata *in vitro* la linea HER2^{loss}. Alla diversa dinamica di espressione di HER2 si associava nelle linee del nostro modello una diversa morfologia, che era poligonale nelle linee HER2^{stable} ed HER2^{labile} ma fusata nella linea HER2^{loss}.

Data la diversa morfologia delle linee HER2^{stable} ed HER2^{loss}, esse erano state confrontate in precedenza per l'espressione di marcatori associati alla transizione epitelio-mesenchima tramite un PCR Array. Quest'analisi aveva individuato i geni *Dsp*, *Fgfbp1*, *Ocln*, *Cdh1* e *Il1rn* come down-regolati nella linea HER2^{loss} rispetto alla linea HER2^{stable} mentre i geni *Col3a1*, *Col5a2*, *Mmp2*, *Sparc*, *Vcan*, *Igfbp4* e *PDGFR-B* erano up-regolati nella linea HER2^{loss} rispetto alla linea HER2^{stable}. Tra questi, PDGFR-B (*platelet derived growth factor beta*) è un recettore tirosin chinasi dei fattori di crescita PDGFB e PDGFD; dati di letteratura ne correlano l'elevata espressione in carcinomi mammari con una ridotta sopravvivenza generale e libera da malattia (Paulsson et al, 2009), con un'attività favorente la crescita di cellule dello stroma e dei vasi sanguigni, con l'espansione della popolazione staminale e con la resistenza farmacologica (Meng et al, 2015). Durante l'attività di ricerca è stata valutata, tramite citofluorimetria, l'espressione in membrana di PDGFR-B. Tale analisi ne ha confermato l'espressione, seppur a bassi livelli, nella sola linea HER2^{loss}, mentre non si riscontrava alcuna espressione di PDGFR-B nelle linee HER2^{stable} ed HER2^{labile}. La linea HER2^{loss} è stata scelta come sistema modello per studiare l'efficacia di inibitori di questo recettore che possano sostituirsi alle terapie mirate contro HER2 in tumori mammari che ne abbiano perso l'espressione. In tal senso il sunitinib, un inibitore tirosin-chinasi multivalente, si è rivelato il farmaco più efficace nel bloccare la crescita della linea HER2^{loss} *in vitro* sia in aderenza (coltura 2D) sia in condizioni di crescita ancoraggio-indipendenti (coltura 3D in soft agar). L'analisi di sensibilità al farmaco è quindi stata estesa alle linee HER2^{stable} ed HER2^{labile}. In

coltura 2D, la sola linea HER2^{loss} si è dimostrata sensibile al sunitinib dopo 72h di trattamento con un IC50 compreso tra 1 e 5 µM. Per quanto riguarda la valutazione della crescita in coltura 3D (soft-agar), tutte le linee hanno mostrato una discreta sensibilità al sunitinib 5 µM, intorno al 40%. Inoltre le linee HER2^{stable}, HER2^{labile} ed HER2^{loss} sono state mantenute in coltura continua in terreno condizionato con sunitinib 5 µM per 30 giorni. La linea HER2^{stable} si dimostrava anche in questo caso non sensibile al farmaco alla dose 5 µM e manteneva una morfologia poligonale per tutta la durata della coltura continua. La linea HER2^{labile} sul lungo periodo era invece sensibile al sunitinib 5 µM con l'80% di inibizione rispetto al solvente del farmaco. Il sunitinib inoltre alterava la morfologia cellulare rendendo le cellule slargate e vacuolate. Infine la linea HER2^{loss} si dimostrava inizialmente sensibile al sunitinib 5 µM con percentuali di inibizione 25-35%. Il farmaco ne alterava inoltre la morfologia rendendo le cellule meno fusate. Nel corso della coltura continua l'effetto del farmaco sia sulla resa sia sulla morfologia cellulare veniva invece quasi completamente perso. Riassumendo, *in vitro* la linea HER2^{loss} si rivelava la più sensibile al Sunitinib in tutte le condizioni valutate. Le linee HER2^{stable} ed HER2^{labile} erano insensibili al sunitinib in coltura 2D, tuttavia entrambe mostravano una certa sensibilità al farmaco in coltura 3D e la linea HER2^{labile} risultava sensibile anche in coltura continua. Occorre ricordare che il sunitinib è un inibitore tirosin-chinasico multivalente che, oltre a PDGFR-B inibisce anche la segnalazione dei recettori VEGF-R, c-Kit, Ret, CD114 e CD135, perciò la sensibilità della linea HER2^{stable} ed HER2^{labile} al farmaco potrebbe essere ascrivibile all'azione di sunitinib su un bersaglio diverso da PDGFR-B.

Pubblicazioni 2017

- Palladini A, Nicoletti G, Lamolinara A, Dall'Orta M, Balboni T, Ianzano ML, Laranga R, Landuzzi L, Giusti V, Ceccarelli C, Santini D, Taffurelli M, Di Oto E, Asioli S, Amici A, Pupa SM, De Giovanni C, Tagliabue E, Iezzi M, Nanni P, Lollini PL. *HER2 isoforms co-expression differently tunes mammary tumor phenotypes affecting onset, vasculature and therapeutic response*. *Oncotarget*. 2017 Apr 13;8(33).

Congressi 2017

- A. Palladini, V. Giusti, L. Landuzzi, M.L. Ianzano, A. Lamolinara, M. Dall'Orta, T. Balboni, R. Laranga, P. Nanni, P.L. Lollini. *Loss of HER2 and gain of aggressiveness in HER2 positive mammary tumors: To go beyond anti-HER2 therapy*. EACR-AACR-SIC Special Conference 2017, Firenze (Italy).

Il sottoscritto Prof. Pier-Luigi Lollini, tutor della Dott.ssa Marianna Ianzano, esprime parere positivo sull'attività di ricerca svolta dalla Dott.ssa Marianna Ianzano nell'ambito del progetto di ricerca affidatogli.

Prof. Pier-Luigi Lollini

