

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE ED  
ONCOLOGIA**

**CICLO: XXVIII**

**TITOLO DELLA TESI: Attività antitumorale di pazopanib e  
trametinib in modelli preclinici di osteosarcoma.**

**TESI PRESENTATA DA: Dott. Danilo Galizia**

**TUTOR: Prof. Massimo Aglietta**

**COORDINATORE DEL DOTTORATO: Prof. Emilio Hirsch**

**ANNI ACCADEMICI: 2015-2016**

**SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE DI AFFERENZA:**

**Oncologia**

<b>RIASSUNTO</b> .....	4
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	7
<b>1.1 Osteosarcoma (OS)</b> .....	7
<b>1.2 Recettori tirosin-cinasi (RTK)</b> .....	8
<b>1.3 La via di trasduzione del segnale MAPK/ERK 1/2 nell'OS</b> .....	9
<b>1.4 La via di trasduzione del segnale PI3K/Akt nell'OS</b> .....	10
<b>1.5 Terapie a bersaglio molecolare</b> .....	11
<i>1.5.1 Pazopanib</i> .....	11
<i>1.5.2 Trametinib</i> .....	12
<b>2. SCOPO</b> .....	14
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	15
<b>3.1 Linee cellulari e farmaci</b> .....	15
<b>3.2 Analisi citofluorimetrica dell'espressione dei RTK (VEGFR 1-2-3, FGFR 1-3, c-Kit, PDGFR <math>\alpha/\beta</math>)</b> .....	15
<b>3.3 Estrazione proteica e Western Blot</b> .....	16
<b>3.4 Saggi di crescita della popolazione tumorale in vitro</b> .....	16
<b>3.6 Screening fosfo-proteomico (PROTEOME PROFILERS)</b> .....	17
<b>3.7 Modelli di xenotrapianti tumorali sottocutanei</b> .....	18
<b>3.8 Analisi statistica</b> .....	18
<b>4. RISULTATI</b> .....	19
<b>4.1 I bersagli molecolari di pazopanib sono espressi in linee cellulari di OS</b> .....	19
<b>4.2 Attivazione delle principali vie di trasduzione del segnale dei RTKs nelle linee di OS</b> .....	20
<b>4.3 Il trattamento combinato di pazopanib e trametinib determina la modulazione delle vie di trasduzione del segnale MAPK/ERK1/2 e PI3K/Akt</b> .....	20
<b>4.4 La combinazione di pazopanib e trametinib modula meccanismi alternativi di trasduzione del segnale</b> .....	21
<b>4.5 La combinazione di pazopanib e trametinib ha effetti antiproliferativi sinergici sulle linee cellulari di OS</b> .....	22
<b>4.6 Pazopanib e trametinib bloccano il ciclo cellulare e inducono apoptosi nelle linee di osteosarcoma</b> .....	24
<b>4.7 Attività antitumorale di pazopanib e trametinib in modelli murini</b> .....	27
<b>5.DISCUSSIONE</b> .....	28
<b>6.CONCLUSIONI</b> .....	32

<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>33</b>
<b>8. RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>37</b>

# RIASSUNTO

## Introduzione

L'osteosarcoma è la neoplasia primitiva dell'osso più frequente nei bambini e nei giovani adulti. L'età mediana di incidenza è 20 anni con un secondo picco nella popolazione anziana oltre i 65 anni. Purtroppo i pazienti affetti da malattia refrattaria o metastatica hanno ancora oggi prognosi infausta, poiché i trattamenti oncologici basati sulla chemioterapia hanno un impatto clinico poco rilevante. Infatti alla progressione di malattia le terapie di seconda linea o successiva, se clinicamente indicate, non raggiungono risultati significativi. Negli ultimi decenni, con l'impulso della terapia a bersaglio molecolare, è stata avviata l'esplorazione delle vie di trasduzione del segnale nell'osteosarcoma. Diversi studi hanno dimostrato il coinvolgimento dei recettori tirosin-cinasi quali i PDGFRs, VEGFRs, FGFRs e cKIT e delle loro vie di trasduzione del segnale nella patogenesi e nella progressione dell'osteosarcoma. Partendo da queste evidenze abbiamo ipotizzato che la combinazione di pazopanib, inibitore tirosin-chinasi ad ampio spettro (VEGFR1-2-3, FGFR 1-3, c-Kit, PDGFR $\alpha$ - $\beta$ ) e di trametinib, inibitore della via Ras-RAF-MEK-ERK1/2, possa avere efficacia terapeutica negli osteosarcomi in stadio avanzato.

## Obiettivi

- 1) Valutazione dell'espressione dei recettori tirosin-cinasi VEGFRs, FGFRs, PDGFRs, c-KIT e dell'attivazione delle loro principali vie di trasduzione del segnale in linee cellulari di osteosarcoma;
- 2) Identificazione delle tirosin-cinasi inibite in seguito al trattamento di linee cellulari di osteosarcoma con pazopanib e trametinib;
- 3) Studio dell'effetto antiproliferativo e dei fenomeni biologici ad esso correlati (inibizione del ciclo cellulare e induzione dell'apoptosi) *in vitro* dopo trattamento di linee cellulari di osteosarcoma con pazopanib e trametinib;
- 4) Studio dell'attività antitumorale della combinazione di pazopanib e trametinib in

xenotrapianti di osteosarcoma umano in topi NOD/SCID.

### **Disegno sperimentale e risultati.**

1) L'espressione di VEGFR1-2-3, FGFR1-3, c-Kit, PDGFR  $\alpha/\beta$  è stata analizzata in 7 linee cellulari di osteosarcoma, dimostrando che tali recettori sono espressi in tutte le linee ed in particolare, VEGFR3, PDGFR  $\beta$ , FGFR2 a livelli più elevati. Inoltre, saggi di western blot dimostrano che le principali vie di trasduzione del segnale ERK1/2 e Akt a valle di questi recettori sono attive. Il trattamento con pazopanib e trametinib come agenti singoli e in combinazione ha portato a una diversa modulazione di queste vie nelle diverse linee cellulari esplorate. Rispetto alle condizioni basali, la via di ERK1/2 risulta attivata dopo il trattamento con pazopanib, mentre la via di Akt risulta inibita. Viceversa, trametinib come agente singolo inibisce specificamente ERK1/2 ma aumenta la fosforilazione di Akt. Tuttavia, la combinazione di entrambi i farmaci permette di ottenere la completa inibizione sia ERK1/2 che di Akt.

2) Al fine di approfondire il meccanismo di azione della combinazione di pazopanib e trametinib è stato allestito un saggio di *proteome profiler* per la valutazione della fosforilazione di 43 chinasi in esperimenti selezionati. In particolare la fosforilazione di ERK 1/2, Akt, c-JUN, PDGFR  $\beta$ , PRAS40, STAT2, WNK1 e GSK-3  $\alpha/\beta$  risulta inibita in maniera significativa dopo il trattamento con la combinazione.

3) Per verificare l'effetto antitumorale di pazopanib e trametinib *in vitro* e *in vivo* sono stati effettuati saggi di vitalità cellulare e di crescita dopo trattamento con diluizione scalari dei farmaci pazopanib, trametinib e della loro combinazione. È stato dimostrato che la combinazione inibisce in maniera significativa la crescita e la vitalità cellulare in maniera dose e tempo dipendente. Tale inibizione è dovuta principalmente all'induzione dei fenomeni apoptotici (5 su 7 linee cellulari) o al blocco del ciclo cellulare (2 su 7 linee cellulari).

4) L'attività antitumorale della combinazione è stata valutata anche *in vivo* in modelli murini di xenotrapianto della linea cellulare di osteosarcoma umano MNNG-HOS. Topi NOD/SCID sono stati sottoposti al trapianto di  $10^6$  cellule nel tessuto sottocutaneo del fianco destro e dopo una settimana suddivisi in gruppi e trattati 1) con il solo veicolo, 2) con pazopanib 40 mg/kg/giorno, 3) con trametinib 0,1 mg/kg/giorno o 4) con la loro

combinazione per 5 giorni/settimana per 3 settimane. È stato possibile osservare che al termine dell'esperimento, il volume tumorale nel gruppo di topi trattati con la combinazione di pazopanib e trametinib è risultato essere ridotto in maniera statisticamente significativa rispetto ai gruppi di trattamento con i singoli farmaci e il controllo non trattato.

## **Conclusioni**

In conclusione, il trattamento combinato con pazopanib e trametinib dimostra attività antitumorale in modelli preclinici di osteosarcoma coinvolgendo le cinasi ERK 1/2, Akt, c-JUN, PRAS40, PDGFR  $\beta$ , STAT2, WNK-1 e GSK-3  $\alpha/\beta$ . Tali risultati supportano il disegno di uno studio clinico di fase II volto a dimostrare l'efficacia antitumorale di tale approccio in pazienti affetti da osteosarcoma allo stadio avanzato. Sarà inoltre importante includere indagini molecolari volte all'identificazione dei sottotipi di pazienti che ne possano meglio beneficiare.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Osteosarcoma (OS)

L'osteosarcoma (OS) è la neoplasia primaria dell'osso più comunemente diagnosticata<sup>1</sup>. L'incidenza varia a seconda del genere, della razza e dell'età; si sviluppa in tutti i gruppi di età ma è più frequente negli adolescenti e nei giovani adulti: è più comune nei maschi rispetto alle femmine e colpisce di più la popolazione nera o gli ispanici rispetto alla popolazione bianca; l' OS ha un secondo picco di incidenza nei soggetti con più di 50 anni. Nei pazienti giovani insorge nella porzione metafisaria delle ossa lunghe come il femore distale, la tibia prossimale e l'omero prossimale, ma possono essere coinvolte anche le ossa piatte come la mascella e la pelvi<sup>1</sup>. Contribuiscono alla patogenesi dell'osteosarcoma determinate condizioni quali: scatto di crescita delle ossa nei bambini e adolescenti; mutazioni nel gene p53; alterazioni nel gene della proteina oncosoppressoria del retinoblastoma Rb<sup>2</sup>. L' OS origina da osteoblasti che producono ossa immature o tessuto osteoide e può essere suddiviso a seconda dell'istotipo nella forma centrale a basso grado (la più comune), periostale, periosteale, condroblastica e a piccole cellule<sup>3</sup>. I polmoni rappresentano la sede metastatica più frequente<sup>1</sup>.

Negli ultimi anni l' approccio combinato di chirurgia, chemioterapia e radioterapia nella malattia localizzata rispetto alla sola chirurgia ha reso possibile raggiungere un tasso di sopravvivenza globale a 5 anni del 70%<sup>1</sup>. In particolare in questo contesto clinico la risposta alla chemioterapia neoadiuvante è il principale fattore predittivo di sopravvivenza globale. Purtroppo però i pazienti affetti da malattia recidivante o metastatica non operabile continuano ad avere una prognosi infausta con un tasso di sopravvivenza globale a 5 anni del 20%. Per questi pazienti si rende necessaria la ricerca di nuove strategie terapeutiche e la terapia a bersaglio molecolare potrebbe offrire importanti opportunità.

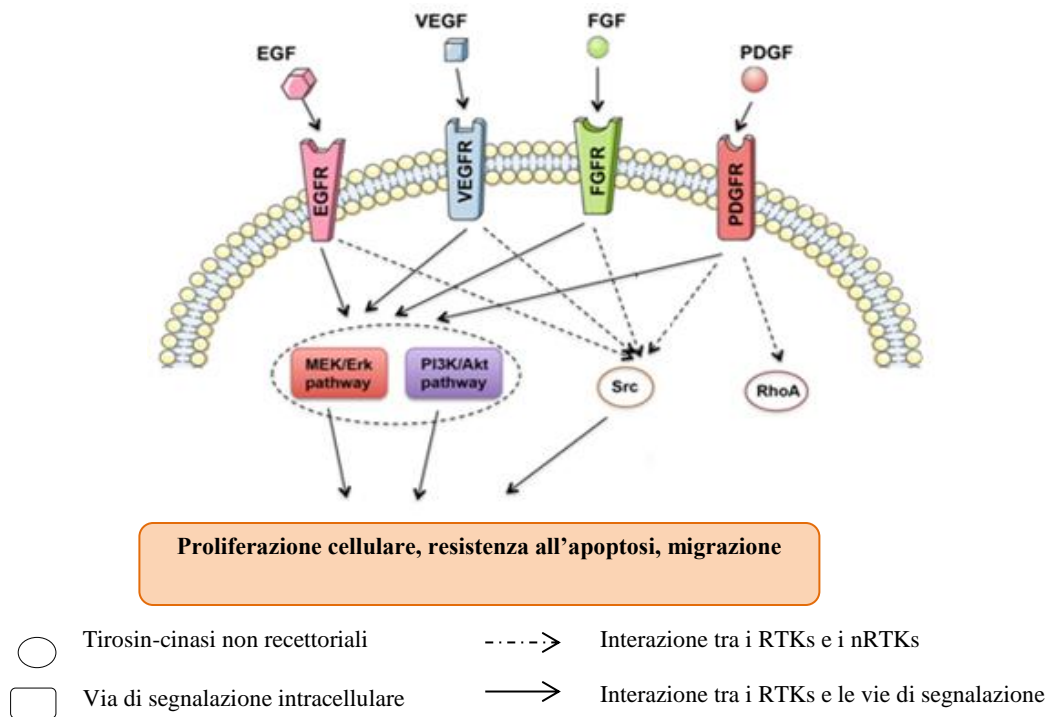
## 1.2 Recettori tirosin-cinasi

Le tirosin-chinasi (TKs) sono una famiglia di proteine che svolgono funzioni importanti nella regolazione di un'ampia varietà di processi cellulari. L'iperattività delle TKs è coinvolta nello sviluppo di diverse forme tumorali, come conseguenza della disregolazione dell'omeostasi cellulare e di un'aumentata proliferazione<sup>4</sup>.

Le TKs possono essere divise in due sottogruppi, i recettori tirosin-cinasi (RTKs) e le tirosin-cinasi non recettoriali (nRTKs), entrambe coinvolte nei meccanismi di trasduzione del segnale<sup>4</sup>. I RTKs sono singole proteine transmembrinarie costituite da una porzione extracellulare di legame con il ligando specifico (fattore di crescita) e un dominio intracitoplasmatico contenente il sito catalitico tirosin-cinasi<sup>4</sup>. In seguito al legame con il ligando, avviene la dimerizzazione di due monomeri RTK e l'autofosforilazione del dominio intracellulare, che genera una cascata segnalatoria intracitoplasmatica costituita da: reclutamento in membrana di proteine trasduttrici del segnale e nRTKs<sup>4</sup>.

E' stato dimostrato che specifici RTKs sono coinvolti nella patogenesi dell' OS, in particolare i recettori del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (*vascular endothelial growth factor receptors*, VEGFRs), il recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine (*platelet-derived growth factor receptor*, PDGFRs), i recettori del fattore di crescita fibroblastico (*fibroblast growth factor receptors*, FGFRs), i recettori del fattore di crescita epidermico (*epidermal growth factor receptor*, EGFRs) e i recettori del fattore di crescita insulino-simile (insulin growth factor, IGFs)<sup>1,5,6</sup>. Mentre tra i nRTKs sono state descritte la tirosin-cinasi pro-oncogenica (proto-oncogene tyrosine-protein kinase, v-Src) e un gene omologo della famiglia Ras (Ras homolog gene family, member A, RhoA), le protein-cinasi attivate dai mitogeni (*mitogen-activated protein kinase*, MAPKs), le cinasi attivate da mitogeni extracellulari (*mitogen extracellular kinase*, MEK1/2) e le cinasi regolate da stimoli extracellulari (*extracellular regulated kinase*, ERK1/2), la fosfatidilinositolo 3 cinasi (PI3K) e la proteina Akt (**Figura 1**).





**FIGURA 1. Recettori tirosin-cinasi e cinasi non recettoriali coinvolte nella patogenesi e nella progressione dell'osteosarcoma:**

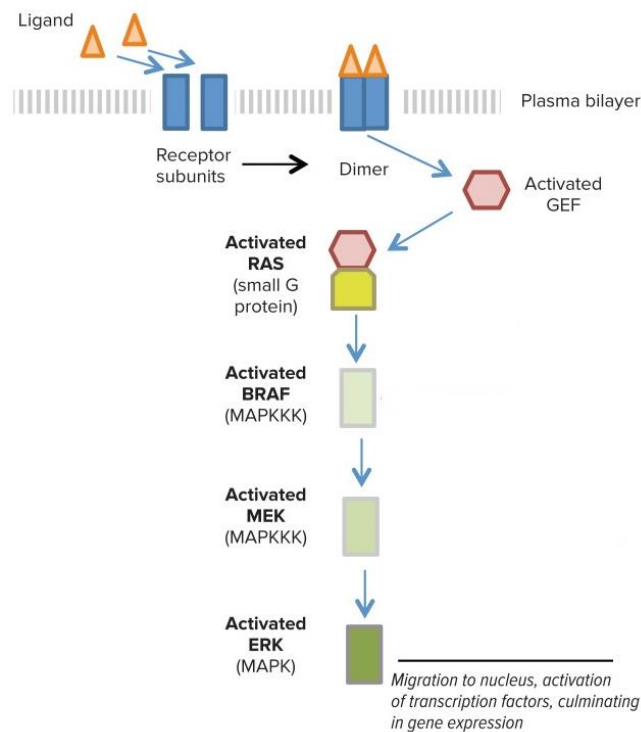
Immagine tratta e modificata da Xu A. M et al. *Receptor tyrosin kinase coactivation network in cancer*. Cancer Res. 2010.

### 1.3 La via di trasduzione del segnale MAPK/ERK 1/2 nell'OS

Recenti studi hanno dimostrato che la via delle chinasi attivate dai mitogeni - mitogen-activated protein kinases, MAPK/ERK1/2 - (nota anche come via RAS-RAF-MEK-ERK) è fosforilata in maniera anomala in un' elevata percentuale di osteosarcomi<sup>7</sup>. La trasduzione del segnale mediante la via di ERK1/2, una volta avvenuto il legame del fattore di crescita extracellulare con lo specifico RTK, implica il reclutamento delle proteine adattatrici scambiatori nucleotidici (GTP exchange factors GEFs) che attivano la proteina RAS. RAS è inattivata se legata al guanosildifosfato (GDP), e lo scambiatore GEF sposta il GDP dalla proteina RAS consentendole il successivo legame con GTP. RAS ha attività GTPasica che scinde GTP in GDP riportando nuovamente lo stato inattivato.

RAS attivato a sua volta determina l'attivazione delle proteine-chinasi-chinasi-chinasi attivate da mitogeni (MAPKKK) di cui fa parte RAF. Le MAPKKK facilitano la fosforilazione delle

seconde proteine chinasi della cascata note come MAPKK (tra cui MEK). Le MAPKK attivano le terze e ultime chinasi della cascata, le MAPK (tra cui ERK 1 e 2), le quali in seguito a traslocazione nucleare, attivano la trascrizione di importanti geni coinvolti nella proliferazione cellulare (**Figura 2**)<sup>8</sup>.



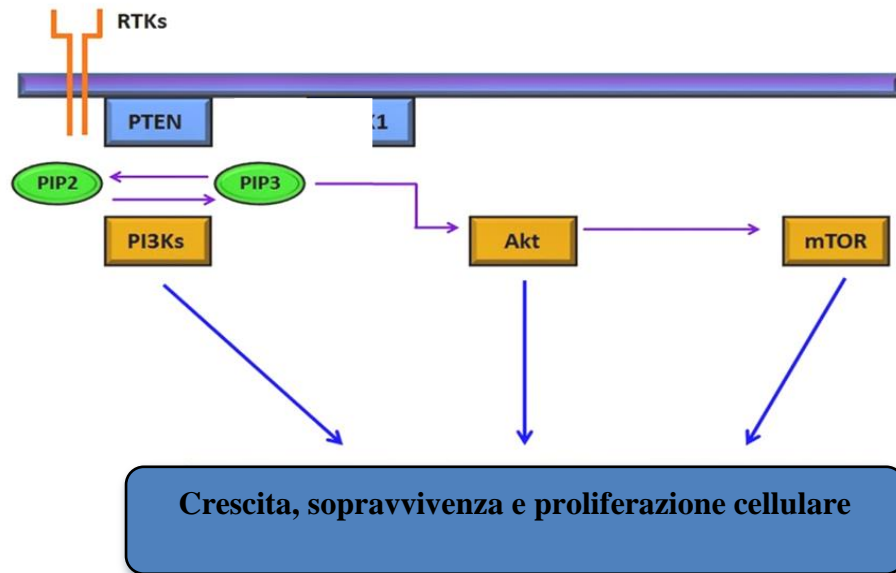
**FIGURA 2: Schematizzazione della via di trasduzione del segnale MAPK/ERK1/2.**

Immagine tratta e modificata da McCain J. *The MAPK (ERK) Pathway. Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma*. PT v.38(2); 2013.

#### 1.4 La via di trasduzione del segnale PI3K/Akt nell'OS

La trasduzione del segnale proliferativo e di sopravvivenza cellulare è sostenuta da una seconda importante via: la via PI3K/Akt. Evidenze sperimentali hanno dimostrato che questa via di segnalazione è risultata essere coinvolta nello sviluppo e progressione dell'OS<sup>9</sup>.

La trasduzione del segnale è sostenuta dal reclutamento in membrana delle PI3K di classe IA, che fosforilano il fosfatidilinositolo bifosfato (PIP2) in fosfatidilinositolo trifosfato (PIP3), tale attivazione è revertita dalla fosfatasi PTEN. PIP3 attiva e recluta in membrana Akt che a sua volta fosforila la proteina di mammifero bersaglio di rapamicina (*mammalian target of rapamycin*, mTOR) (**Figura 3**)<sup>10</sup>.



**FIGURA 3: Via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR.**

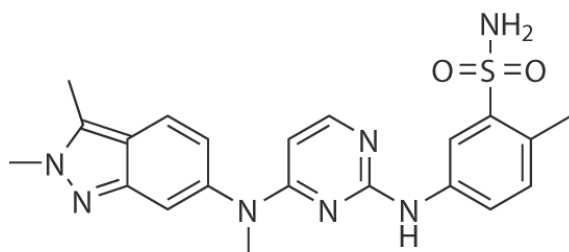
tratta e modificata da Nguyen H.P, et. al. *Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in Acute Myeloid Leukemia*. Vietnam Journal of Science 2015<sup>11</sup>.

## 1.5 Terapie a bersaglio molecolare

Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi inibitori specifici per i RTKs e, di più recente introduzione sul mercato, molecole inibenti specifici nRTKs. Nonostante incoraggianti risultati preclinici<sup>12</sup> al momento nessuno di essi ha ottenuto l'approvazione all'uso clinico per il trattamento di forme metastatiche e recidivanti di OS. La modulazione di VEGFRs, FGFRs, c-KIT e PDGFRs e le loro principali vie di trasduzione del segnale potrebbero indurre efficace risposta in specifici sottotipi molecolari di OS.

### 1.5.1 Pazopanib

Pazopanib (Votrient), 5-[[4-[(2,3-Dimetil-2H-indazol-6-il)(metil)amino]pirimidin-2-il]amino]-2-metilbenzenesulfonamide monoidrocloride (**Figura 4**) è un inibitore del dominio tirosin-chinasico dei recettori VEGFR1/2/3, PDGFR  $\alpha,\beta$ , c-KIT<sup>13</sup>.



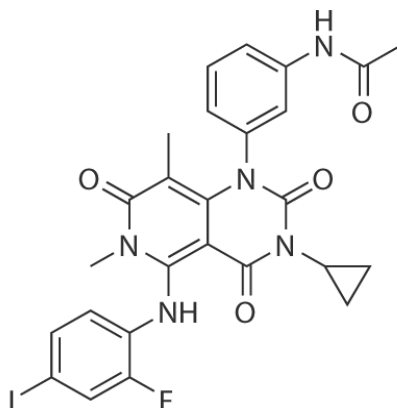
**FIGURA 4: Formula di struttura del farmaco pazopanib<sup>14</sup>.**

Pazopanib è approvato per il trattamento dei pazienti con carcinoma renale avanzato ed ha un sicuro profilo di tossicità<sup>15,16</sup>. Inoltre, lo studio PALETTE, trial clinico multicentrico di fase III randomizzato, in doppio cieco ha portato alla registrazione di pazopanib per l'uso clinico in pazienti affetti da sarcoma dei tessuti molli, salvo gli istotipi derivanti da cellule adipose. Tale studio ha coinvolto 369 pazienti, trattati in rapporto 2:1 con pazopanib alla dose giornaliera di 800 mg/die o placebo<sup>17</sup>.

### 1.5.2 Trametinib

Trametinib (GSK1120212) è inibitore allosterico reversibile, altamente selettivo, di MEK 1/2, somministrabile per via orale.

La nomenclatura chimica del farmaco è N-[3-[3-ciclopropil-5-(2-fluoro-4-iodoanilino)-6,8-dimetil-2,4,7-triossopirido[4,3-d]pirimidin-1-il]fenil]acetamide<sup>14</sup>, la cui formula di struttura è indicata nella **Figura 5**.



**FIGURA 5: Formula di struttura del farmaco trametinib<sup>14</sup>.**

La specificità dell'azione antitumorale di trametinib è dovuta alla particolare dipendenza delle cellule tumorali, altamente proliferanti, dall'attivazione della via MAPK/ERK1/2 rispetto alle cellule normali che esprimono bassi livelli di p-ERK.

Trametinib è stato approvato nel 2013 dalla FDA per il trattamento del melanoma metastatico con mutazione di BRAF non trattato in precedenza con inibitori di BRAF<sup>18</sup>, inoltre gli studi registrativi randomizzati di fase III COMBI-d e COMBI-v, dimostrano che la combinazione di trametinib con dabrafenib, inibitore di BRAF, ha un vantaggio in termini di aumento della sopravvivenza di pazienti con melanoma metastatico BRAF mutato<sup>19</sup>.

In precedenti studi preclinici condotti su modelli di OS, è stato osservato che nonostante gli inibitori di MEK 1/2 inibiscano l'attivazione di ERK, l'attività antitumorale non è così potente<sup>20</sup>, suggerendo che in queste neoplasie possa essere utile la combinazione con altri inibitori tirosin-cinasi.

## 2. SCOPO

La prognosi dei pazienti affetti da osteosarcoma recidivante o metastatico dopo fallimento della chemioterapia convenzionale è infausta. Lo studio delle vie di trasduzione del segnale proliferativo in modelli preclinici di osteosarcoma ha reso possibile identificare potenziali bersagli molecolari per l'applicazione di terapie mirate. E' stato dimostrato che l'inibizione di specifici recettori tirosin-cinasi con le loro vie di trasduzione possa essere una strada da perseguire, dimostrando attività nel modello preclinico e numerosi successi nei trial clinici di fase II.

Lo scopo di questo lavoro è quello di esplorare l'inibizione di recettori tirosin-cinasi VEGFRs, FGFRs, PDGFRs, c-KIT e delle loro vie di trasduzione del segnale MAPK/ERK1/2, PI3K/AKT con la combinazione di pazopanib e trametinib, valutandone l'effetto antitumorale sia *in vitro* che *in vivo* in modelli di osteosarcoma.

La fase sperimentale è stata suddivisa in 4 parti principali:

- i) Valutazione dell'espressione dei recettori tirosin-cinasi VEGFRs, FGFRs, PDGFRs, c-KIT e l'attivazione delle loro principali vie di trasduzione del segnale in linee cellulari di osteosarcoma;
- ii) Screening fosfo-proteomico per l'identificazione delle tirosin-cinasi inibite in seguito al trattamento di linee cellulari di osteosarcoma con pazopanib e trametinib in esperimenti selezionati;
- iii) Studio dell'effetto antiproliferativo e dei fenomeni biologici ad esso correlati (inibizione del ciclo cellulare e induzione dell'apoptosi) *in vitro* dopo trattamento di linee cellulari di osteosarcoma con pazopanib e trametinib;
- iv) Studio dell'attività antitumorale della combinazione di pazopanib e trametinib in xenotrapianti di osteosarcoma umano in topi NOD/SCID.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Linee cellulari e farmaci**

Le linee cellulari di osteosarcoma MG63, U2 OS, HOS, KHOS, SJSA-1, SAOS-2 e MNNG-HOS sono state acquistate dalla ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA), coltivate come suggerito dal fornitore in terreno di coltura DMEM HIGH GLUCOSE (EMEM per le MNNG) e utilizzate a passaggi precoci. Il terreno di coltura è stato supplementato con siero fetale di vitello al 10% in tutte le linee, salvo per SAOS-2 che è stato supplementato con FPS al 15%. Tutti i terreni sono stati supplementati con penicillina 100U/ml e streptomina 100 U/ml.

Il pazopanib utilizzato per gli esperimenti *in vitro* è stato acquistato da Sequoia Research Product (Pangbourne, Regno Unito), mentre trametinib dalla Selleck (Houston, Texas) e sono stati risospesi in dimetilsolfossido (DMSO) e conservati a -80°C. I farmaci utilizzati per gli esperimenti *in vivo*, sono stati acquistati entrambi dalla Sequoia Research Product. Il pazopanib utilizzato per il trattamento dei modelli murini è stato preparato risospendendo la polvere in 0,5% idrossipropilmetilcellulosa (Sigma-Aldrich 9963) con 1% Tween 80 (Sigma-Aldrich), pH da 1,3 a 1,5; mentre trametinib è stato risospeso in DMSO e diluito al momento in H<sub>2</sub>O e somministrati per via orale per tre settimane.

#### **3.2 Analisi citofluorimetrica dei recettori tirosin-cinasici (VEGFR 1-2-3, FGFR 1-3, c-Kit, PDGFR $\alpha/\beta$ )**

Le cellule sono state coltivate nel terreno di coltura ottimale per 24 ore e successivamente staccate con tripsina 0,01 %, lavate con tampone fosfato (PBS) 0.15 mol/L, pH 7.2 e centrifugate, al fine di eliminare ogni traccia di terreno e tripsina. Il precipitato cellulare è stato risospeso in PBS al quale sono stati aggiunti gli anticorpi primari specifici per VEGFR 1-2-3, FGFR 1-3, c-Kit, PDGFR  $\alpha/\beta$  direttamente coniugati con citocromi fluorescenti (PE, FITC, APC). Dopo un'incubazione di 20 minuti a temperatura ambiente e al buio, l'eccesso di anticorpo non legato alle cellule è stato eliminato mediante lavaggio in PBS e successiva

centrifugazione. Il segnale fluorescente è stato rilevato e analizzato mediante citofluorimetro DAKO CYANadp (Beckman Coulter) e software Summit versione 4.3.

### **3.3 Estrazione proteica e Western Blot**

Le cellule sono state trattate con pazopanib (5  $\mu\text{M}$ ) e trametinib (12,5 nM) come singoli agenti o in combinazione per 24 ore. I lisati proteici sono stati ottenuti mediante lisi a freddo. In particolare  $10^7$  cellule sono state incubate in ghiaccio con soluzione *Lysis Buffer 6* (R&D Systems) e sottoposte a lisi meccanica con *scraper*. I campioni sono stati mantenuti 30 minuti a 4°C in agitazione e poi centrifugati a 14,000 xg per 5 minuti a 4°C. Le proteine sono state quantificate con il metodo dell'acido bicinconinico (BCA Protein Assay, Thermo Scientific, Rockford, IL) e spettrofotometro multifunzione DTX880 (Beckam Coulter). Successivamente, 30  $\mu\text{g}$  di proteina sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel con gradiente 4–15% (Bio-Rad, Hercules, California, U.S.A). Il Trans-Blot Turbo Trasfer Pack è stato utilizzato per il trasferimento delle proteine su membrana di nitrocellulosa. Le membrane sono state decorate secondo protocollo standard usando i seguenti anticorpi primari e secondari: Anti-p-ERK 1/2 (Cell Signaling Technology Inc, Danvers, USA), Anti-ERK 1/2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), Anti-p-Akt (Cell Signaling Technology Inc, Danvers, USA), Anti-Akt (Cell Signaling Technology Inc, Danvers, USA), e vinculin (Sigma Aldrich, Missouri, USA), mediate incubazione di 16 ore. Dopo 3 lavaggi per rimuovere l'anticorpo primario sono stati aggiunti gli anticorpi secondari diretti in maniera specifica contro anticorpi di topo o coniglio e coniugati con enzima perossidasi di rafano (HRP). Poi dopo aver incubato le nostre membrane con il luminolo Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer Inc., Waltham, USA), il segnale di chemiluminescenza è stato rivelato mediante lo strumento Bio-Rad ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

### **3.4 Saggi di crescita della popolazione tumorale *in vitro***

Per il saggio di crescita le linee cellulari di osteosarcoma sono state posizionate in piastre da 96 pozzetti (1500 cellule/pozzetto). Dopo un giorno di crescita, le cellule sono state trattate con diluzioni scalari di pazopanib (20-0,625  $\mu\text{mol/L}$ ), trametinib (50-6,25 nmol/L) o la loro



combinazione costante. La vitalità cellulare è stata valutata dopo 72 ore con il kit Cell-Glo Luminescent (Promega). Questo metodo è basato sulla misurazione della produzione di ATP, poiché quest'ultima è proporzionale al numero di cellule vitali ed è valutabile tramite una reazione luciferina-luciferasi. Il segnale è stato rilevato usando GLOMAX 96 Microplate Luminometer (Promega). Le colonie cellulari sono state ottenute piastrando 500 cellule per ogni pozzetto in piastre da 12 pozzetti con terreno di coltura completo. Dopo 24 ore le colonie sono state trattate con pazopanib a concentrazioni scalari (10 – 2,5  $\mu\text{mol/L}$ ), trametinib (25-6,125  $\text{nmol/L}$ ) e la combinazione dei due farmaci. Dopo 7 giorni le colonie sono state colorate con cristal violetto allo 0,1% (Sigma-Aldrich) e le superfici formate sono state calcolate usando Image J software.

### **3.5 Analisi citofluorimetrica di ciclo cellulare e apoptosi**

Dopo aver trattato le cellule per 24 ore con pazopanib (10  $\mu\text{M}$ ), trametinib (25  $\text{nM}$ ) o la loro combinazione le cellule sono state raccolte e lavate con PBS, fissate in etanolo 70% e stoccate a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Il protocollo del ciclo cellulare comprende il lavaggio in PBS delle cellule, seguito da incubazione con propidio ioduro (PI, Sigma, 0.06  $\mu\text{g/ml}$ ) and RNase-1 (Roche, 1000  $\text{U/ml}$ ) e acquisizione al citofluorimetro per l'analisi del contenuto di DNA. Per quanto riguarda lo studio dell'apoptosi, è stata eseguita la colorazione con Annessina V-FITC e PI. Dopo trattamento farmacologico per 96 ore, le cellule sono state raccolte, lavate in PBS e risospese in binding buffer (100  $\text{mM}$  HEPES/NaOH,  $\text{pH}$  7.5, 1.4  $\text{M}$  NaCl e 25  $\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ) alla densità di  $1.0 \times 10^5$  cells per ml. Le cellule sono state centrifugate 1000 rpm per 5 min e risospese; 100  $\mu\text{l}$  di cellule risospese sono state incubate con 5  $\mu\text{l}$  di annessina V coniugata FITC (Biolegends) e 5  $\mu\text{l}$  di PI (Sigma Aldrich) per 15 minuti al buio a temperatura ambiente. I parametri fisici cellulari e il segnale fluorescente sono stati rilevati e analizzati mediante citofluorimetro DAKO CYANadp (Beckman Coulter) e software Summit versione 4.3.

### **3.6 Screening fosfo-proteomico (PROTEOME PROFILERS)**

Per ottenere lisati a freddo per i saggi di screening di fosfo-proteomica, sono state incubate in ghiaccio  $10^7$  cellule con Lysis Buffer 6 (R&D Systems) e sottoposte a lisi meccanica con un

raschietto. I campioni sono stati mantenuti per 30 minuti a 4°C in agitazione e successivamente centrifugati a 4°C, 14000 xg per 5 minuti. I lisati proteici ottenuti sono stati utilizzati per caricare il Proteome Profiler p-Kinase Array rispettando il protocollo del produttore. Il kit consiste di due membrane di nitrocellulosa contenenti specifici anticorpi per i siti di fosforilazione di 43 diverse cinasi. Le membrane sono state reidrate e dopo l'inibizione dei siti aspecifici sono state fatte reagire con i lisati proteici per 16 ore. Il giorno seguente sono state lavate per rimuovere le proteine non legate e successivamente trattate con anticorpi secondari biotinilati. Sono stati poi applicati la Streptavidina-HRP e un reagente chemiluminescente a base di luminolo. Il segnale di chemiluminescenza è stato rilevato mediante Bio-Rad ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

### **3.7 Modelli di xenotrapianti tumorali sottocutanei**

I topi NOD-SCID sono stati acquistati dalla ditta Charles River e mantenuti in condizioni di sterilità in gabbie con filtri, presso lo stabulario dell' Istituto di Candiolo, FPO - IRCCS rispettando la regolamentazione etica istituzionale (IRB) e il regolamento del Ministero della Salute (Aut. Min 178/2015-PR).  $1 \times 10^6$  MNNG-HOS sono state iniettate sottocute nel fianco destro di topi per lo studio dell'attività antitumorale dei farmaci. Dopo la randomizzazione i topi sono stati suddivisi in 4 gruppi di trattamento (4 topi per gruppo); topi che hanno assunto pazopanib come singolo agente, trametinib come singolo agente, la loro combinazione e il solo veicolo. E' stato seguito il seguente schema di trattamento: 40 mg/kg/giorno di pazopanib e 0,1 mg/kg/giorno di trametinib, per una durata complessiva di 21 giorni. Il volume tumorale è stato misurato mediante calibro settimanalmente.

### **3.8 Analisi statistica**

La statistica descrittiva - medie, deviazioni standard (SD) - e intervalli di confidenza al 95% (CI95%) sono stati calcolati utilizzando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.) su almeno tre replicati sperimentali. Le differenze fra i gruppi di trattamento sono state analizzate con il test t di Student a 2 code, con one way ANOVA e two way ANOVA con la correzione post-hoc di Bonferroni per test multipli usando GraphPad prism 5. La

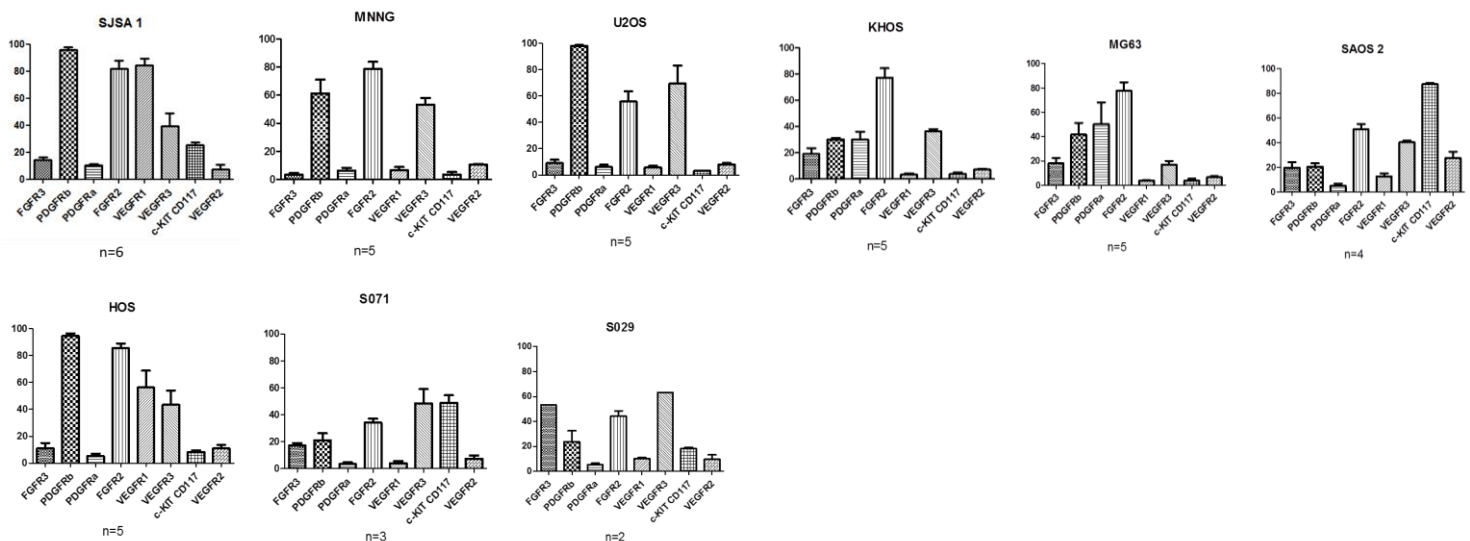
concentrazione inibente il 50% della crescita cellulare (IC50) con il suo intervallo di confidenza al 95% (CI95%) e il sinergismo dei farmaci, espresso come indice di combinazione (combination index) calcolato alla IC50 e la sua deviazione standard stimata (est SD) è stata calcolata mediante il software CalcuSyn (Biosoft) con il metodo di Chou-Talalay.

## 4. RISULTATI

### 4.1 I bersagli molecolari di pazopanib sono espressi in linee cellulari di OS

La prima fase di indagine esplorativa del progetto di tesi ha previsto la dimostrazione dell'effettiva espressione dei bersagli molecolari di pazopanib nei modelli preclinici di osteosarcoma selezionati (7 linee commerciali e 2 linee primarie).

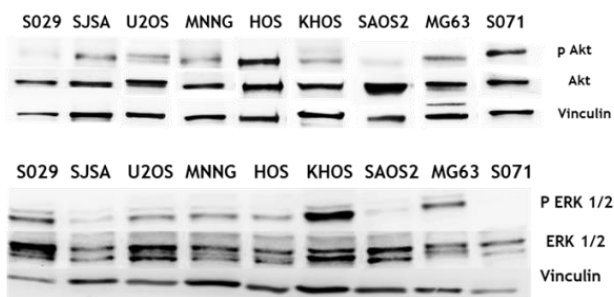
Dall'analisi citofluorimetrica dell'espressione dei RTKs: FGFR1-3, PDGFR  $\alpha/\beta$ , VEGFR1-3, c-KIT si evince che in tutte le linee di OS analizzate sono presenti i bersagli molecolari di pazopanib (**Figura A**). I livelli di espressione sono eterogenei, tuttavia PDGFR  $\beta$ , FGFR2, VEGFR3, sono risultati i recettori maggiormente espressi ( $60,3 \pm 34,7 \%$ ,  $68,2 \pm 18 \%$ ,  $40,0 \pm 10 \%$ , rispettivamente).



**Figura A: Espressione dei bersagli molecolari di pazopanib nelle linee cellulari di osteosarcoma**

## 4.2 Attivazione delle principali vie di trasduzione del segnale nelle linee di OS

Dopo aver dimostrato che i RTK bersagli di pazopanib sono espressi nei modelli cellulari di osteosarcoma, si è voluto verificare l'effettiva attivazione della loro principali vie di trasduzione del segnale PI3K/Akt e MAPK/ERK1/2. L'estrazione delle proteine totali dalle linee cellulari in condizioni basali di crescita e i successivi saggi di western blot dimostrano che i siti attivi di Akt (Ser243) e ERK1/2 (Thr202 e Tyr204) sono fosforilati in 7 su 9 (78%) e in 6 su 9 (67%), rispettivamente (**Figura B**). In 5 su 9 (55%) linee cellulari di OS le vie di trasduzione di Akt e ERK1/2 sono attive contemporaneamente (**Figura B**).



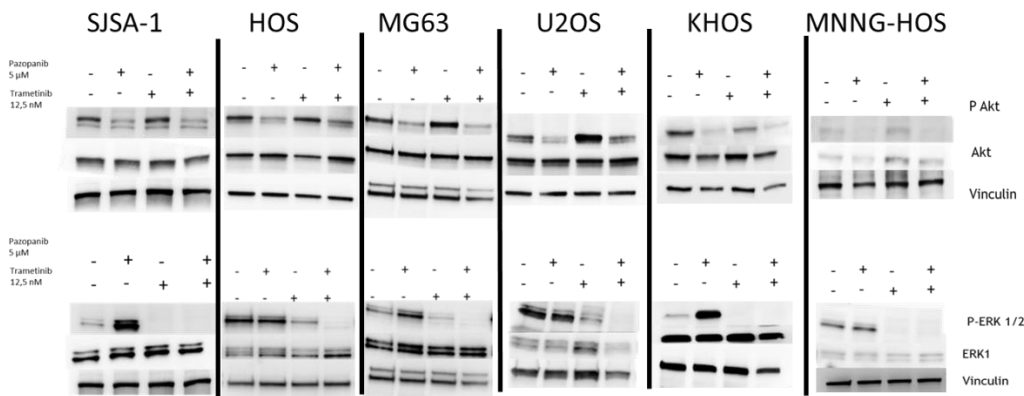
**Figura B: Western blot rappresentativo dell'espressione in condizioni basali di p-ERK1/2 e di p-Akt nelle linee di OS in condizioni basali di crescita; vinculina è stata usata come proteina di controllo di espressione.**

## 4.3 Il trattamento combinato di pazopanib e trametinib determina la modulazione delle vie di trasduzione del segnale MAPK/ERK1/2 e PI3K/Akt

Nei modelli cellulari di osteosarcoma le vie di trasduzione del segnale MAPK/ERK1/2 e PI3K/Akt sono attivate in condizioni basali. Abbiamo quindi verificato se il farmaco pazopanib e il farmaco trametinib siano in grado di modulare tali vie di segnalazioni in questi modelli. Dopo 24 ore di trattamento con pazopanib (5 $\mu$ M), trametinib (12,5 nM) e la loro combinazione sono state estratte le proteine totali e analizzati mediante western blot i siti di fosforilazione attivanti Akt ed ERK1/2. Come agente singolo pazopanib ha indotto l'inibizione

di p-Akt in tutte le linee cellulari testate ma l'attivazione di p-ERK1/2 in tutte le linee analizzate (**Figura C**). Trametinib come agente singolo ha ridotto la fosforilazione di ERK1/2 in in tutte le linee testate ma ha aumentato p-Akt. E' importante notare che il trattamento combinato con pazopanib e trametinib ha indotto l'inibizione concomitante di PI3K/Akt e MAPK/ERK1/2 (**Figura C**).

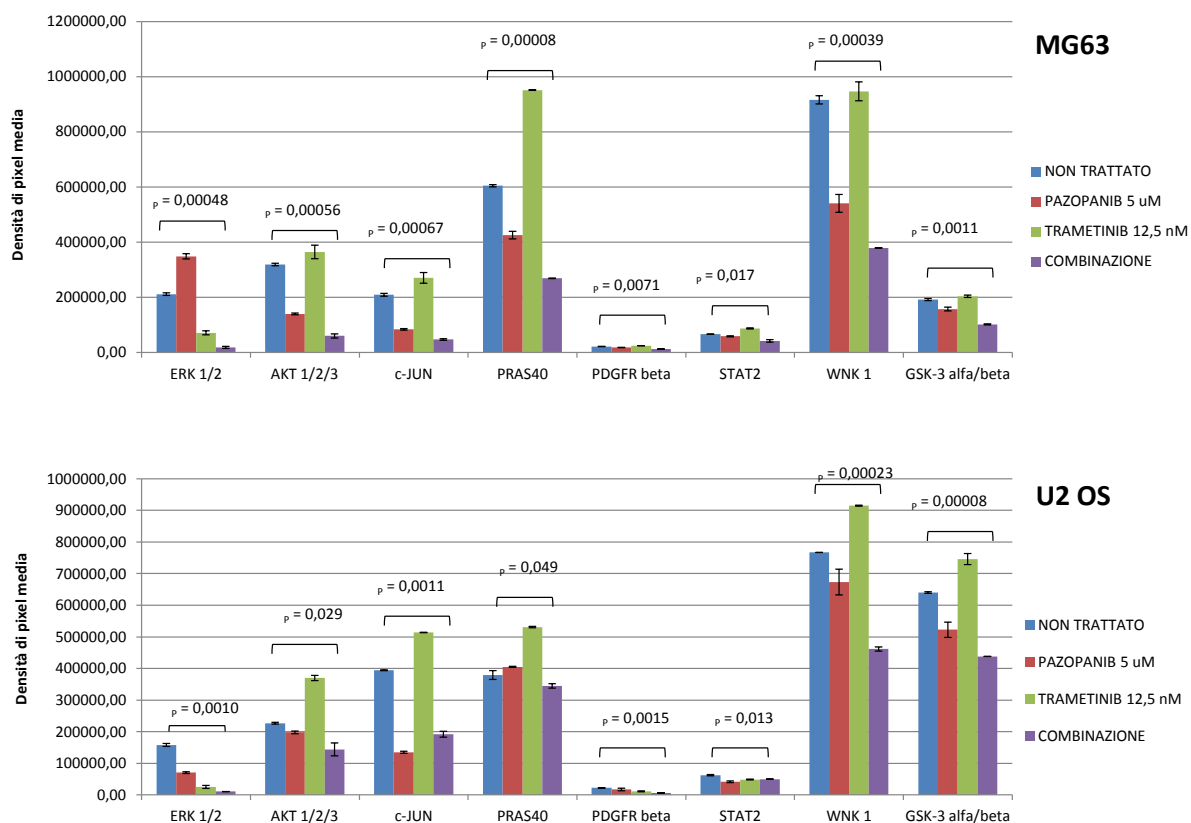
**Figura C**



**Figura C: Western blot rappresentativo dell'espressione di p-ERK1/2 e di p-Akt nelle linee di osteosarcoma dopo 24 h di trattamento con pazopanib, trametinib e la loro combinazione. vinculina è stata usata come proteina di controllo.**

#### **4.4 La combinazione di pazopanib e trametinib modula meccanismi alternativi di trasduzione del segnale**

Verificato che i trattamenti singoli e la combinazione di pazopanib e trametinib determinano la modulazione delle vie di MAPK/ERK 1/2 e PI3K/Akt, in esperimenti selezionati abbiamo esplorato vie di trasduzione alternative eventualmente coinvolte nel meccanismo molecolare di combinazione dei due farmaci. È stato effettuato uno screening di fosfo-proteomica che include 43 cinasi (proteome profiler Phospho-kinase array, RnD system) e, in seguito a 24 ore di trattamento con la combinazione di pazopanib e trametinib oltre a ERK 1/2 e Akt, sono risultate inibite anche c-JUN, PRAS40, PDGFR  $\beta$ , STAT-2, WNK1 e GSK-3  $\alpha/\beta$  (**Figura D**).



**Figura D: Fosfo-cinasi modulate nelle linee di osteosarcoma MG63 e U2 OS in seguito al trattamento con pazopanib, trametinib e la loro combinazione.**

#### 4.5 La combinazione di pazopanib e trametinib ha effetti antiproliferativi sinergici sulle linee cellulari di OS.

Una volta dimostrato che la combinazione di pazopanib e trametinib inibisce importanti vie di trasduzione del segnale di sopravvivenza, proliferazione e crescita cellulare abbiamo indagato l'eventuale attività antitumorale *in vitro* mediante test di vitalità (Celltiter glo) e saggi di crescita di colonie tumorali.

Abbiamo esposto 7 linee di OS a dosi crescenti di pazopanib (1,25-20  $\mu$ mol/L), trametinib (3,125-50 nmol/L) e la loro combinazione per 72 ore. I farmaci come agenti singoli e la loro combinazione causano un' inibizione dose e tempo dipendente della vitalità cellulare in tutte le linee testate. I valori di IC50 e l' indice di combinazione sono rappresentati nella tabella 1.

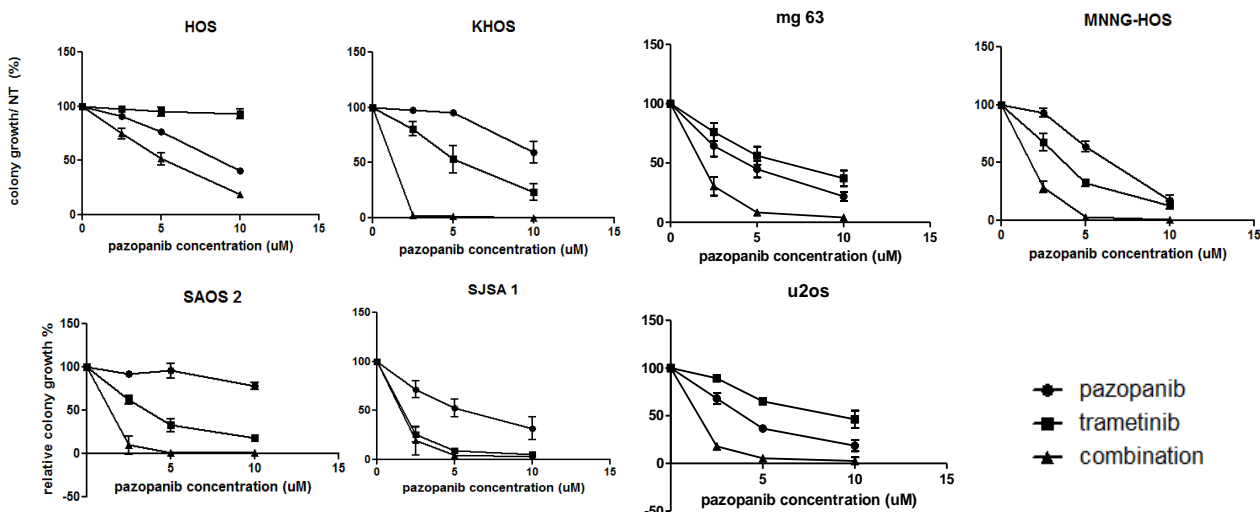
Il pazopanib ha dimostrato effetto antitumorale con IC50 compresi tra 6 e 17  $\mu$ mol/l, tranne che nel modello SAOS-2 sul quale non è efficace alle concentrazioni testate. Degno di nota è

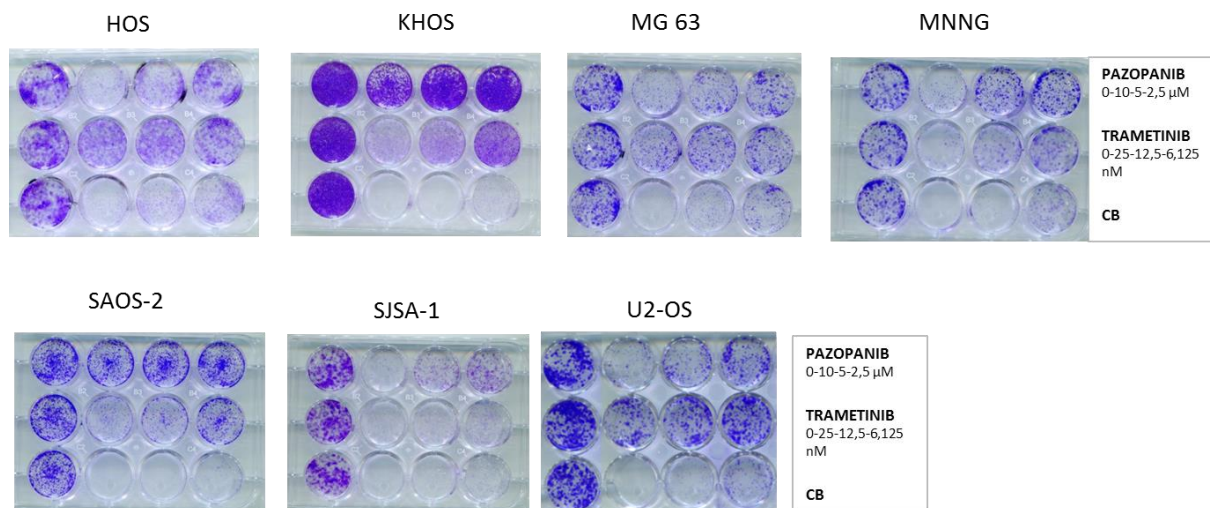
che questa linea non ha mostrato attività basale nè della via di Akt e né di ERK1/2. Trametinib come agente singolo è efficace in 1/7 linee (IC50 0.004), ha limitata efficacia in 3 /7 linee dimostrando IC50 compresa fra 24 nmol/L e 49 nmol/L e risulta inefficace in 2 su 7. (IC%>50nM). Tuttavia, con il trattamento combinato è stato possibile ottenere un effetto antiproliferativo sinergico con un indice di combinazione <1 in tutte le linee cellulari.

Cell line	IC50 $\mu\text{mol/L}$ pazopanib (ci95%)	IC50 $\mu\text{mol/L}$ Trametinib (ci95%)	IC50 $\mu\text{mol/L}$ Combination (ci95%)	combination index $\pm$ est. SD
U2OS	10.32 (9.34-11.41)	> 0.05	4.57 (4.25-4.91)pazopanib / 0.011 (0.011-0.012)trametinib	0.56 $\pm$ 0.04
SJSA-1	6.00 (5.45-6.6)	0.004 (0.002-0.021)	4.53 (4.14-4.96) pazopanib / 0.001 (0.010-0.012) trametinib	0.99 $\pm$ 0.06
KHOS	16.98 (14.21-20.32)	0.049 (0.020-0.604)	0.88 (0.42-1.84) pazopanib / 0.002 (0.001-0.005)trametinib	0.57 $\pm$ 0.34
MNNG	10.96 (9.39-12.8)	0.025 (0.022-0.028)	3.23 (2.25-4.62) pazopanib / 0.008 (0.006-0.011) trametinib	0.62 $\pm$ 0.12
MG63	9.84 (8.64-11.20)	0.045 (0.004-0.507)	3.36 (2.92-3.86) pazopanib / 0.008 (0.007-0.01) trametinib	0.53 $\pm$ 0.06
SAOS	>20	0.024 (0.007-0.074)	2.77 (2.20-3.48) pazopanib / 0.007 (0.005-0.009) trametinib	0.32 $\pm$ 0.04
HOS	14.26 (12.43-16.35)	> 0.05	8.99 (8.88-9.10) pazopanib / 0.022 (0.022-0.023) trametinib	0.74 $\pm$ 0.09

**Tabella 1: IC50 delle 7 linee cellulari trattate a dosi scalari con pazopanib, trametinib e loro combinazione;ci95: intervallo di confidenza al 95%.**

L'effetto antiproliferativo è stato inoltre confermato mediante saggi di crescita di colonie tumorali. Dopo 7 giorni di trattamento con dosi crescenti di pazopanib (2,5-5-10  $\mu\text{mol/L}$ ), trametinib (6,125-12,5-25  $\text{nmol/L}$ ) e la combinazione si è verificata una riduzione significativa della crescita delle colonie (**Figura E**).





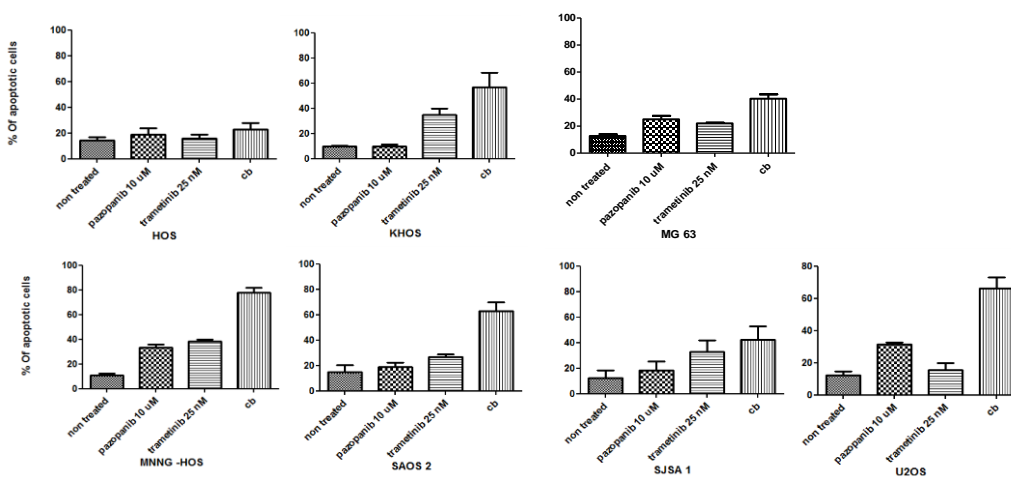
**Figura E: Colony assay**

#### **4.6 Pazopanib e trametinib bloccano il ciclo cellulare e inducono apoptosi nelle linee di osteosarcoma**

Per esplorare gli effetti biologici dei 2 farmaci singolarmente e della loro combinazione sulle linee cellulari di OS abbiamo effettuato analisi del ciclo cellulare e dell' apoptosi. Le linee sono state trattate per 72h con una dose di 10  $\mu\text{M}$  di pazopanib, 12,5 nmol di trametinib e con la loro combinazione. Le cellule apoptotiche sono state identificate mediante colorazione con annessina V e PI e analisi di citofluorimetria a flusso. L' annessina V evidenzia l' esposizione esterna di fosfatidilserina (evento precoce nelle cellule apoptotiche), mentre PI entra solo nelle cellule con membrane permeabilizzata (evento tardivo nelle cellule apoptotiche). Abbiamo osservato effetti apoptotici statisticamente significativi a favore della combinazione in 6 su 7 linee cellulari, come mostrato nella figura F. Nelle KHOS la combinazione ha indotto un aumento percentuale statisticamente significativo di cellule nelle fasi precoci e tardive di apoptosi ( $57,00\% \pm 11,53\%$ ) rispetto ai controlli ( $9,7\% \pm 0,88\%$ ),  $p < 0,05$ . Nelle MG63 la combinazione ha indotto una media percentuale di  $40,33\% \pm 3,18\%$  di cellule apoptotiche, rispetto alla media di  $12,67\% \pm 1,33\%$ , nel controllo non trattato  $p < 0,05$ . Le MNNG hanno avuto una media percentuale di cellule apoptotiche di  $77,75\% \pm 3,97\%$  dopo il trattamento



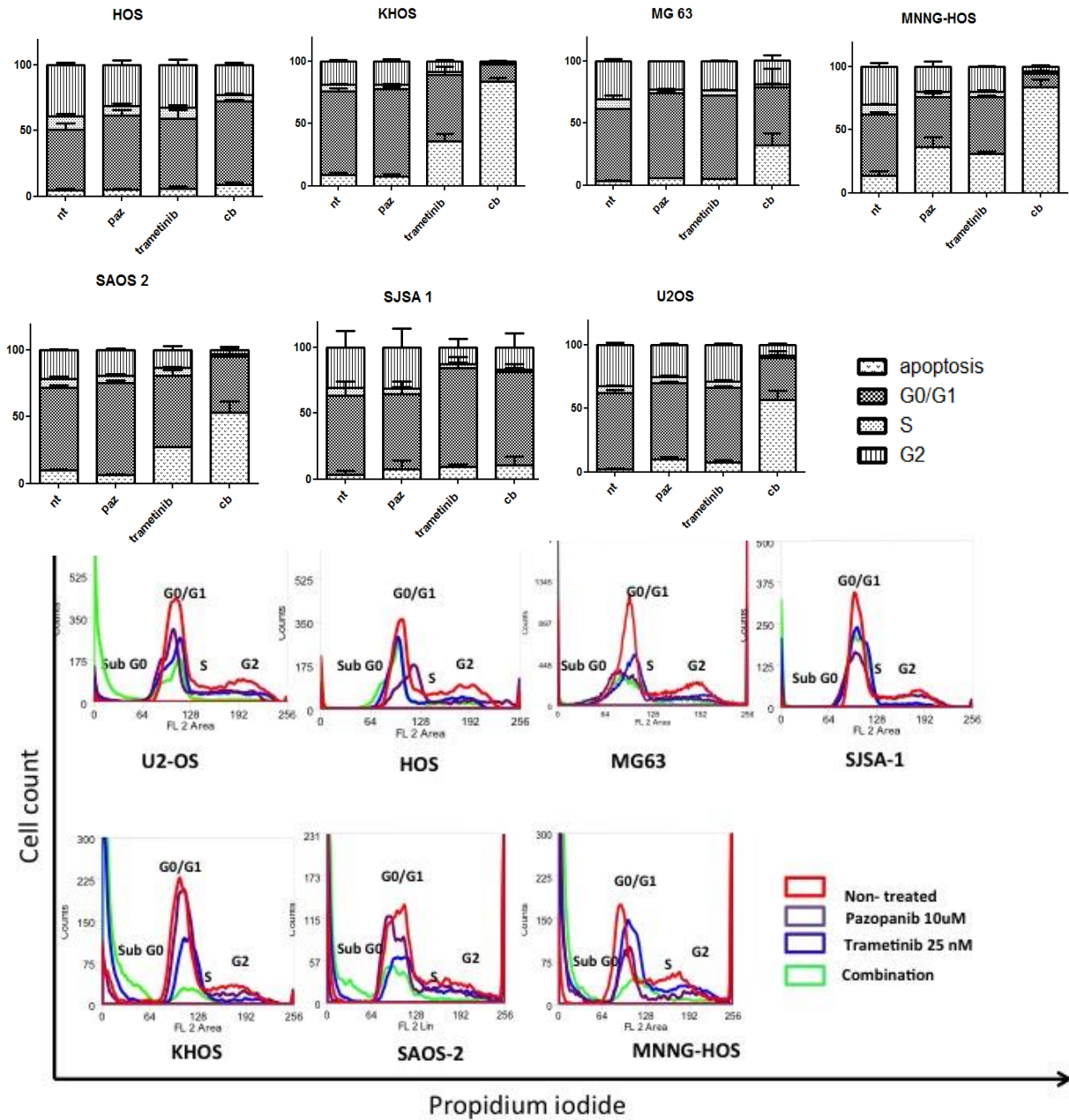
combinato, rispetto al controllo di  $11,00\% \pm 1,53\%$ ,  $p < 0,05$ . Nelle SAOS-2 la combinazione ha indotto una media percentuale di  $63,07\% \pm 6,69\%$  paragonata ai controlli non trattati di  $15\% \pm 5,57\%$   $p < 0,05$ . In SJSA-1 la media delle cellule apoptotiche dopo la somministrazione della combinazione è stata di  $42,5\% \pm 10,09$ , paragonata ai controlli  $12,43\% \pm 5,89$ ,  $p < 0,05$ . Nelle U2OS la media delle cellule in apoptosi è stata di  $66,33\% \pm 6,7\%$ , rispetto alle non trattate, con media di  $12,2\% \pm 2,3$ ,  $p < 0,05$ . Nelle HOS abbiamo osservato un effetto apoptotico mediamente più alto ( $22,88\% \pm 5,16\%$ ) rispetto ai controlli ( $14,34 \pm 2,66$ ) ma non statisticamente significativo  $p > 0,05$ .



**Figura F Percentuale di cellule apoptotiche di OS dopo trattamento con pazopanib o trametinib o con loro combinazione;**

Sono state inoltre analizzate le fasi del ciclo cellulare delle linee di osteosarcoma dopo 72 ore di trattamento con dose  $5 \mu\text{M}$  di pazopanib,  $12,5 \text{ nM}$  di trametinib e con la loro combinazione. Abbiamo riscontrato che la combinazione dei 2 farmaci ha ridotto in modo statisticamente significativo la percentuale di cellule proliferanti in tutte le linee di osteosarcoma (**Figura G**). Per esempio per la linea U2OS dopo trattamento combinato abbiamo osservato riduzione significativa della fase G2-M ( $8,3\% \pm 3,2\%$ ) contro  $25,18 \pm 2,9\%$  con il trattamento con il solo pazopanib,  $28,52\% \pm 2,96\%$  con il solo trametinib e  $32,35 \pm 4,33\%$  nei non trattati -  $p < 0,001$ .

**Figura G**

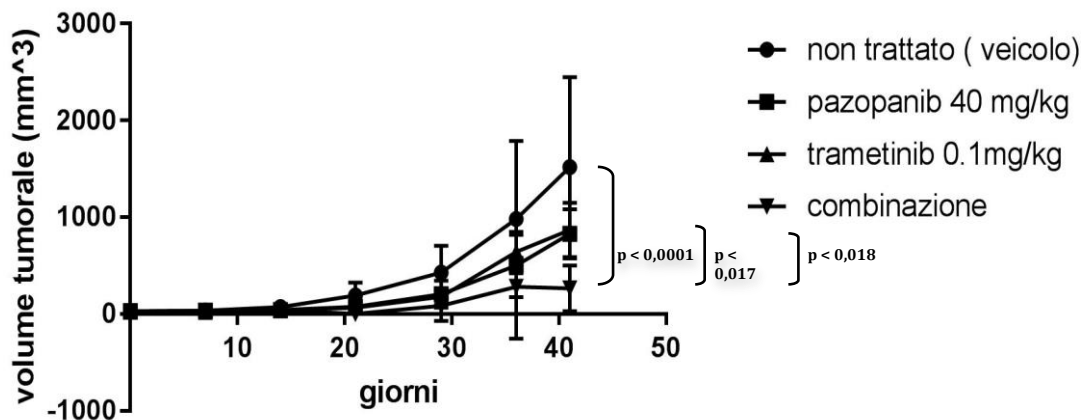


**Figura G** Quantifica delle fasi del ciclo cellulare e istogrammi rappresentativi della distribuzione del contenuto in DNA nelle diverse fasi del ciclo cellulare per ogni linea dopo trattamento

#### 4.7 Attività antitumorale di pazopanib e trametinib in modelli murini

Per lo studio dell'attività antitumorale *in vivo*, 16 topi NOD/SCID sono stati sottoposti al trapianto di  $10^6$  cellule di osteosarcoma, MNNG-HOS, nel tessuto sottocutaneo del fianco destro. Dopo una settimana, i topi sono stati suddivisi in quattro gruppi e trattati con 1) il solo veicolo, 2) pazopanib (40 mg/kg/giorno), 3) trametinib (0,1 mg/kg/giorno); 4) la loro combinazione per 5 giorni/settimana, per un totale di 21 giorni. Al termine dell'esperimento la combinazione di pazopanib e trametinib ha inibito significativamente la crescita neoplastica sia rispetto al gruppo di controllo non trattato che ai singoli agenti singoli (**Figura H**).

**Figura H**



**FIGURA H: Crescita tumorale nel topo durante il trattamento con pazopanib, trametinib, la loro combinazione o il solo veicolo (gruppo non trattato).**

## 5.DISCUSSIONE

L'osteosarcoma (OS) è il tumore primitivo dell'osso più frequente negli individui giovani e nei bambini<sup>21</sup>. La prognosi di questa neoplasia quando non operabile, poichè localmente avanzata o metastatica, rimane ancora oggi infausta, nonostante siano stati effettuati numerosi tentativi terapeutici basati sulla chemioterapia<sup>27</sup>. E' stato precedentemente dimostrato che diversi recettori tirosin-cinasi (RTK), come IGF-IR, HER2, PDGFR e VEGFR, sono implicati nella crescita e nella progressione delle cellule di OS. Nessuno di questi recettori presi singolarmente ha dimostrato di essere clinicamente rilevante come bersaglio di farmaci specifici<sup>28,29</sup> nell'OS. Il nostro gruppo di ricerca in passato ha esplorato l'attività preclinica e clinica dell'inibitore multichinasi sorafenib come agente singolo e successivamente in combinazione con un inibitore di mTOR, avendone dimostrato l'implicazione nei meccanismi di resistenza in questo contesto clinico. Nonostante la dimostrazione dell'attivazione di mTOR dopo trattamento con sorafenib e l'aumento di efficacia con la combinazione dei due farmaci nel modello preclinico, non è stato raggiunto l'obiettivo di progression free survival (PFS) in uno studio clinico di fase 2<sup>7,30,31</sup>. Data la necessità di migliorare la prognosi dei pazienti affetti da OS avanzato, abbiamo deciso di studiare nuovi approcci terapeutici basati sulla terapia molecolare multi-bersaglio. Pazopanib è un inibitore tirosin-cinasi orale di VEGFR1/2/3, FGFR1/2, c-KIT, PDGFR $\alpha/\beta$ , già approvato da FDA ed EMA per il trattamento di diverse neoplasie, tra le quali i sarcomi dei tessuti molli, non di derivazione adipocitaria<sup>15-17</sup>. In accordo con i dati presenti in letteratura<sup>33,34</sup>, abbiamo dimostrato, mediante analisi citofluorimetrica, che i bersagli di pazopanib sono espressi in linee cellulari di OS. Per valutare l'attivazione delle vie di trasduzione del segnale di questi recettori, abbiamo allestito saggi di western blot con anticorpi specifici per la fosforilazione del sito attivo delle cinasi ERK1/2 e AKT (Thr202/Tyr204 e Ser473) dimostrando che tali vie sono attive. Queste osservazioni suggeriscono il potenziale effetto di pazopanib su cellule di OS e che l'inibizione specifica delle vie di segnalazione potrebbe potenziarne l'efficacia. Tra i meccanismi molecolari che causano l'aumento della fosforilazione di MAPK/ERK1/2 si possono annoverare l'attivazione di cinasi a monte di ERK1/2<sup>35</sup> e/o l'inibizione dei meccanismi di *feed-back* negativo<sup>36</sup>. E' possibile che siano presenti delle mutazioni attivanti a carico dei RTKs, come descritto nel caso del tumore

gastrointestinale stromale (GIST), di cui le mutazioni di c-KIT o PDGFR $\alpha$  sono patognomoniche<sup>37</sup>. Invece, tra le molecole regolatorie a valle di ERK1/2 potrebbero essere implicate la perdita delle proteine fosfatasi a specificità duplice (*dual specificity phosphatases*, DUSPs) che de-fosforilano ed inattivano ERK1/2<sup>36</sup>. Nel tentativo di modulare le vie di trasduzione ERK1/2 e Akt, risultate attive nelle linee cellulari di OS, abbiamo trattato tali cellule con pazopanib e trametinib sia come agenti singoli sia in combinazione; quest'ultimo è un inibitore orale di MEK1/2 già approvato nella terapia dei melanomi BRAF V600E/K mutati<sup>38</sup>. Con il trattamento di pazopanib da solo, in tutte le linee cellulari di OS, abbiamo osservato inibizione di p-AKT e l'attivazione concomitante di p-ERK1/2. Il trametinib da solo riduce la fosforilazione dei siti attivanti di ERK1/2 ma aumenta p-Akt. Con la combinazione di trametinib e pazopanib tuttavia si ottiene completa inibizione delle vie di trasduzione del segnale di PI3K/Akt e MEK/ERK1/2 in tutte le linee trattate. Questo risultato è stato ottenuto anche da un altro gruppo su linee cellulari di carcinoma tiroideo<sup>39</sup>; infatti sia il trattamento con trametinib come singolo agente e sia la combinazione con pazopanib riduceva la fosforilazione di ERK1/2. Yokoyama et al. hanno dimostrato come invece la prolungata esposizione delle cellule sinoviali al pazopanib possa indurre una modulazione negativa di DUSP6, mediante meccanismo ancora sconosciuto, con successiva fosforilazione di ERK1/2<sup>40</sup>. Inoltre tali autori hanno evidenziato come l'aumento della fosforilazione di ERK1/2 promuova a sua volta la proliferazione e la progressione del ciclo cellulare in cellule sinoviali ma come trametinib usato come singolo agente possa indurre un'inibizione della fosforilazione di ERK1/2 in tali cellule rese resistenti al trattamento con pazopanib<sup>40</sup>.

La via di trasduzione del segnale PI3K/Akt, rispetto alle condizioni basali, risulta invece attivata da trametinib, inibita o invariata da pazopanib sia come agente singolo che in combinazione.

I nostri risultati sono in linea con quelli ottenuti da altri gruppi, dove trametinib usato come singolo agente incrementa la fosforilazione di Akt in linee cellulari di glioma pontino intrinseco diffuso<sup>41</sup>.

Per identificare ulteriori meccanismi implicati nell'azione della combinazione di pazopanib e trametinib abbiamo allestito un saggio di fosfo-proteomica che prendeva in esame 43 fosfo-cinasi (proteome profiler phospho-kinase array). Nelle nostre linee cellulari, rispetto alle

condizioni basali, la combinazione di pazopanib e trametinib, oltre a ERK1/2 e Akt, inibisce c-JUN, PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa), PDFGR  $\beta$ , STAT-2, WNK1 e la cinasi glicogeno-sintetasi-3 (GSK-3)  $\alpha/\beta$ . Numerosi studi suggeriscono che c-JUN sia implicato nello sviluppo dei tumori e per questo rappresenti un bersaglio utile per la terapia anti-cancro<sup>42</sup>. Anche nell'OS è stato descritto il ruolo pro-oncogenico di c-JUN<sup>43</sup>. Pertanto l'inibizione di questa via di trasduzione a seguito del trattamento con pazopanib e trametinib potrebbe contribuire all'attività antitumorale della combinazione. WNK-1 è una serina-treonina chinasi recentemente scoperta, che si trova a monte della via di trasduzione del segnale di MAPK/ERK1/2 e potrebbe essere coinvolta nella sua regolazione<sup>44</sup>. PRAS40, se fosforilato da Akt, regola il complesso 1 di mTOR (mTORC1) ed essendo regolato a monte dalla via PI3K/Akt viene usata come marcatore per valutare gli effetti dei nuovi inibitori diretti contro i diversi componenti della via PI3K/Akt/mTOR nel cancro<sup>45</sup>. Pertanto la sua inibizione da parte della combinazione di pazopanib e trametinib conferma l'effetto d'inibizione della via di PI3K/Akt.

STAT2, uno dei componenti della via delle cinasi Janus/trasduttori e attivatori del segnale trascrizionale (JAK/STAT), svolge importanti funzioni di controllo e regolazione di un'ampia gamma di citochine e fattori di crescita<sup>46</sup>. Sebbene il meccanismo di segnalazione di JAK/STAT sia molto semplice, spesso le conseguenze biologiche sono complicate dall'interazione con altre vie di segnalazione infatti a diversi livelli regola sia la via MAPK/ERK 1/2 che quella di PI3K/Akt<sup>46</sup>.

Ed infine, GSK-3 alfa/beta, è coinvolto in numerose vie di segnalazione che controllano la proliferazione cellulare, la trascrizione genica, la regolazione del ciclo cellulare e se fosforilato ed inattivato da Akt media i suoi effetti anti-apoptotici<sup>47</sup>.

Prendendo in considerazione queste ultime osservazioni possiamo affermare che utilizzando la combinazione di pazopanib e trametinib su linee cellulari di OS è possibile ottenere non solo l'effetto atteso di inibizione dei RTKs quali PDGFR- $\beta$ , ma anche la modulazione di molti percorsi integrati nel controllo della proliferazione tumorale e resistenza all'apoptosi. Abbiamo quindi ipotizzato che tale modulazione negativa si traducesse in un effetto antitumorale. Per esplorare tale assunto abbiamo allestito saggi di crescita di linee di OS *in vitro*, dimostrando che in tutte le linee analizzate la combinazione di pazopanib e trametinib inibisce la crescita in

maniera significativa. Per spiegare i fenomeni biologici correlati con tale effetto abbiamo analizzato il ciclo cellulare e l'apoptosi mediante tecniche di citofluorimetria. Abbiamo osservato che dopo 72 ore di trattamento con la combinazione dei 2 farmaci in studio si ottiene l'aumento netto delle cellule in fase non proliferante e l'induzione dei fenomeni di apoptosi. Abbiamo quindi voluto confermare l'azione antitumorale della combinazione pazopanib e trametinib in vivo nel modello murino. Dopo 21 giorni di trattamento il volume tumorale medio nel gruppo di topi che ha ricevuto la combinazione di pazopanib e trametinib risulta inferiore in modo statisticamente significativo rispetto ai gruppi di controllo non trattati o trattati con agenti singoli. Questo dato è stato ottenuto anche nei modelli murini di xenotrapianto di cellule di carcinoma renale<sup>48</sup> e nei modelli preclinici di carcinoma tiroideo<sup>39</sup> da altri gruppi. Inoltre Booth L. et al. ha evidenziato che trattando cellule di melanoma resistenti al trametinib/dabrafenib con pazopanib si possa superare la resistenza ai 2 farmaci ottenendo una riduzione statisticamente significativa del volume tumorale<sup>49</sup>. Queste tre sperimentazioni confermano la validità degli effetti antitumorali della combinazione pazopanib e trametinib che abbiamo osservato nel modello sperimentale di OS.

I dati sperimentali preclinici ottenuti in questo lavoro pongono le basi per la pianificazione di uno studio clinico con l'obiettivo di esplorare l'attività della combinazione di pazopanib e trametinib nei pazienti affetti da OS in stadio avanzato dopo il fallimento della chemioterapia convenzionale. Sono già stati effettuati alcuni studi clinici che hanno utilizzato la combinazione dei due farmaci in pazienti affetti da colangiocarcinoma<sup>50</sup> e sarcomi dei tessuti molli<sup>51</sup>. Nessuno dei due trial ha raggiunto l'obiettivo primario di PFS; nel secondo caso però gli autori hanno osservato alcune risposte radiologiche anche significative, quando, valutate con metodiche di next-generation sequencing, erano presenti mutazioni iperattivanti della via di trasduzione RAS/RAF. Questo significa che per provare ad ottenere dei risultati tangibili in uno studio clinico in pazienti affetti da OS avanzato occorrerebbe preselezionare i soggetti in fase di screening in funzione di un pannello di mutazioni dell'asse MAPK /ERK1/2 PI3K/Akt (ad esempio BRAF, NRAS, KRAS, MAPK1, MAPK3, MAP2K1 e PIK3CA Akt1/2/3) sui preparati istologici, al fine di ottenere un biomarker predittivo di risposta alla combinazione di pazopanib e trametinib.

## **6.CONCLUSIONI**

Nel nostro studio abbiamo dimostrato che la combinazione di pazopanib e trametinib ha un effetto antitumorale *in vitro* sulle linee cellulari di OS e *in vivo* nei modelli murini. Questi dati sono la base per disegnare un trial clinico con la combinazione dei due agenti nei pazienti affetti da OS avanzato in progressione alla chemioterapia convenzionale, selezionando i soggetti sulla base di eventuali biomarcatori di risposta clinica, quali le mutazioni attivanti della via RAS/RAF.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Kansara M, Teng M. W, Smyth M J, Thomas D. M. Translational biology of osteosarcoma. *Nature Review Cancer* 2014; 14:722-35.
2. Zhou W, Hao M, Du X, Chen K, Wang G, Yang J. *Advances in targeted therapy for osteosarcoma*. 2014.
3. Collins M, Wilhelm M, Conyers R, Herschtal A, Whelan J, Bielack S, Kager L, Kuhne T, Sydes M, Gelderblom H, Ferrari S, Picci P, Smeland S, Eriksson M, Petrilli A. S, Bleyer A, Thomas D. M. Benefits and adverse events in younger versus older patients receiving neoadjuvant chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. *Cancer* 117, 2303-2312. 2013.
4. Xu A. M, Huang P. H. Receptor tyrosin kinase coactivation network in cancer. *Cancer Res.* 70, 3857-3860. 2010.
5. Fleuren E.D.G, Versleijen-Jonkers Y.M.H, Boerman O.C, van der Graaf W.T.A. Targeting receptor tyrosine kinases in osteosarcoma and Ewing sarcoma: Current hurdles and future perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2014.
6. Rettew A.N, Young E.D, Lev D.C , Kleinerman E.S, Abdul-Karim F.W, Getty P.J, and Greenfield E.M. Multiple receptor tyrosine kinases promote the in vitro phenotype of metastatic human osteosarcoma cell lines *Oncogenesis*. 2012.
7. Pignochino Y, Grignani G, Cavalloni G, Motta M, Tapparo M, Bruno S, Bottos A, Gammaitoni L, Migliardi G, Camussi G, Alberghini M, Torchio B, Ferrari S, Bussolino F, Fagioli F, Picci P, Aglietta M. Sorafenib blocks tumour growth, angiogenesis and metastatic potential in preclinical models of osteosarcoma through a mechanism potentially involving the inhibition of ERK1/2, MCL-1 and ezrin pathways. *Mol Cancer*. 2009 Dec 10;8:118.
8. McCain J. The MAPK (ERK) Pathway. *Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma*. PT v.38(2); 2013 Feb.
9. Hu K, Dai H.B, Long-Qiu Z. mTOR signaling in osteosarcoma: Oncogenesis and therapeutic aspects. *Oncology Reports*. 2016.
10. Ferreira MGPA, Reis Filho NP, Pascoli AL, Arosti BM, Pazzini JM, Huppes RR, De Nardi AB, Tinucci-Costa M, Laufer-Amorim R. The importance of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in canine neoplasms: Literature review. *Arch Med Vet* 48, 139-143. 2016.
11. Nguyen H.P, Hang T.H, Trung Ly Q, Pham H. ND, Nguyen D.Q, Nguyen X.T. Targeting PI3K/AKT/mTOR signaling in Acute Myeloid Leukemia. *Vietnam of Journal Medicine*. 2015.
12. Segaliny A.I, Tellez-Gabriel M, Heymann D. Receptor tyrosine kinases: characterization, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancer. *J Bone Oncol*. 2015.
13. Quaderni dell'Italian Journal of Public Health. *QIJP* - 2013, Volume 2, Number 6.
14. Selleckchem.com.
15. Hurwitz HI, Dowlati A, Saini S et al. Phase I trial of pazopanib in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(12):4220-7.

16. Hutson TE, Davis ID, Machiels JP et al. Efficacy and safety of pazopanib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2010;28(3):475-80.
17. van der Graaf WT, Blay JY, Chawla SP et al. EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group; PALETTE study group. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2012;379(9829):1879-86.
18. Giavina-Bianchi M.H.,Giavina-Bianchi P.F., Festa C.N. Melanoma: tumor microenvironment and new treatments. *An Bras Dermatol*. 2017.
19. Long G.V, Flaherty K.T, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Chiarion-Sileni V, Lebbe C, Mandalà M, Millward M, Arance A, Bondarenko I, Haanen J.B.A.G, Hansson J, Utikal J, Ferraresi V, Mohr P, Probachai V, Schadendorf D, Nathan P, Robert C, Ribas A, Davies M.A, Lane S.R, Legos J.J, Mookerjee B, Grob J.J. Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol*. 2017.
20. Baranski Z, Booij T.B, Kuijjer M.L, de Jong Y, Cleton-Jansen A-M, Price L.S, van de Water B, Bovée J.V.M.G, Hogendoorn P.C.W, Danen E.H.J. MEK inhibition induces apoptosis in osteosarcoma cells with constitutive ERK1/2 phosphorylation. *Genes Cancer*. 2015.
21. Ottaviani G, Jaffe N. The etiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res* 2009;152:15-32.
22. Meyers PA, Schwartz CL, Krailo MD, et al. Osteosarcoma: The Addition of Muramyl Tripeptide to Chemotherapy Improves Overall Survival—A Report From the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol* 2008;26:633-8.
23. Harris MB, Cantor AB, Goorin AM, et al. Treatment of osteosarcoma with ifosfamide: comparison of response in pediatric patients with recurrent disease versus patients previously untreated: a Pediatric Oncology Group study. *Med Pediatr Oncol* 1995;24:87-92.
24. Berger M, Grignani G, Ferrari S, et al. Cyclophosphamide and Etoposide for Relapsed High-risk Osteosarcoma Patients. *Cancer* 2009;115:2980-7.
25. Song BS, Seo J, Kim DH, Lim JS, Yoo JY, Lee JA. Gemcitabine and docetaxel for the treatment of children and adolescents with recurrent or refractory osteosarcoma: Korea Cancer Center Hospital experience. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61:1376-81
26. Duffaud F, Egerer G, Ferrari S, Rassam H, Boecker U, Bui-Nguyen B. A phase II trial of second-line pemetrexed in adults with advanced/metastatic osteosarcoma . *Eur J Cancer* 2012;48,564-70.
27. Boye K, Del Prever AB, Eriksson M, et al. High-dose chemotherapy with stem cell rescue in the primary treatment of metastatic and pelvic osteosarcoma: final results of the ISG/SSG II study. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61:840-5.
28. O'Day K, Gorlick R. Novel therapeutic agents for osteosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;9:511–23.
29. Sampson VB, Gorlick R, Kamara D, Anders Kolb E. A review of targeted therapies evaluated by the pediatric preclinical testing program for osteosarcoma. *Front Oncol* 2013;3:132.
30. Grignani G, Palmerini E, Dileo P, et al. A phase II trial of sorafenib in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma after failure of standard multimodal therapy: an Italian Sarcoma Group study. *Ann Oncol* 2012;23:508-516.
31. Pignochino Y, Dell'Aglio C et al. The Combination of Sorafenib and Everolimus Abrogates mTORC1 and mTORC2 upregulation in osteosarcoma preclinical models. *Clin Cancer Res*. 2013 Apr 15;19(8):2117-31.

32. Grignani G, Palmerini E et al. Sorafenib and everolimus for patients with unresectable high-grade osteosarcoma progressing after standard treatment: a non-randomised phase 2 clinical trial. *Lancet Oncol.* 2015 Jan;16(1):98-107.
33. Versleijen-Jonkers Y.M.H, Vlenterie M, van de Lijstgaarden A.C.M, van der Graaf W.T.A. Anti-angiogenic therapy, a new player in the field of sarcoma treatment. *Clinical reviews in Oncology Hematology.* 2014.
34. Safwat A, Boysen A, Lucke A, Rossen P. Pazopanib in metastatic osteosarcoma: significant clinical response in three consecutive patients. *Acta Oncologica.* 2014.
35. McCubrey J. A, Steelman L.S, Chappell W.H, Abrams S.L, Wong E.W, Chang F, Lehmann B, Terrian D.M, Millella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli A.M, Franklin R.A. Role of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1263-1284. 2007.
36. Arkell, R.S, Dickinson R.J, Squires M, Hayat S, Keyse S.M, Cook S.J. DUSP6/MKP-3 inactivates ERK1/2 but fails to bind and inactivate ERK5. *Cell Signal* 20, 836–843 (2008).
37. Lee, J. H., Kim, Y., Choi, J. W. & Kim, Y. S. Correlation of imatinib resistance with the mutational status of KIT and PDGFRA genes in gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis. *Journal of gastrointestinal and liver diseases* 22, 413–418 (2013).
- 38 Long G.V, Flaherty K.T et al. Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol.* 2017.
39. Ball, D.W, Jin N, Xue1 P, Bhan S, Ahmed S.R, Rosen M, Schayowitz A, Clark D.P, Nelkin B.D. Trametinib with and without pazopanib has potent preclinical activity in thyroid cancer. *Oncol Rep* 34, 2319–2324 (2015).
40. Yokoyama N, Matsunobu T, Matsumoto Y, Fukushi J, Endo1 M, Hatano M, Nabeshima A, Fukushima S, Okada S, Iwamoto Y. Activation of ERK1/2 Causes Pazopanib Resistance via Downregulation of DUSP6 in Synovial Sarcoma Cells. *Scientific Report.* 2017.
41. Wu Y.L, Maachani U.B, Schweitzer M, Singh R, Wang M, Chang R, and Souweidane M.M. Dual Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK Pathways Induces Synergistic Antitumor Effects in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Cells. *Transl Oncol.* 2017 Apr; 10(2): 221–228.
42. Johnson G.L, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: Regulation, function and role in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2007.
43. Dass C.R, Khachigian L.M, Choong P.F. c-Jun Is critical for the progression of osteosarcoma: proof in an orthotopic spontaneously metastasizing model. *Mol Cancer Res.* 2008 Aug;6(8):1289-92.
44. Xu B, Lee B-H, Min X, Lenertz L, Heise C.J, Stippec S, Goldsmith E.J, Cobb M.H. WNK1: analysis of protein kinase structure, downstream targets, and potential roles in hypertension. *Cell Research* (2005) 15, 6–10.
45. Wiza C, Nascimento E.B.M, Ouwens D.M. Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.* 2012.
46. Rawlings J.S, Rosler K.M, Harrison D.A. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science* 2004 117: 1281-1283;
47. GSK 3 Signaling. SciGlobe. Biomedical literature search engine

48. Bridgeman, V.L, Wan E, Foo1 S, Nathan M.R, Welti J.C, Frentzas S, Vermeulen P.B, Preece N, Springer C.J, Powles T, Nathan P.D, Larkin J, Gore M, Vasudev N.S, Reynolds A.R. Preclinical Evidence That Trametinib Enhances the Response to Antiangiogenic Tyrosine Kinase Inhibitors in Renal Cell Carcinoma. *Molecular cancer therapeutics* 15, 172–183 (2016).
49. Laurence Booth L, Roberts J.L, Sander C, Lee J, Kirkwood J.M, Poklepovic A, Dent P. The HDAC inhibitor AR42 interacts with pazopanib to kill trametinib/dabrafenib-resistant melanoma cells in vitro and in vivo. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 10), pp: 16367-16386.
50. Shroff RT et al. The oral VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor pazopanib in combination with the MEK inhibitor trametinib in advanced cholangiocarcinoma *Br J Cancer*. 2017 May 23;116(11):1402-1407
51. Subbiah V et al. Phase Ib/II Study of the Safety and Efficacy of Combination Therapy with Multikinase VEGF Inhibitor Pazopanib and MEK Inhibitor Trametinib In Advanced Soft Tissue Sarcoma. *Clin Cancer Res*. 2017 Aug 1;23(15):4027-4034

## **8. RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio il prof. Massimo Aglietta e il dott. Giovanni Grignani per la possibilità che mi hanno offerto di formarmi come oncologo medico e di poter lavorare su questo e altri progetti di ricerca.

Sono molto riconoscente alla dott.ssa Ymera Pignochino e alla dott.ssa Maya Todorovich per l' aiuto prezioso nella stesura della tesi.