

## **SCHEDA SINTESI TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA TRASLAZIONALE UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA CAMPANIA "LUIGI VANVITELLI".**

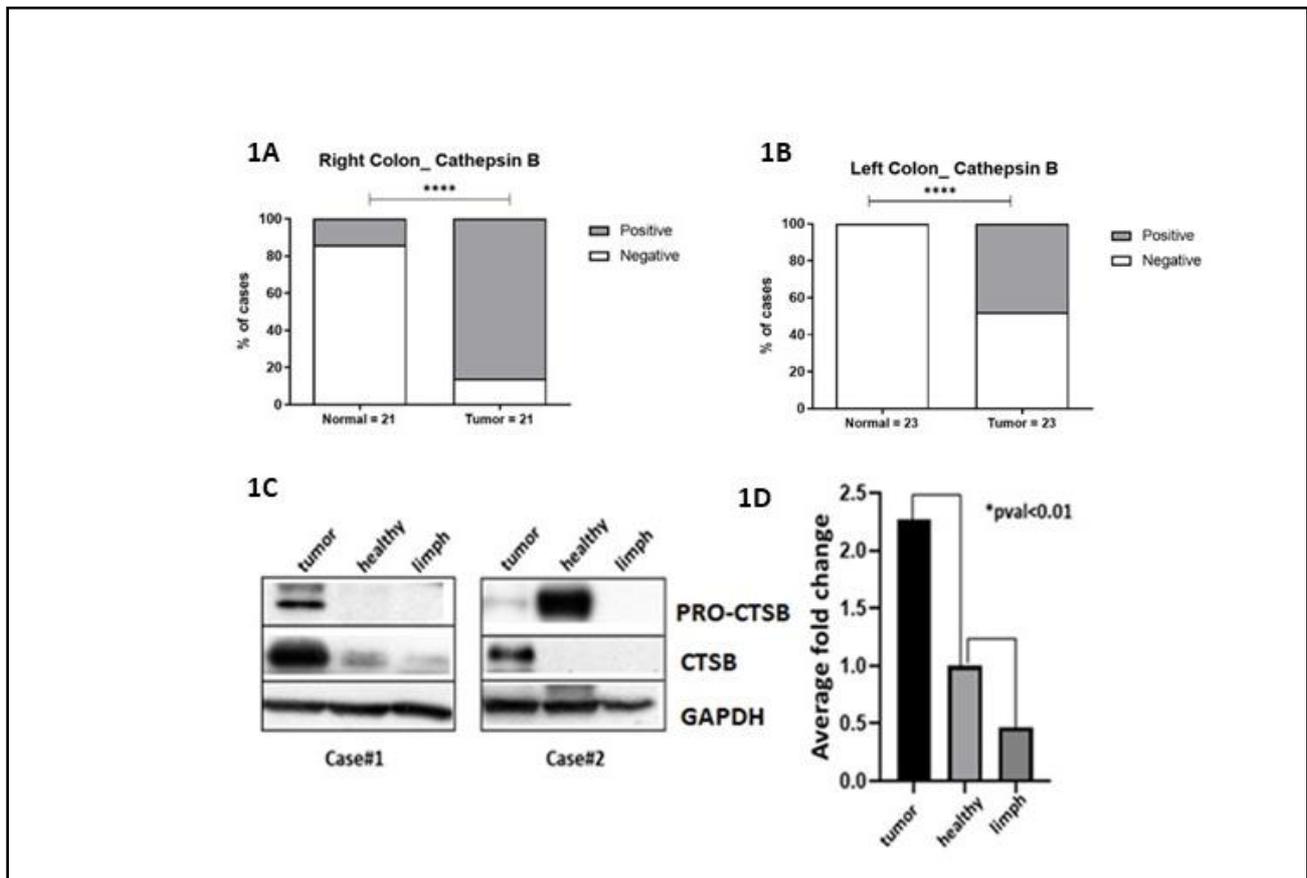
**Dr Chiara Papulino**

**Tutor: prof. Lucia Altucci**

**Titolo: "Riprogrammazione epigenetica di CatB nel cancro del colon-retto: un versatile marker prognostico"**

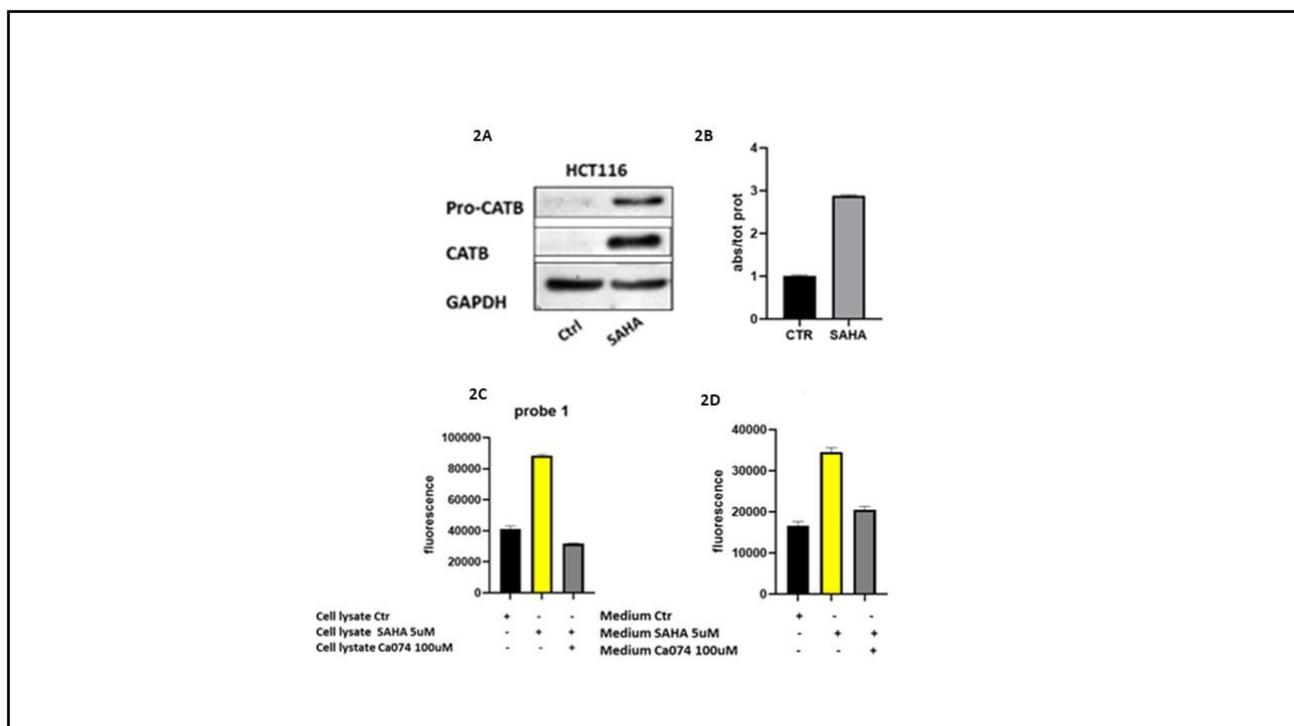
Il cancro del colon-retto (CRC) è una delle più diffuse neoplasie al mondo, viene considerato il secondo tumore maligno per incidenza dopo quello della mammella nella donna e il terzo dopo quello del polmone e della prostata nell'uomo (<https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-colon-retto>). Quando il CRC viene diagnosticato nelle fasi iniziali, la sopravvivenza globale (OS) dei pazienti dopo 5 anni è di circa il 65% (1). Tuttavia, questo tumore metastatizza (mCRC) nella maggior parte dei casi, portando ad una riduzione drastica dell'OS (14%). Queste statistiche mostrano che è necessario aumentare le campagne di screening e che le terapie per gli stadi avanzati di CRC sono attualmente inefficienti (2). Pertanto, vi è un'esigenza insoddisfatta di definire nuovi approcci terapeutici per il trattamento degli stadi avanzati in particolare quelli con metastasi, stadio III, IV e (m)CRC (3). Dal momento che la terapia rappresenta ancora un'esigenza clinica insoddisfatta a causa della sua alta metastatizzazione, l'Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", ha intrapreso un progetto di ricerca incentrato sulla valutazione delle modifiche epigenetiche che partecipano allo sviluppo e al mantenimento del CRC. Il progetto è stato improntato sullo studio di nuovi marcatori molecolari in particolare proteine coinvolte nello sviluppo del CRC ed è stato effettuato in accordo con l'autorizzazione del Comitato Etico (n 790 del 12/12/2018), seguendo le direttive italiane che normano il trattamento dei campioni biologici e le informazioni derivanti. Utilizzando modelli in vitro ed ex-vivo prelevati da pazienti affetti da CRC si è identificata una proteina, la Catepsina B (CTSB), una proteasi della cisteina lisosomiale, significativamente associata ad un aumentato rischio di CRC e mortalità generale, perché è coinvolta nella progressione del tumore e nella metastasi, facilitando una rapida invasione locale e angiogenesi (4-7). Al contrario, la sua espressione è bassa nelle cellule coloretali sane (8). CTSB è un enzima che svolge un ruolo cruciale nella progressione del tumore, della metastasi e nel processo di angiogenesi (9-11). Questa proteina, infatti è localizzata sia a livello intra che extracellulare, promuove la degradazione della matrice extracellulare, favorendo l'invasione e la metastatizzazione. Nei pazienti CRC, vi è infatti un'iper-espressione della CTSB in particolare negli stadi avanzati della patologia (i peggiori in termini di prognosi del paziente) (12). Inoltre, la sua presenza è stata associata sia ad una riduzione di sopravvivenza media (Overall Survival) e ad un tempo di sopravvivenza libero da malattia (Disease Free Survival-DFS). Il progetto di dottorato ha previsto infatti inizialmente analisi istologiche condotte a partire dal "tissue microarray" (TMA) delle porzioni di tessuto sano e tumorale dei pazienti, corroborando l'idea che tale proteina sia prevalentemente presente nella porzione di tessuto tumorale. In particolare, sono stati analizzati diversi campioni *ex-vivo* di CRC classificati secondo i criteri di cluering dei tessuti in base allo stadio della malattia dopo la diagnosi, al sesso, confermando l'iper-espressione di CTSB nel tumore rispetto alla controparte sana, in particolare nel colon nel colon-retto destro, considerato quello con prognosi peggiore in fase avanzata (**Figura 1A- 1B**)

La presenza di CTSB, come fattore prognostico negativo nel CRC, è ulteriormente stata confermata dal fatto che questa è quasi assente nel tessuto sano circostante il tumore. Parallelamente esperimenti di Western Blot e Real-time PCR condotti sugli stessi campioni ex-vivo hanno confermato l'over-espressione dell'mRNA e della proteina nella porzione tumorale rispetto alla controparte sana (**Figura 1C- 1D**).



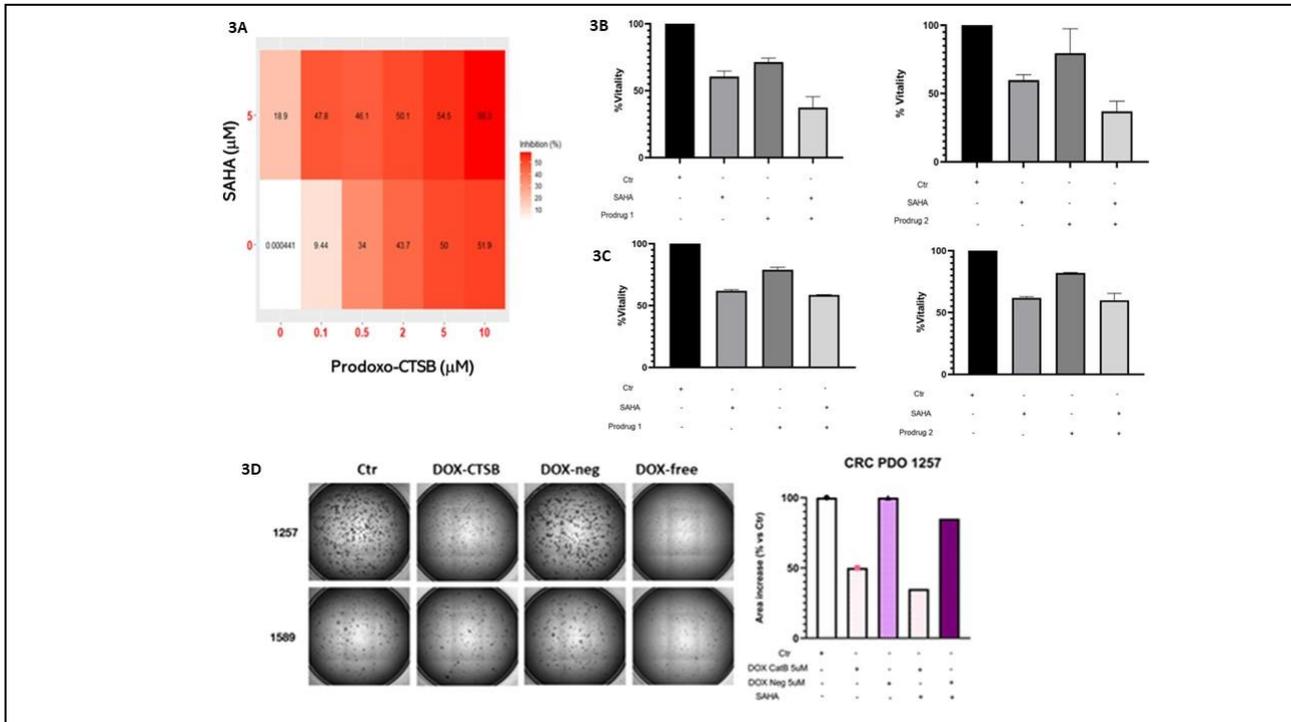
**Figura 1:** Analisi TMA che indica la % di casi nel tumore e nei tessuti sani di campioni ex vivo (A) Nel colon destro (numero= 21 campioni) il CTSB positivo è stato dell'85% (18/21) mentre il 15% (3/21) è risultato negativo al CTSB. (B) nel colon sinistro (numero= 23 campioni) CTSB positivo era 47% (11/23) invece 53% (12/23) risultato CTSB negativo. (C)Analisi di Western blot dei livelli di espressione di CTSB - nella sua forma inattiva (PRO-CTS) e attiva (CTS) in tessuti tumorali, sani e linfonodali di due diversi pazienti affetti da CRC. (D) Livelli di mRNA di CTSB (fold change) nei pazienti con CRC analizzati con qPCR

Le analisi immunocistochemiche in particolare hanno rivelato un accumulo della CTSB nell'ambiente extracellulare. Questi risultati preliminari hanno quindi portato alla validazione della CTSB, come marcatore biologico per la stratificazione prognostica dei pazienti, migliorando quindi il loro monitoraggio. In modelli cellulari di CRC tra cui HCT 116, HCT-116 p53 deficitarie e delle HCT116 DKO e SW480, attraverso esperimenti di *Western Blot* e di *Realtime PCR* è stato dimostrato che l'espressione della proteina e del trascritto aumentano in tali linee cellulari a seguito del trattamento con SAHA, pan-inibitore delle de-acetilasi istoniche. SAHA, noto anche come *Vorinostat* è un farmaco approvato dall'FDA per il trattamento del linfoma cutaneo avanzato a cellule T (CTCL) (12). Esperimenti di *Western Blot*, *ELISA* ed ultracentrifugazione in gradiente di densità, hanno dimostrato che il modulatore epigenetico aumenta non solo l'espressione della CTSB ma anche la sua attività nei vari compartimenti cellulari. Infatti, esperimenti ortogonali, sfruttando due differenti probes fluorescenti solo in presenza di proteina in forma attiva, hanno confermato l'over-espressione della stessa nell'ambiente intra ed extracellulare a seguito del trattamento con il modulatore (**Figura 2**).



**Figura 2:** (A) Analisi di Western blot che dimostra la modulazione della proteina CTSB (sia in forma inattiva che attiva) dopo 24 ore di trattamento con SAHA a 5  $\mu$ M in HCT116. (B) Aumento extracellulare di CTSB dopo il trattamento con SAHA in HCT116 rilevata dal test ELISA. I valori di assorbanza sono stati normalizzati sugli estratti proteici totali. (C-D) Il test di attività ottenuto dai lisati di cellule cancerose e dal mezzo condizionato dopo aver trattato le cellule per 24 ore con SAHA e quindi incubate con la sonda 1 ha mostrato aumenti dell'attività sia intracellulare che extracellulare, dimostrando che la modulazione epigenetica aumentava CTSB nella sua forma attiva. Al contrario, i lisati cellulari Ca074 hanno riportato una minore fluorescenza rispetto al Ctr.

Inoltre, è ben noto in letteratura che la CTSB oltre ad essere un biomarcatore diagnostico e prognostico è in grado di attivare, grazie alla sua azione enzimatica, alcuni profarmaci (prodrugs) antitumorali in maniera specifica, in modo da limitare la presenza di effetti collaterali (13). I profarmaci attivabili enzimaticamente nel sito del tumore hanno il potenziale di superare i comuni svantaggi associati ai classici chemioterapici come la tossicità e mancanza di selettività. La CTSB a differenza di numerosi enzimi come attivatori di profarmaci risulta essere up-regolata nel tessuto tumorale di colon favorendo così un rilascio di farmaco direttamente tra le cellule tumorali evitando le cellule sane. L'obiettivo del progetto è stato quello di immaginare una terapia combinata, in particolare di un farmaco epigenetico che modula l'espressione della CTSB (SAHA) e di un profarmaco attivabile da parte della stessa. L'effetto del modulatore epigenetico determina quindi non soltanto un aumento di CTSB all'interno delle cellule che favorisce l'induzione della morte cellulare ma allo stesso tempo un rilascio della forma attiva di CTSB nell'area extracellulare, promuovendo così un più efficiente rilascio di profarmaco nel tumore. La riprogrammazione epigenetica attraverso la somministrazione di SAHA determina infatti una sensibilizzazione delle cellule tumorali e contemporaneamente va ad aumentare l'attività enzimatica della CTSB, favorendo l'attivazione dei profarmaci in qualità di agenti citotossici specifici. Il progetto di dottorato ha previsto quindi, a questo punto, la sintesi di diverse prodrugs con frazione attiva a base di doxorubicina, attivate selettivamente dalla CTSB. Considerando che l'espressione della CTSB può essere modulata da un punto di vista epigenetico nel CRC a seguito del trattamento con il Vorinostat (SAHA), l'effetto sinergico di SAHA va da un lato a promuovere meccanismi apoptotici e dall'altro ad aumentare l'espressione della forma attiva della CTSB nel tumore e nell'ambiente tumorale, favorendo così un più efficiente rilascio della porzione attiva di profarmaco (Doxorubicina) nel CRC (**Figura 3**). A tale scopo esperimenti di MTT su differenti linee cellulari tra cui una di CRC, HCT116 e una linea non tumorale, AC16 cardiomiociti umani, hanno dimostrato che il pretrattamento con SAHA e la successiva aggiunta delle *prodrug* (a base di Doxorubicina) vanno ad incidere più sulla proliferazione cellulare della linea tumorale rispetto alla linea cellulare san (normali) (**Figura 3**). Inoltre, l'utilizzo dell'inibitore selettivo, Ca074 e di una *prodrug* non attivabile da parte della CTSB, hanno permesso di confermare il taglio selettivo da parte di questa. Queste evidenze sono state ulteriormente confermate grazie ad esperimenti condotti in collaborazione con IRCSS di Candiolo su colture 3D, organoidi ex-vivo (K-Ras wild type e mutati) derivati da pazienti CRC testando SAHA in combinazione o pretrattamento con prodrug CTSB targeted, confermando infatti l'idea dell'effetto sinergico del SAHA e della *prodrug doxorubicin-based*. (**Figura 3**).



**Figura 3:** (A) Matrice dose-risposta per Prodrug (Prodoxo-CTSB) in combinazione con SAHA in HCT116. (B) Saggi MTT in HCT116 che mostrano l'effetto antiproliferativo dei due profarmaci (profarmaco 1 e 2) da soli e pretrattando le cellule con SAHA a 5 $\mu\text{M}$  per 6h. (C) Saggi MTT nelle cellule AC16 (cardiomiociti) che mostrano l'effetto antiproliferativo dei due profarmaci (profarmaco 1 e 2) pretrattando le cellule con SAHA a 5 $\mu\text{M}$ . (D) La morfologia di due diversi CRC PDO, 1257 e 1589 (entrambi k-ras mutati) testati dopo trattamento con doxorubicina, profarmaco CTSB e profarmaco negativo CTSB doxorubicina (non riconosciuto da CTSB) a 5  $\mu\text{M}$  per 7 giorni. Aumento dell'area (% vs Ctr) del volume del PDO dopo trattamento con profarmaco DOX CTSB e DOX-neg. La preaggiunta di SAHA sensibilizza l'organoide CRC al trattamento con il profarmaco CTSB.

In questo modo, SAHA agisce come un trattamento neoadiuvante preparando selettivamente il tumore alla chemioterapia citotossica. Questo progetto, quindi, ha portato all'individuazione di differenti "proof of concept":

- Espressione differenziale della CTSSB tra CRC e tessuti sani per cui tale proteina può essere considerata nuovo *marker* predittivo e diagnostico.
- La possibilità di utilizzare un profarmaco CTSSB-*targeted* con frazione attiva attivabile solo nelle cellule tumorali, superando i comuni inconvenienti dei chemioterapici, come basso indice terapeutico, elevata tossicità, effetti collaterali e mancanza di selettività del tumore.
- L'espressione di CTSSB può essere modulata "epigeneticamente" per migliorare il rilascio dei profarmaci e aumentare la concentrazione di farmaci attivi nel sito del tumore
- Possibilità di aumentare il numero di candidati profarmaci, per cui piccole molecole non considerate idonee negli studi clinici a causa di elevata tossicità sistemica o del basso indice di selettività possono essere riconsiderate.

Il progetto ha avuto l'obiettivo quindi di operare come anello di congiunzione tra i risultati della ricerca di base nei settori farmaceutico e biotecnologico e la fase di sviluppo traslazionale, con l'intento complessivo di favorire lo sviluppo della filiera del farmaco e promuovere l'innovazione diagnostica e terapeutica in medicina. In linea con i principi del Dottorato di Medicina Traslazionale, il progetto svolto in questi tre anni ha avuto lo scopo di valorizzare l'innovazione biotecnologica associata ad un avanzamento in ambito oncologico, mediante lo sviluppo di molecole ad azione chemioterapica, da testare per il trattamento di forme aggressive o a prognosi nefasta di CRC. L'obiettivo ultimo, quindi, è stato quello di migliorare la cooperazione nell'asse Università e Aziende Farmaceutiche.

#### REFERENZE:

- 1)Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Mar 20;5(1):22.
- 2)Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, Arnold D; ESMO Guidelines Committee. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017 Jul 1;28(suppl\_4):iv22-iv40.
- 3)Argiles G, Arnold D, Prager G, Sobrero AF, Van Cutsem E. Maximising clinical benefit with adequate patient management beyond the second line in mCRC. *ESMO Open.* 2019 May 13;4(2):e000495.
- 4)Chan AT, Baba Y, Shima K, Noshok K, Chung DC, Hung KE, Mahmood U, Madden K, Poss K, Ranieri A, Shue D, Kucherlapati R, Fuchs CS, Ogino S. Cathepsin B expression and survival in colon cancer: implications for molecular detection of neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Nov;19(11):2777-85.
- 5)Rudzińska M, Parodi A, Soond SM, Vinarov AZ, Korolev DO, Morozov AO, Daglioglu C, Tutar Y, Zamyatnin AA Jr. The Role of Cysteine Cathepsins in Cancer Progression and Drug Resistance. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 23;20(14):3602
- 6)Bian B, Mongrain S, Cagnol S, Langlois MJ, Boulanger J, Bernatchez G, Carrier JC, Boudreau F, Rivard N. Cathepsin B promotes colorectal tumorigenesis, cell invasion, and metastasis. *Mol Carcinog.* 2016 May;55(5):671-87.
- 7)Chen S, Dong H, Yang S, Guo H. Cathepsins in digestive cancers. *Oncotarget.* 2017 Jun 20;8(25):41690-41700.
- 8)Salvatore L, Aprile G, Arnoldi E, Aschele C, Carnaghi C, Cosimelli M, Maiello E, Normanno N, Sciallero S, Valvo F, Beretta GD. Management of metastatic colorectal cancer patients: guidelines of the Italian Medical Oncology Association (AIOM). *ESMO Open.* 2017 Apr 12;2(1):e000147.

- 9) Rudzińska M, Parodi A, Soond SM, Vinarov AZ, Korolev DO, Morozov AO, Daglioglu C, Tutar Y, Zamyatnin AA Jr. The Role of Cysteine Cathepsins in Cancer Progression and Drug Resistance. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 23;20(14):3602
- 10) Bian B, Mongrain S, Cagnol S, Langlois MJ, Boulanger J, Bernatchez G, Carrier JC, Boudreau F, Rivard N. Cathepsin B promotes colorectal tumorigenesis, cell invasion, and metastasis. *Mol Carcinog*. 2016 May;55(5):671-87.
- 11) Chen S, Dong H, Yang S, Guo H. Cathepsins in digestive cancers. *Oncotarget*. 2017 Jun 20;8(25):41690-41700.
- 12) Huang H, Fu Y, Zhang Y, Peng F, Lu M, Feng Y, Chen L, Chen Z, Li M, Chen Y. Dissection of Anti-tumor Activity of Histone Deacetylase Inhibitor SAHA in Nasopharyngeal Carcinoma Cells via Quantitative Phosphoproteomics. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Nov 26;8:577784. doi: 10.3389/fcell.2020.577784. PMID: 33324635; PMCID: PMC7726116.
- 13) Zhong, Yan-Jun et al. Cathepsin B-cleavable doxorubicin prodrugs for targeted cancer therapy (Review).” *International journal of oncology* vol. 42,2 (2013):373-83. doi:10.3892/ijo.2012.1754.

### **RICONOSCIMENTI, FINANZIAMENTI E PREMI:**

Il seguente progetto è stato selezionato per la partecipazione al **congresso SIPMeT Young Scientist Meeting "Molecular Pathology: from bench to bedside"** come **“Oral Communication”** tenutosi a Perugia nei giorni 10 e 11 dicembre del 2021.

Parallelamente vista la natura del progetto, questa idea è stata presentata per concorrere al bando della **Regione Campania “Start up 2020”** in coerenza con “Strategia regionale di ricerca ed innovazione per la specializzazione intelligente” - RIS3 Campania, teso alla creazione e il consolidamento di una start-up innovativa, ottenendo **esito favorevole** con un punteggio di 85/100 ed un **finanziamento di circa 80.000 euro**. Dall’idea del profarmaco intelligente è nata quindi la start-up **“CIRCE”** i cui soci nonché soggetti promotori dell’iniziativa sono membri dell’Università “Vanvitelli” e dell’Università “Partenope” di Napoli. La **start-up CIRCE**, inoltre con l’idea del profarmaco intelligente ha ottenuto un **premio di 30.000 euro** in servizi da parte dell’incubatore di imprese BIO4DREAMS (Milano) dopo essere stata selezionata da bando **“PREMIO MARZOTTO 2031”**.

**Le informazioni presenti vanno trattate confidenzialmente in quanto è in fase di deposito brevetto europeo dell’idea.**