SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE

PRESENTAZIONE DEI CANDIDATI ALL'ESAME FINALE
XXVIII CICLO

Dott. Giuseppe Roscilli

Il Dott. Giuseppe Roscilli, durante il corso di Dottorato in Medicina Sperimentale, ha svolto la sua attività di ricerca presso i laboratori del Dipartimento di Medicina Clinica e Molecolare, Sapienza Università di Roma e Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, sotto la supervisione della Prof.ssa Rita Mancini.

Nel corso del Dottorato, il Dott. Giuseppe Roscilli si è occupato dello studio dei meccanismi di resistenza farmacologica mediati da ErbB3 e dell'identificazione di marcatori di attività dei farmaci utilizzati da soli o combinazione con i classici chemioterapici nella terapia mirata al paziente.

Il tumore al polmone è la causa principale di morte dovuta a malattia oncologica. Studi recenti sui meccanismi molecolari del tumore polmonare hanno portato allo sviluppo di terapie mirate con notevoli benefici per il paziente. Queste includono l'utilizzo di inibitori tirosin-chinasici (Tyrosine Kinase Inhibitor - TKI) di EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), come, gefitinib, erlotinib, afatinib, la cui attività si è dimostrata superiore ai classici chemoterapici come trattamento di prima linea per il tumore al polmone NSCLC (NSCLC- non-small cell lung cancer). Nonostante ciò, tutti i pazienti con NSCLC mutato in EGFR e trattati con inibitori di EGFR sviluppano resistenze. Le resistenze innate o acquisite rappresentano il problema maggiore nel trattamento dei tumori polmonari con mutazioni in EGFR. Per ovviare a ciò, sono in fase di sviluppo inibitori di EGFR di terza generazione, che possiedono attività preferenziale per EGFR portatore della mutazione T790M, la principale mutazione responsabile della resistenza acquisita al trattamento. Altro meccanismo di resistenza è rappresentato dall'amplificazione del gene MET o dall'overespressione del suo ligando, HGF (Hepatocyte Growth Factor), da parte della cellula tumorale o dalle cellule componenti lo stroma tumorale. Uno dei primi inibitori di nuova generazione ad essere approvato in clinica è stato l'afatinib; recentemente approvato per il trattamento di prima linea di pazienti che presentano tumore metastatico con mutazioni in EGFR (delezione esone 19 e mutazione puntiforme nell'esone 21). Afatinib, oltre ad una aumentata efficacia su tumori mutati in EGFR, ha dimostrato una modesta, ma incoraggiante, attività su tumori NSCLC resistenti a gefitinib o erlotinib. Per ovviare alle resistenze primarie o acquisite, un'altra strategia possibile è rappresentata dall'inibizione di diverse vie di segnalazione attraverso pan-inibitori o combinazioni di farmaci (inibitori di c-Met, di IGFR o di HDAC) con gli EGFR TKI.

Nonostante l'elevata risposta al trattamento, tutti i pazienti sviluppano resistenze e le terapie classiche sono inefficaci nella grande maggioranza dei casi, specialmente quando il tumore è diagnosticato ad uno stadio avanzato.
ErbB3 è noto essere uno dei partner di eterodimerizzazione di EGFR e di MET, e, quindi, fortemente coinvolto nei meccanismi di resistenza. L'inibizione di ErbB3 tramite anticorpi monoclonali potrebbe sensibilizzare maggiormente le cellule tumorali con resistenza acquisita o ancor meglio prevenire le resistenze. Inoltre, la risposta del paziente alla terapia è variabile ed il risultato della terapia non è prevedibile. Quindi, l'identificazione dei pazienti che gioverebbero di un determinato trattamento è di primaria importanza per ottenere una prognosi più affidabile ed identificare una terapia più efficace. A tale scopo, il Dott. Roscilli ha allestito un saggio in vitro basato su colture primarie ottenute da versamento pleurico maligno (malignant pleural effusion - MPE) di pazienti affetti da adenocarcinoma polmonare e da queste è stata costituita una banca di colture primarie. Anche se le colture cellulari non riflettono tutti gli aspetti dell'attività del farmaco nel paziente, sono ancora il modello maggiormente utilizzato per identificare e confermare marcatori di attività nella terapia mirata al paziente.
Tramite un protocollo messo a punto presso i laboratori dell'Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, sono state isolate diverse colture primarie da MPE e sono state congelate per costituire una banca di colture primarie derivate da pazienti, a basso numero di passaggi (da 2 a 10), per ridurre eventuali modificazioni delle caratteristiche delle colture dovute alla coltivazione in vitro. Le colture primarie ottenute sono state caratterizzate in saggi di proliferazione per la loro sensibilità ai farmaci utilizzati nella pratica clinica nel trattamento del tumore al polmone (cisplatino, carboplatino, vinorelbina, docetaxel, gemcitabina, gefitinib, erlotinib), da soli od in combinazione, e sono state inoltre analizzate per la presenza delle mutazioni geniche più ricorrenti nel tumore al polmone, tra cui quelle che sono maggiormente utilizzate come fattori predittivi nella terapia mirata al paziente: EGFR, PIK3CA, KRAS, TP53 e STK11. I risultati ottenuti dai trattamenti singoli sono stati utilizzati per classificare arbitrariamente le colture primarie rispetto alla loro sensibilità ai chemioterapici in Resistenti, Intermedie e Sensibili, e si è osservata una notevole varietà di risposta ai trattamenti. Per quanto riguarda gli inibitori TKI di EGFR si è confermato quanto atteso: le colture primarie più sensibili a erlotinib e gifitinib sono state quelle portatrici di mutazioni sensibilizzanti di EGFR.
Nella maggior parte dei casi i pazienti sono trattati tramite combinazione di farmaci con lo scopo di ottenere un effetto terapeutico sinergico e riduzione del dosaggio, e, quindi, della tossicità. Il Dott. Roscilli ha successivamente valutato la combinazione sinergica dei farmaci *in vitro,* tramite il calcolo del Combination Index (CI), ed i dati sono stati utilizzati per determinare se esista una correlazione con la risposta del paziente trattato con la stessa combinazione di farmaci. In effetti, le combinazioni di farmaci risultate sinergiche sono quelle che hanno determinato nel paziente durante il trattamento di I^{a} linea una parziale regressione (partial response-PR) o stabilizzazione della malattia (stable disease- SD).
Durante il secondo anno di Dottorato, il Dott. Roscilli si è occupato della caratterizzazione delle colture primarie isolate per la capacità di attecchimento e la cinetica di crescita in topi fortemente immunocompromessi, Rag2/Il2gc doppio knockout. La maggior parte delle colture ha dimostrato una discreta, ma estremamente variabile capacità di attecchimento. La latenza, cioè i giorni impiegati perché il tumore raggiunga un volume misurabile di 50 mm^3 circa, varia da un minimo di 10 giorni (coltura PE O/11) ad un massimo di 120 giorni (coltura PE 25/10), con una media di 52 giorni. Il tempo di duplicazione, i giorni necessari perché il volume tumorale duplichi, varia da un minimo di 5 giorni (coltura PE n/11) ad un massimo di 19 giorni (coltura PE f/13), con una media di 15 giorni circa. Una volta identificate le condizioni per poter ottenere xenograft utili per determinare l'attività di molecole citotossiche sulla crescita tumorale, alcune colture state re-inoculate per costituire dei gruppi sperimentali su cui sono stati valutati alcuni farmaci utilizzati nella terapia per il NSCLC: vinorelbina, cisplatino, gemcitabina. I farmaci utilizzati sono stati capaci di inibire la crescita dei tumori inoculati e nella maggior parte dei casi la risposta ha coinciso

con quella osservata *in vitro*. Gli xenograft sono stati quindi utili per dare una prima indicazione della sensibilità *in vivo* ai chemioterapici delle colture primarie derivate da paziente.
Le colture primarie sono state ulteriormente caratterizzate per l'espressione in membrana dei recettori della famiglia EGFR (tramite analisi al FACS e per Real-Time PCR) ed espressione di marcatori di staminalità Oct4 e Nanog, tramite Real-Time PCR.
Per quanto riguarda le resistenze acquisite successivamente al trattamento con inibitori tirosin-chinasi, sono disponibili diversi modelli per individuare e caratterizzare i meccanismi di resistenza mediati da ErbB3 e indotti dal trattamento con TKI di EGFR di seconda e terza generazione. Questi permettono di determinare la possibilità di revertire le resistenze, primarie o acquisite, tramite l'utilizzo di anticorpi anti-ErbB3 e di applicare il nuovo schema di trattamento alle colture primarie isolate da MPE. Il modello inizialmente esplorato è quello che mima la resistenza acquisita dovuta a overepressione del fattore di crescita HGF (Hepatocyte Growth Factor-HGF). In questo sistema la linea cellulare HCC827, sensibile ai TKI di EGFR per via della delezione nell'esone 19, viene resa resistente tramite aggiunta di HGF nel terreno.
Durante il terzo anno di Dottorato, il Dott. Roscilli ha studiato le condizioni per allestire questo modello utilizzando un inibitore TK di EGFR di terza generazione in fase di sviluppo: WZ4002. Gli inibitori di Terza generazione differiscono dal gefitinib o dall'erlotinib, perché legano il recettore EGFR irreversibilmente ed hanno un'attività preferenziale per il recettore con la mutazione T790M, che lo rende invece insensibile agli inibitori di prima generazione erlotinib e gefitinib. L'anticorpo anti-ErbB3, chiamato A3, è stato analizzato per la sua capacità di revertire la resistenza indotta a WZ4002 tramite aggiunta di HGF. I risultati ottenuti dimostrano che l'aggiunta dell'anticorpo A3 rende nuovamente le cellule sensibili al WZ4002, anche se rese resistenti dall'aggiunta di HGF esogeno. Colture primarie da MPE sono state già utilizzate per confermare il ruolo di ErbB3 in alcuni dei meccanismi coinvolti nella resistenza agli inibitori TK di EGFR, e il trattamento combinato *in vitro* ed *in vivo* di gefitinib o lapatinib con anticorpi anti-ErbB3 rende maggiormente sensibili le colture primarie al trattamento con questi inibitori di EGFR. Tramite questi ulteriori esperimenti si è estesa la possibilità di utilizzare gli anticorpi che riconoscono ErbB3 in combinazione con i nuovi inibitori EGFR in via di sviluppo e in condizioni in cui la resistenza acquisita coinvolga il recettore MET.
I chemioterapici utilizzati nella pratica clinica sono stati estesamente esplorati per la possibilità di usarli in combinazione tra loro o con farmaci per la terapia mirata al paziente, principalmente inibitori di EGFR: erlotinib e gefitinib. Utilizzando però questi due ultimi farmaci in combinazione con i classici chemioterapici, nessun trial clinico ha evidenziato che il trattamento combinato possa apportare ulteriori benefici per il paziente. E' stato, quindi, ipotizzato un possibile ruolo del recettore ErbB3 nella resistenza ai chemioterapi. Sono state esplorate combinazioni di chemioterapi con gli anticorpi anti-ErbB3 utilizzando gli xenograft ottenuti da colture tumorali derivate da paziente. Per due colture primarie, gli anticorpi anti-ErbB3, A3 e A4, sono stati capaci in entrambi i casi di incrementare l'efficacia della gemcitabina nel ridurre la crescita degli xenograft. Tramite analisi di immunoistochimica è stato osservato un incremento dei livelli di fosforilazione di ErbB3 negli xenograft trattati con gemcitabina, e questi vengono ridotti quando lo xenograft è trattato anche con gli anticorpi anti-ErbB3. La gemcitabina è un agente antineoplastico attivo nel tumore dell'ovaio, del NSCLC, del testa-collo, della mammella e del pancreas. Vista la sua bassa tossicità, la gemcitabina è spesso usata efficacemente in combinazione con composti a base di platino. I risultati ottenuti suggeriscono la possibilità che il trattamento combinato con gemcitabina ed anti-ErBb3 possa essere più efficace che il trattamento con la sola gemcitabina.

In conclusione, le colture primarie sono risultate un importante strumento per ottenere un profilo farmacogenomico del paziente da cui sono state ottenute. Infatti, sono state ricavate informazioni sulle mutazioni sia di EGFR sia di altri geni presi in considerazione per determinare il trattamento ottimale per il paziente. I trattamenti *in vitro* ed in *vivo* con le combinazioni di chemioterapici utilizzati nella pratica clinica sono risultati corrispondenti alla risposta al trattamento del paziente dal quale erano state ricavate le colture.

PUBBLICAZIONI 2012-2015

Aurisicchio L, Marra E, Luberto L, Carlomosti F, De Vitis C, Noto A, Gunes Z, **Roscilli G**, Mesiti G, Mancini R, Alimandi M, Ciliberto G. Novel anti-ErbB3 monoclonal antibodies show therapeutic efficacy in xenografted and spontaneous mouse tumors. J Cell Physiol 2012; 227:3381-8.

Aurisicchio L, Marra E, **Roscilli G**, Mancini R, Ciliberto G. The promise of anti-ErbB3 monoclonals as new cancer therapeutics. Oncotarget 2012; 3:744-58.

Roscilli G, Marra E, Mori F, Di Napoli A, Mancini R, Serlupi-Crescenzi O, Virmani A, Aurisicchio L, Ciliberto G. Carnitines slow down tumor development of colon cancer in the DMH-chemical carcinogenesis mouse model. J Cell Biochem 2013; 114:1665-73.

Ricci A, De Vitis C, Noto A, Fattore L, Mariotta S, Cherubini E, **Roscilli G,** Liguori G, Scognamiglio G, Rocco G, Botti G, Giarnieri E, Giovagnoli MR, De Toma G, Ciliberto G, Mancini R. TrkB is responsible for EMT transition in malignant pleural effusions derived cultures from adenocarcinoma of the lung. Cell Cycle 2013; 12:1696-703.

Noto A, Raffa S, De Vitis C, **Roscilli G**, Malpicci D, Coluccia P, Di Napoli A, Ricci A, Giovagnoli MR, Aurisicchio L, Torrisi MR, Ciliberto G, Mancini R. Stearoyl-CoA desaturase-1 is a key factor for lung cancer-initiating cells. Cell Death Dis 2013; 4:e947.

Noto A, De Vitis C, **Roscilli G**, Fattore L, Malpicci D, Marra E, Luberto L, D'Andrilli A, Coluccia P, Giovagnoli MR, Normanno N, Ruco L, Aurisicchio L, Mancini R, Ciliberto G. Combination therapy with anti-ErbB3 monoclonal antibodies and EGFR TKIs potently inhibits non-small cell lung cancer. Oncotarget 2013; 4:1253-65.

Giarnieri E, De Vitis C, Noto A, **Roscilli G**, Salerno G, Mariotta S, Ricci A, Bruno P, Russo G, Laurenzi A, Giovagnoli MR, Ciliberto G, Mancini R. EMT markers in lung adenocarcinoma pleural effusion spheroid cells. J Cell Physiol 2013; 228:1720-6.

Gavazza A, Lubas G, Fridman A, Peruzzi D, Impellizeri JA, Luberto L, Marra E, **Roscilli G**, Ciliberto G, Aurisicchio L. Safety and efficacy of a genetic vaccine targeting telomerase plus chemotherapy for the therapy of canine B-cell lymphoma. Hum Gene Ther 2013; 24:728-38.

Roscilli G, Cappelletti M, De Vitis C, Ciliberto G, Di Napoli A, Ruco L, Mancini R, Aurisicchio L. Circulating MMP11 and specific antibody immune response in breast and prostate cancer patients. J Transl Med 2014; 12:54.

Vesci L, Carollo V, **Roscilli G**, Aurisicchio L, Ferrara FF, Spagnoli L, De Santis R. Trastuzumab and docetaxel in a preclinical organotypic breast cancer model using tissue slices from mammary fat pad: Translational relevance. Oncol Rep 2015; 34:1146-52.

Donzelli S, Mori F, Bellissimo T, Sacconi A, Casini B, Frixa T, **Roscilli G**, Aurisicchio L, Facciolo F, Pompili A, Carosi MA, Pescarmona E, Segatto O, Pond G, Muti P, Telera S, Strano S, Yarden Y, Blandino G. Epigenetic silencing of miR-145-5p contributes to brain metastasis. Oncotarget 2015; 6(34):35183-201.

Fattore L, Malpicci D, Marra E, Belleudi F, Noto A, De Vitis C, Pisanu ME, Coluccia P, Camerlingo R, **Roscilli G**, Ribas A, Di Napoli A, Torrisi MR, Aurisicchio L, Ascierto PA, Mancini R, Ciliberto G. 2015. Combination of antibodies directed against different ErbB3 surface epitopes prevents the establishment of resistance to BRAF/MEK inhibitors in melanoma. Oncotarget 6:24823-41.

Aurisicchio L, **Roscilli G**, Marra E, Luberto L, Mancini R, La Monica N, Ciliberto G. Superior Immunologic and Therapeutic Efficacy of a Xenogeneic Genetic Cancer Vaccine Targeting Carcinoembryonic Human Antigen. Hum Gene Ther 2015; 26:386-98.

Il Collegio dei Docenti giudica l'attività scientifico-formativa il Dott. **Giuseppe Roscilli** in modo positivo, in base alla frequenza e all'attività di ricerca complessivamente svolta. Esprime parere favorevole alla presentazione di una tesi di Dottorato dal titolo:

MALIGNANT PLEURAL EFFUSIONS AS MODEL TO DETERMINE PATIENT CHEMOSENSITIVITY AND TO EXPLORE THE ROLE OF ERBB3 IN DRUG RESISTANCE

Il Segretario

Prof.ssa Patrizia Mancini

Il Coordinatore

Prof.ssa Maria Rosaria Torrisi