

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

TESI DI DOTTORATO
in EMATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE
XIX CICLO

**INIBITORI DEL PROTEASOMA NELLA TERAPIA
DEL MIELOMA MULTIPLO**

CANDIDATO: Lucia Vitali

TUTOR: Prof. Domenico Russo
COORDINATORE: Prof. Stefano Pileri

INTRODUZIONE

La presente trattazione verte sulla illustrazione di una nuova classe di farmaci, gli inibitori del proteasoma, focalizzando il loro utilizzo nella terapia del Mieloma Multiplo.

E' basilare definire dapprima la via proteolitica ubiquitina mediata, terreno di ricerca dal quale ha preso avvio lo sviluppo di queste nuove molecole dapprima utilizzate come probes dell'attività proteolitica stessa.

La scoperta del complesso sistema proteolitico ubiquitina-mediato ha infatti permesso di gettare nuova luce sulla regolazione dei processi cellulari.

Contrariamente a quanto creduto in precedenza la degradazione proteica non è semplicisticamente un mera via catabolica, ma gioca un ruolo centrale in numerosi pathways cellulari durante la vita e la morte cellulare, sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

Considerando la quantità di substrati e la miriade di processi coinvolti, non sorprende che alterazioni della proteolisi siano implicate nella patogenesi di molte malattie, fra cui alcune neoplasie.

La definizione del sistema ubiquitinico ha permesso lo sviluppo di una nuova categoria di farmaci, gli inibitori del proteasoma, aprendo nuove possibilità terapeutiche in particolare in alcune patologie come il Mieloma Multiplo.

INTRODUZIONE ED OVERVIEW DELLA PROTEOLISI UBIQUITINA MEDIATA

Le cellule eucariotiche svolgono la gran parte delle proteolisi attraverso la via proteasoma-ubiquitina.

Come tutte le componenti macromolecolari di un organismo, il proteasoma è in uno stato dinamico di sintesi e di degradazione. Durante la proteolisi, i legami peptidici che legano gli aminoacidi sono idrolizzati con rilascio degli aminoacidi stessi.

Il processo si attua tramite diversi gruppi di enzimi definiti proteasi.

Durante la proteolisi l'energia utilizzata per la sintesi del legame peptidico è rilasciata. Distinti meccanismi proteolitici rispondono ad esigenze fisiologiche diversificate e permettono all'organismo di adattarsi alle condizioni ambientali e pato-fisiologiche.

Si dovrebbe operare una distinzione fra proteine che provengono dall'esterno e proteine self.

Le proteine non self sono degradate nel lume del tratto gastro-intestinale; per evitare l'innescò di una reazione immunitaria, l'epitelio impedisce l'assorbimento di proteine intatte, le proteine vengono degradate ad aminoacidi non antigenici che sono poi assorbiti costituendo le unità di sintesi delle proteine self.

Le proteine self possono essere classificate in extracellulari ed intracellulari; i due gruppi vengono catabolizzati attraverso due meccanismi distinti.

Le proteine extracellulari, come i fattori della coagulazione, le immunoglobuline, albumina, le proteine cargo e gli ormoni peptidici sono inglobate per pinocitosi sono poi veicolate via endosomi, si fondono mediante membrana con i lisosomi andando incontro a degradazione; durante questo iter le proteine non vengono mai a contatto con l'ambiente intracellulare (citoplasma) ma restano all'esterno per tutta la durata del processo.

La degradazione lisosomiale non è specifica ed avviene per tutti i substrati proteici alla stessa velocità.

Le proteine intracellulari sono degradate tramite un processo molto specifico, finemente regolato, nel quale l'energia metabolica viene usata come controllo che avviene tramite il sistema ubiquitinico.

La degradazione di una proteina via proteasoma-ubiquitina si articola in due momenti distinti:

- I) Il substrato si lega covalentemente alla catena formata da multiple molecole di Ubiquitina
- II) Degradazione della proteina ormai legata da parte della sub- unità 26S del proteasoma con rilascio di Ubiquitina libera e riutilizzabile.

LA VIA PROTEOLITICA UBIQUITINICA

La coniugazione dell'ubiquitina, un polipeptide evolutivamente altamente conservato, alla proteina substrato avviene attraverso un meccanismo a cascata:

- I) L'enzima attivante E1 attiva l'ubiquitina in una reazione ATP dipendente per dare origine ad un estere-tiolo intermedio (E1-S~ubiquitina)
- II) Uno dei numerosi enzimi coniuganti (E2) trasferisce la molecola di ubiquitina attivata da E2 , attraverso un addizionale estere tiolico (E2-S~ubiquitina), al substrato che è specificamente legato ad una delle ligasi (E3)
- III) Multipli cicli di coniugazione dell'ubiquitina al substrato target e sintesi di una catena poli-ubiquitinica. E2 trasferisce la prima molecola di ubiquitina attivata direttamente al complesso substrato-E3 e nei cicli successivi alla ubiquitina precedentemente coniugata.
- IV) Degradazione del complesso ubiquitina-substrato da parte della subunità 26S del proteasoma con rilascio di piccoli peptici.
- V) L'ubiquitina è poi rilasciata attraverso l'attività degli enzimi deubiquitinanti (DUBs).

Le ligasi giocano un ruolo chiave nella cascata proteolitica, poiché servono come fattori di riconoscimento specifico del sistema.

STRUTTURA GERARCHICA DEL SISTEMA UBIQUITINICO

La visione semplificata della coniugazione ubiquitinica è che una singola molecola E1 attivi l'ubiquitina per tutte le reazioni di coniugazione. E1 interagisce con tutti gli enzimi E2 tipicamente ciascun E2 interagisce con numerosi E3. Ciascun E3 complessa vari substrati. L'interazione degli enzimi coniuganti fra di loro e con molti dei substrati possono differire dalla classica cascata. Per esempio un singolo E3 può interagire con due distinti E2. Anche un singolo E3 può avere varie sequenze di riconoscimento target vari substrati. Alcuni substrati possono interagire con vari E3. Non tutte le reazioni sono state comprovate sperimentalmente.

STRUTTURA DEL PROTEASOMA

Il proteasoma è un sistema multicatalitico proteasico che degrada proteine poli-ubiquitinate a piccoli peptici.

E' composto da due sub-complessi: una particella core (CP) di 20S che incorpora l'attività catalitica e una regolatoria (RP) di 19S.

La 20S CP ha una struttura cilindrica, composta da quattro anelli sovrapposti, due esterni α e due interni β identici fra loro. Nelle cellule eucariotiche gli anelli α e β sono composti ciascuno da sette distinte sub-unità.

I siti catalitici sono localizzati in alcune delle sub-unità β . Due siti agiscono come chimotripsine clivando dopo residui idrofobici (β_5), altri due come tripsine clivando dopo residui basici (β_2) e due come caspasi clivando dopo residui acidi (β_1).

Ciascuna estremità del cilindroide 20S può essere chiusa da un 19S RP. Una importante funzione del sistema RP è di riconoscere le proteine poliubiquitinate ed altri potenziali substrati del proteasoma; una seconda funzione è quella di creare una soluzione di continuo nell'anello α in modo da permettere il passaggio del substrato nella camera proteolitica. Inoltre poiché una proteina integra non può passare attraverso il canale proteasomico è assunto che la particella 19S ridimensioni i substrati e li invii alla unità 20S.

Sia la creazione dell'orifizio che la semplificazione strutturale dei substrati necessitano di energia, ed infatti la sub-unità 19S RP contiene sei differenti sub-unità ATPasiche.

Dopo la degradazione del substrato, i piccoli peptidi sono rilasciati, e l'ubiquitina diventa riutilizzabile.

FUNZIONE DEL PROTEASOMA

Il proteasoma svolge una grande varietà di attività metaboliche sia in ambito della selezione del substrato che nella sua produzione.

La proteolisi ubiquitina –mediata riveste un ruolo centrale in molti processi cellulari di base.

Fra questi la regolazione del ciclo cellulare , la divisione cellulare, la differenziazione e lo sviluppo, il coinvolgimento nella risposta cellulare allo stress e ad altri effettori extra-cellulari, la morfogenesi delle reti neuronali, la modulazione di recettori di superficie cellulari, i canali ionici e la via secernente, riparazione del DNA, regolazione della trascrizione, il silenzio trascrizionale, la memoria di lungo termine, i ritmi circadiani, la regolazione delle risposte immunitarie ed infiammatorie e la biogenesi degli organelli.

La lista delle proteine cellulari che si complessano all'ubiquitina si sta arricchendo rapidamente; fra di esse vi sono regolatori del ciclo cellulare come le cicline, gli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti, le proteine coinvolte nella separazioni dei cromatidi, i tumor suppressors così come attivatori ed inibitori trascrizionali.

Infine proteine mutate e/o denaturate sono specificamente riconosciute ed efficientemente rimosse; il sistema è dunque fondamentale nei meccanismi di controllo cellulare e di difesa.

Un problema non risolto è come il sistema ubiquitinico raggiunga la sua elevata specificità e selettività.

Perché alcune proteine sono estremamente stabili nella cellula ed altre invece sono ad emivita breve?

Perché alcune proteine sono degradate soltanto in una determinata fase del ciclo cellulare e solo

In risposta a particolari stimoli extracellulari, mentre sono stabili nella maggioranza delle condizioni?

Sembra che la specificità del sistema sia determinato da due distinti e non correlati gruppi di proteine

- I) E3
- II) Proteine ancillari

Per prima cosa ,entro il sistema ubiquitinico, i substrati devono essere specificatamente riconosciuti da un appropriato E3 quale prerequisito alla loro ubiquitinazione.

Nella maggior parte dei casi tuttavia i substrati non sono riconosciuti in maniera costitutiva e non sono riconosciuti direttamente dall'E3. In alcuni casi l'E3 deve essere modificato da un under-going modificazione post-traslazionale per arrivare ad una forma attivata che riconoscerà il substrato.

In molti altri casi è il substrato che deve andare incontro a certe modificazioni che lo renderanno suscettibile di riconoscimento.

La stabilità delle proteine addizionali dipende dalla associazione con le proteine ancillari come gli chaperones molecolari che agiscono come elementi di riconoscimento in **trans** e servono come ponte alle ligasi.

Altre, come certi fattori di trascrizione, devono dissociarsi dalla sequenza di DNA specifica alla quale sono legati per essere riconosciuti dal sistema; la stabilità infine di altre proteine dipende dalla loro oligomerizzazione.

Così, in aggiunta agli E3 stessi, enzimi modificanti (come le chinasi), proteine ancillari e sequenze di DNA alle quali i substrati sono legati, giocano un ruolo importante nel processo di riconoscimento.

REGOLAZIONE DEL PROTEASOMA

Il targeting di una proteina al sistema ubiquitinico deve coinvolgere specifici legami della proteina alla complementare ligasi ubiquitinica (E3).

Nonostante progressi nella conoscenza delle modalità di riconoscimento e di regolazione del sistema, solamente in un numero ristretto di casi è stato possibile identificare la specifica sequenza di riconoscimento della ligasi.

In linea di principio, il riconoscimento può essere mediato da parecchi meccanismi: o il substrato è modificato in modo da essere o non essere riconosciuto dall'appropriata E3, o l'attività di E3 può essere modulata.

Sebbene il numero di casi analizzati sia ancora basso, sembra che la modalità di regolazione si correli con la classe della ligasi.

Si può individuare una regolazione di tipo generale e una di tipo specifico.

Regolazione Generale

La via ubiquitinica può essere regolata a livello dell'ubiquitinazione o dell'attività del proteasoma.

Poiché la coniugazione e la degradazione proteosomiche sono necessarie per un gran numero di funzioni cellulari, la regolazione deve essere specificatamente modulata.

In due casi tuttavia, è stato riportato che componenti generali del sistema, invece che specifiche, potrebbero essere regolate da segnali fisiologici.

Un caso è l'up-regulation del sistema che si osserva durante la degradazione massiva delle proteine della muscolatura striata; ciò si verifica normalmente nei mammiferi durante il digiuno, ma anche in alcune condizioni patologiche come la cachessia neoplastica, la sepsi severa, l'acidosi metabolica o dopo denervazione. Si osserva inoltre durante specifici processi di sviluppo (es: evoluzione dallo stato larvale).

L'altra modalità consiste nel cambiamento di specificità dei siti di clivaggio del proteasoma entro la sequenza della sua funzione di presentazione antigenica.

È stato dimostrato nelle cellule di mammifero che le tre componenti della subunità 20S, di cui due sono codificate entro il locus MHC e una è codificata in una regione diversa, sono up-regolate dopo trattamento con interferone γ .

Esse rimpiazzano altre tre sub-unità proteosomiche che conferiscono una differente specificità di clivaggio peptidico, presumibilmente favorendo i peptidi che si legano meglio al complesso maggiore di istocompatibilità di classe I delle cellule presentanti l'antigene e al TCR dei linfociti T citotossici.

Regolazione Specifica

Ci sono varie modalità attraverso cui si realizza il riconoscimento specifico del substrato:

- Riconoscimento dei substrati attraverso il residuo aminico terminale.
- Attivazione allosterica peptidica indotta
- Riconoscimento del substrato fosforilato
- Fosforilazione della ligasi
- Riconoscimento in *trans* attraverso le proteine ancillari

UBIQUITINAZIONE E PATOGENESI

Stante il coinvolgimento del sistema ubiquitinico in numerosi processi cellulari, non sorprende che una sua alterazione possa essere alla base direttamente o indirettamente della patogenesi di molte condizioni morbose.

Sebbene l'inattivazione dell'enzima principale (E1) sia ovviamente letale, mutazioni negli enzimi o in sequenze di riconoscimento del substrato che non influenzano vie vitali o che le influenzano in modo marginale, può dare origine ad una grande varietà di fenotipi.

Alterazioni acquisite nell'attività del sistema possono evolvere in determinate patologie.

Gli stati patologici associati al sistema ubiquitinico possono essere classificati in due gruppi.

- I) Quelli che derivano da una perdita di funzione, da una mutazione nel sistema ubiquitinico o nel substrato target, che risultano in stabilizzazione di certe proteine.
- II) Quelli derivanti da una iper-funzione, che si traducono in una accelerata o anomala degradazione proteica.

Una trattazione specifica delle alterazioni funzionali in relazione alle singole classi di patologie esula dalle tematiche che questa trattazione si è prefissata di svolgere; si farà unicamente cenno alla patologia neoplastica, quale contesto più ampio di riferimento per quanto riguarda il Mieloma Multiplo.

NEOPLASIE

Alterazioni nelle reazioni di ubiquitinazione e deubiquitinazione sono state direttamente implicate nell'eziologia di molte neoplasie.

Mentre il turn-over proteico proteasoma-mediato sembra essere ubiquitario sia nelle cellule del sistema immunitario sia in altre cellule, deve essere rilevato che l'ubiquitinazione è essenziale per molte proteine coinvolte nella tumorigenesi, come le cicline, le chinasi ciclina-dipendenti, gli inibitori ciclina dipendenti delle chinasi, la fosfatasi cdc25, il fattore nucleare kB (NF-kB), C-fos, C-jun, N-MYC, p53, Bax, β catenina, SNAIL e il fattore 1 α ipossia indotto.

Inoltre molti oncogeni e tumor-suppressors sono essi stessi coinvolti nella ubiquitinazione (di solito come E3 ligasi) o come enzimi de-ubiquitinanti.

Esempi di E3 ligasi che sono state correlate con l'insorgenza di neoplasie includono MDM2, che regola la p53 ed è sovra-espressa in molti tumori, particolarmente sarcomi; BRCA1, un tumor-soppressr coinvolto nella suscettibilità al cancro della mammella e dell'ovaio; Von Hippel Lindau (VHL), la cui mutazione si riscontra in molti tumori renali e che determina la stabilizzazione di HIF1 e l'induzione dell'angio-genesi; E6-AP, un altro regolatore della p53 attivato dall'oncogene del virus papilloma umano; SKP2, un oncogene, che una volta sovra-espresso conduce alla rimozione proteasoma mediata di regolatori del ciclo cellulare come la p27, p21 e la p57.

Fra gli enzimi de-ubiquitinanti neoplasia-correlati, è importante la recente osservazione che il tumor-suppressor CYLD (mutato nella cilindrosi familiare) quando deleto porti alla attivazione costitutiva di NFkB.

Questo insieme di evidenze indica l'importanza funzionale del sistema ubiquitinico nella genesi neoplastica.

INIBITORI DEL PROTEASOMA

Gli Inibitori del proteasoma si possono raggruppare in tre categorie:

- Aldeidi Peptidici

- Boronati Peptidici
- Non Peptidici (come la Lactacistina)

Gli Aldeidi Peptidici (MG 132, MG115 ,ALLN) bloccano potentemente , ma reversibilmente l'attività chimotripsinica; tuttavia inibiscono anche la cisteina lisosomiale, le proteasi seriniche e le calpaine.

I Boronati Peptidici come Bortezomib danno un blocco reversibile, sono più potenti e selettivi rispetto agli Aldeidi.

La Lactacistina è un inibitore naturale irreversibile non peptidico è più selettivo dei peptidi aldeidi , ma meno selettivo dei Peptidi boronati.

La maggior parte degli inibitori (incluso Bortezomib) si ritiene agiscano inibendo l'attività chimotripsinica della subunità 20S del proteasoma (sub-unità $\beta 5$); sebbene recenti evidenze indicano che anche le sub-unità $\beta 1$ e 2 possono essere inibite da Bortezomib specialmente quando vengono raggiunte elevate concentrazioni del farmaco.

Più recentemente è allo studio una nuova generazione di inibitori che mostrano un più ampio spettro di attività, inibendo l'attività tripsina e caspasi simili del proteasoma(per es. NPI0052) o risultano più specifici per l'immunoproteasoma.

Inibitori del Proteasoma e terapia anti-neoplastica

Molteplici studi mostrano che gli inibitori del proteasoma sono più citotossici per le cellule proliferanti neoplastiche che per le cellule quiescenti normali.

È verosimile che le cellule tumorali abbiano un alterato e/o difettivo ciclo cellulare proteico che sfocia in un' aumentata velocità replicativa, un incrementato accumulo di proteine danneggiate condizionando così una maggiore dipendenza dai processi degradativi proteasomici.

Meccanismi dell'attività anti-neoplastica degli Inibitori del Proteasoma

Molteplici meccanismi sono stati proposti per spiegare l'attività anti-tumorale degli inibitori del proteasoma, essi si esplicano per lo più nell' inibire la degradazione di proteine pro-apoptotiche e/o regolatrici:

- Inibizione di NF κ B attraverso una ridotta degradazione di I κ B α , comportando una ridotta sintesi di fattori anti-apoptotici NF κ B dipendenti come c-Flip, inibitori dell'apoptosi, e Bcl2 e di fattori angio-genetici.
- Stabilizzazione ed accumulo di p53.

- Deregolazione del turn-over ciclinico e susseguentemente dell'attività chinasi ciclina-dipendente.
- Effetto sulla stabilità delle proteine della famiglia cdc25 durante il ciclo cellulare.
- Shift nel bilancio fra fattori pro ed anti-apoptotici.
- Stabilizzazione di JNK , aumentata fosforilazione di c-Jun e dell'attività di legame di AP1 con up-regolazione di Fas.
- Deregolazione del segnale pro-apoptotico attraverso TNF via TRAIL.
- Aumentato stress ossidativo.
- Inibizione degli effetti anti-apoptotici dell'IL 6 e del IGF 1.
- Riduzione della capacità migratoria delle cellule mielomatose al VEGF.
- Effetto sul micro-ambiente tumorale incluso l'attività anti-angiogenetica.

INIBITORI DEL PROTEASOMA NELLA TERAPIA DEL MIELOMA MULTIPLO

Le cellule mielomatose si localizzano primariamente a livello del midollo osseo, dove vari fattori umorali ne promuovono la crescita e la sopravvivenza e proteggono dagli effetti cito-tossici della chemio-terapia.

In particolare l'adesione delle cellule mielomatose alle cellule dello stroma innesca la trascrizione e la secrezione di citochine come l'interleuchina 6 e IGF1, o del fattore endoteliale che a loro volta inducono proliferazione delle cellule mielomatose, bloccando anche l'apoptosi indotta dagli agenti chemioterapici.

Il microambiente midollare contribuisce significativamente alla patogenesi e progressione del Mieloma Multiplo, e nuovi agenti diretti anche verso lo stroma sono di importante uso clinico.

Lo sviluppo di Bortezomib/PS341 per il trattamento del Mieloma Multiplo ha definito la terapia con inibitori del proteasoma come un efficace approccio terapeutico.

Bortezomib è stato valutato in vari trials pubblicati ed in corso per tumori solidi ed ematologici.

E' approvato dalla Food and Drug Administration per la terapia del Mieloma Multiplo trattato in precedenza almeno con una linea di terapia, inoltre è stato recentemente approvato nella cura del linfoma Mantellare recidivato o refrattario.

Bortezomib influenza varie vie della crescita e della sopravvivenza nelle cellule di Mieloma.

Il trattamento nel Mieloma con Bortezomib si associa all'inibizione dell'adesione delle cellule mielomatose alle cellule stromali che risulta nel blocco della trascrizione adesione correlata e della secrezione di svariate citochine; si verifica inoltre l'inibizione di NF- κ B, l'inefficienza del sistema di riparazione del DNA, la down regolazione dei pathway di crescita e dei segnali anti-apoptotici come Mitogen activated protein kinase (MAPK) di PI3K Bcl2 e altri fattori di inibizione dell'apoptosi IAPs.

L'apoptosi Bortezomib indotta si correla con ridotta attività di NF- κ B: l'attivazione costitutiva di NF- κ B è legata alla proliferazione e alla farmaco-resistenza, conferendo così una diversa sensibilità agli inibitori del proteasoma nel contesto di popolazioni cellulari neoplastiche nei confronti di popolazioni normali.

L'attivazione di NF- κ B si verifica attraverso fasi sequenziali: la fosforilazione di I κ B è innescata dalla chinasi up-stream I κ B α che viene poi ubiquinata e degradata con sintesi di un complesso libero (p50/65); si ha dunque la traslocazione nucleare e l'attivazione di p50/65 NF- κ B.

Una volta nel nucleo NF- κ B si lega alla sequenza di riconoscimento presente nelle regione promoter di molti geni fattori di crescita associati ed innesca la sua trascrizione.

Per esempio l'attivazione di NF- κ B promuove la produzione di citochine (IL 6 e tumor necrosis factor α), fattori di crescita e molecole di adesione. Tutte queste molecole favoriscono la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali.

NF- κ B media importanti processi cellulari incluse le risposte immunitarie, così come la crescita, la sopravvivenza e l'apoptosi nel Mieloma Multiplo.

L'attivazione intrinseca di NF- κ B è associata con crescita nel Mieloma. L'adesione delle cellule mielomatose alle cellule stromali media la trascrizione e la secrezione di IL6 e IGF I; entrambi promuovono il survival delle cellule mielomatose nel midollo osseo bloccando l'apoptosi innescata da agenti convenzionali come il Desametasone.

Cellule di pazienti affetti da Mieloma e le corrispondenti cellule stromali presentano una up-regolazione di NF κ B rispetto alla controparte normale.

Al contrario cellule di Mieloma farmaco- sensibili mostrano una più bassa attività di NF- κ B che le cellule farmacoresistenti, suggerendo che NF- κ B conferisca chemo-resistenza.

Elevati livelli di NF- κ B sono stati riscontrati in cellule di pazienti recidivati dopo terapia.

Presi nel loro insieme questi dati indicano che NF- κ B è un regolatore chiave della crescita e sopravvivenza delle cellule di Mieloma nell'ambiente midollare.

Da rilevare che il trattamento con Bortezomib nel Mieloma previene la degradazione di I κ B, così bloccando non soltanto l'attivazione di NF- κ B ma anche la produzione delle citochine correlate.

Tuttavia la sola inibizione di NF- κ B è improbabile che da sola renda conto della azione anti-mieloma di Bortezomib. Per esempio sia Bortezomib che un inibitore di I κ B (PS-1145) bloccano l'attivazione di NF- κ B; in contrasto a Bortezomib tuttavia, PS1145 inibisce solo parzialmente la crescita mielomatosa, suggerendo che esistono target addizionali di Bortezomib oltre NF- κ B.

Bortezomib innesca vie di segnale pleiotropiche: l'apoptosi Bortezomib – indotta

Bortezomib induce l'attivazione di c-jun NH₂-terminale chinasi che trasloca sui mitocondri e facilita il rilascio del citocromo c e del secondo attivatore mitocondriale di caspasi (Smac) dal mitocondrio al citoplasma, seguito dall'attivazione della caspasi 9.

Bortezomib attiva anche la caspasi 8, entrambe queste due caspasi inducono attivazione downstream di caspasi 3 e il clivaggio della Polimerasi poly-ADP Ribosio.

L'inibizione di c-jun usando chinasi dominate negative o un inibitore biochimico abroga il rilascio citocromoc/Smac e l'attivazione della caspasi 9.

L'apoptosi Bortezomib-indotta non è bloccata dalla IL6 o da IGF-I. L'espressione ectopica di Hsp27 inibisce il rilascio Bortezomib mediato del citocromo c e di Smac.

Schematizzando si rilevano i seguenti eventi addizionali:

- Attivazione delle proteine di risposta allo stress come le heat shock protein (Hsp27 Hsp 70 e Hsp 90)
- Up –regolazione di c-jun.
- Alterazione del potenziale di membrana mitocondriale.
- Induzione della via intrinseca dell'apoptosi.
- Attivazione della via estrinseca dell'apoptosi.
- Inefficienza dei meccanismi riparativi del DNA per inattivazione della protein- chinasi DNA dipendente.
- Blocco dell'adesione delle cellule mielomatose midollari alle cellule stromali con mancata secrezione delle citochine correlate.
- Down-regolazione della protein-chinasi mitogeno-attivata e delle vie mediate da Fosfatidilinositolo/Akt.

Tutti questi eventi di segnale contribuiscono alla globalità dell'attività anti-mieloma svolta da Bortezomib.

In particolare alcuni studi hanno stabilito un ruolo obbligatorio di c-jun durante l'apoptosi Bortezomib indotta.

Oltre ai sovra-menzionati eventi Bortezomib influenza anche proteine regolatorie del ciclo cellulare come il tumor suppressor gene TP53 (p53).

Alterazione in p53 conducono ad instabilità genetica in una grande varietà di cellule cancerose.

Nel contesto del Mieloma Multiplo uno studio recente (C. Anderson et all.) mostra che Bortezomib innesca l'apoptosi sia nelle cellule di Mieloma con p53 *wild-type* che in quelle con p53 mutato, questi risultati concordano con quanto riscontrato nel Ca. del colon-retto, nel glioblastoma e nelle cellule leucemiche. Inoltre l'apoptosi indotta da Bortezomib nel Mieloma si correla con la fosforilazione di p53.

Se mutazioni in p53 influenzino la citotossicità di Bortezomib è ancora non definito.

E' probabile che mutazione nel domain carbossilico terminale di p53, che contiene il principale sito per la ligasi ubiquitinica, influenzi l'attività di Bortezomib.

Alcuni studi suggeriscono che l'attività citotossica di Bortezomib sia indipendente dallo stato mutazionale di p53; resta tuttavia da chiarire se i siti di mutazione di p53 nel Mieloma Multiplo siano realmente i siti di legame ubiquitinico o no.

Studi che utilizzeranno mutazioni nel domain terminale di p53 potranno chiarire il ruolo di tali mutazioni nell'attività di Bortezomib.

Presi nella loro totalità i riscontri in varie neoplasie suggeriscono che l'apoptosi Bortezomib indotta si inneschi sia nella modalità p53 dipendente che in quella p53 indipendente.

INIBITORI DEL PROTEASOMA E SUPERAMENTO DELLA RESISTENZA ALLE TERAPIE STANDARD

Sia la resistenza *de novo* che quella acquisita al trattamento radio e/o chemioterapico limitano l'efficacia di molti trattamenti, gli inibitori del proteasoma possono avere un impatto rilevante su entrambi i meccanismi di resistenza.

Target	Inibizione Proteasomica	Effetto anti-tumorale
NFkB	Inibizione della traslocazione nc. di NFkB che viene di solito indotta da CHT e RT	Blocco della trascrizione NFkB mediata di geni anti-apoptotici quali, <i>bcl2</i> , <i>bcl-x</i> <i>XIAPs</i>
P44/42MAPK	Inibisce l'attivazione di p44/42 che è mediata da molti chemioterapici	Down-regola i segnali di sopravvivenza p44/42 dipendenti
P-gp	Inibisce la processazione di precursori delle P-glicoproteine con accumulo delle forme immature	Può prevenire l'efflusso di agenti citotox. Attraverso la pompa P-gp, aumentando la loro concentrazione intracellulare
TopI	Stabilizzazione di TopI la cui degradazione è stimolata da ag.der. dalle campotecine (Irinotecan)	Poss stabiliz del complesso TopI-DNA previene la sua riparazione e promuove l'apoptosi
TopII α	Accumulo di Top II α , la cui degradaz è \uparrow in alcuni tumori come mecc di R.	\uparrow target come le antracicline e le epipodofillotossine
Risposta genotossica allo stress	\downarrow trascriz. del sist. riparatore-DNA	Sensibiliz. della neoplasia ad ag con target DNA (alchilanti, antracicline, epipodofillotossine, c. Platino.

BORTEZOMIB: TRIALS

Studi preclinici

Furono condotti studi clinici precoci con PS-341 su linee cellulari di mieloma umane e su cellule isolate da pazienti.

I risultati di questi studi mostravano che dosi farmacologicamente raggiungibili erano in grado di inibire direttamente linee cellulari umane di mieloma, sia sensibili che refrattarie agli agenti citotossici quali melphalan, doxorubicina, mitoxantrone e desametasone; tali dosi inducevano inoltre apoptosi caspasi mediata sulle linee cellulari e sulle cellule isolate da pazienti indipendentemente dall'espressione di p21, p27 o p53.

Le linee cellulari di mieloma si dimostrarono 40 volte più sensibili agli effetti pro-apoptotici di PS-341 di quanto dimostrarono di essere monoliti periferici di soggetti sani.

Ps-341 fu in grado di inibire l'attivazione di NF- κ B in cellule di mieloma trattate con TNF α , bloccando la degradazione della proteina inibitrice I- κ B α e superare la resistenza all'apoptosi conferita da IL6.

PS-341 si dimostrò inoltre inibire il legame delle cellule mielomatose con le cellule stromali ed abrogare la trascrizione NF- κ B dipendente e quindi la secrezione di IL6.

I meccanismi mediatori dell'attività anti-mieloma di PS-341 furono analizzati a livello molecolare. L'analisi dell'espressione genica delle cellule trattate con PS-341 indicò che questo agente era in grado di up-regolare segnali pro-apoptotici e di down-regolare proteine anti-apoptotiche come Bcl-2.

Inoltre PS-341 si osservò fosforilare la chinasi c-jun attivando caspasi 8 e successivamente caspasi 3 che a loro volta clivano proteine del DNA ad attività chinasica, ATM/ATR od entrambe risultando in alterati meccanismi di riparazione del DNA sia nelle linee cellulari di mieloma che nelle cellule fresche isolate da pazienti.

L'attivazione di caspasi 3 induce anche danno del DNA con conseguente fosforilazione di p53 e degradazione di MDM2.

Questi effetti furono prodotti da PS-341 in un modo tempo e dose dipendenti e con dosaggi di Ps-341 raggiungibili nella pratica clinica.

L'attività di PS-341 fu inoltre testata in un modello murino di mieloma. Si documentò che questo agente induceva una significativa inibizione della crescita tumorale, incluse alcune regressioni complete e raddoppiava il tempo di sopravvivenza rispetto ai controlli.

Ps-341 fu inoltre in grado di inibire la neo-vascularizzazione comprovando l'attività anti-angiogenetica del farmaco.

Studi di fase II e III nel MM avanzato refrattario/ recidivato

Studi preclinici e studi di fase I hanno mostrato l'efficacia di Bortezomib nel Mieloma Multiplo aprendo rapidamente la strada a trials di fase II e III rivolti a valutare la sicurezza e l'attività di questo agente terapeutico in pazienti già trattati senza successo, con più linee di terapia, inclusa la procedura trapiantologia.

Gli studi di fase II SUMMIT (Study of Uncontrolled Multiple Myeloma Managed with Proteasoma Inhibition Therapy) and CREST (Clinical Response and Efficacy Study of Bortezomib and the Treatment of Relapsing Multiple Myeloma) hanno fornito la prima dimostrazione che Bortezomib costituiva una efficace terapia di salvataggio per circa un terzo-metà dei pazienti con MM refrattario o recidivato.e suggeriva l'esistenza di di una realzione dose-risposta in vivo.

Sulla base di questi risultati favorevoli Bortezomib ricevette la rapida approvazione per uso clinico nelle fasi avanzate di MM da parte della FDA americana nel 2003 e successiva approvazione da parte dell'EMA nel 2004.

L'uso consentito fu inizialmente verso pazienti con MM che avessero ricevuto almeno due precedenti linee di terapia e che avessero malattia progressiva durante il loro ultimo trattamento.

A seguito di questi studi fu iniziato un nuovo studio di fase III APEX (Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions) che comparava Bortezomib come agente singolo vs Desametasone ad alte dosi nei pazienti con MM recidivato.

Il risultato dello studio, il più vasto a tutt'oggi fornì la dimostrazione della superiorità di Bortezomib nei confronti del Desametasone in termini di incremento di remissioni parziali (PR 38% incluse 6% di CR) un allungamento del TTP (6.22 mesi) e una più lunga overall survival (ad un anno 80%).

I benefici clinici di Bortezomib in mono-terapia per il trattamento del MM recidivato sono stati recentemente confermati in un follow-up pari a 22 mesi: la PR rate era aumentata al 43% e l'OV era di 29.8 mesi.

In aggiunta l'analisi di un sotto-gruppo mostrava che i vantaggi terapeutici erano maggiori fra i pazienti in prima recidiva.

Fra questi pazienti la PR era di 45% con Bortezomib contro il 26% con desametasone, TTP medio fu di 7 mesi vs 5.6, e l'OV ad un anno fu di 89% vs 72%.

Sulla base di questi risultati la FDA e la EMA approvarono un allargamento della indicazione di Bortezomib consentendone l'uso in pazienti con MM che avessero ricevuto almeno una linea di

terapia. Nell'Unione Europea l'indicazione venne allargata a pazienti che erano già stati sottoposti o non potevano essere candidati a trapianto di midollo.

In aggiunta a questi rilevanti dati, l'analisi di sottogruppi nell'ambito dei trials SUMMIT e APEX comprovò che Bortezomib era una efficace opzione nella terapia di salvataggio anche in presenza di avversi fattori prognostici, come una elevata β_2 -microglobulina e anomalie del cromosoma 13.

In particolare una analisi comparativa fra gruppi di pazienti trattati con Bortezomib presentanti delezione del cromosoma 13 e pazienti invece senza anomalie del cromosoma 13 non rilevò una minore percentuale di risposta nei pazienti con delezione, in contrasto con la marcata diminuzione di sopravvivenza riscontrata con trattamento con Desametasone.

Studi che hanno analizzato il trattamento a lungo termine con Bortezomib in pazienti con insufficienza renale non hanno rilevato differenze per quanto riguarda il profilo di tossicità del farmaco. Insufficienza renale avanzata, richiedente emodialisi, non è di per sé una stretta controindicazione all'uso di Bortezomib, sebbene sia raccomandato uno stretto monitoraggio di questi pazienti.

Studi di fase II con Bortezomib in combinazione con altri agenti nel MM avanzato refrattario/recidivato

I risultati degli studi pre-clinici comprovanti la superiorità terapeutica di Bortezomib nei confronti della terapia convenzionale e la additiva attività anti-mieloma nei confronti del Desametasone, fornirono il razionale per lo sviluppo di trials che utilizzavano combinazioni farmacologiche in pazienti con malattia refrattaria e/o recidivata.

In questi trials si utilizzarono varie combinazioni di Bortezomib con farmaci aventi come target il DNA quali la doxorubicina, il melphalan e/o desametasone o talidomide, nel tentativo di superare la chemo-resistenza e di incrementare il margine terapeutico.

Negli studi di fase II SUMMIT e CREST pazienti con risposta sub-ottimale al solo Bortezomib (1.0-1.3 mg/mq) furono trattati con Desametasone mg 20 nel giorno della somministrazione di Bortezomib e nel giorno successivo. Fu osservata una migliore risposta nel 11-18% dei pz confermando i risultati degli studi pre-clinici.

La combinazione di Bortezomib con melphalan fu sperimentata in in due studi di fase II con dose escalation (Bortezomib mg 1/ mq; Melphalan per os 0.25 mg/kg)

La mielosoppressione fu la più comune e severa tossicità osservata e si verificò più comunemente in pazienti citopenici; la risposta minima fu dell'ordine del 68%.

In un altro studio, Bortezomib a dosaggio standard (1.3 mg/mq) fo somministrato associato a melphalan ad una dose iniziale di 10 mg/mq.

Tuttavia, in considerazione della elevata tossicità, in successive coorti la dose di partenza di melphalan fu di 2.5 mg/mq con incremento fino ad un massimo di 7.5 mg/mq.

Dei 21 pazienti valutabili la risposta minima totale fu del 62% e aumentò fino al 76% con aggiunta di desametasone

Sulla scorta di questi incoraggianti risultati è stato recentemente iniziato uno studio includente l'associazione di bortezomib con melphalan, talidomide e prednisone.

In un altro studio di fase II fu testata la combinazione di bortezomib a dosaggio standard (mg 1.3/mq) con desametasone e ciclofosfamide per via orale a basso dosaggio (50 mg/ die) . La risposta globale minima fu del 90%, incluse 12% di CR e un EFS di 12 mesi

Studi pre-clinici hanno dimostrato che Bortezomib sopprime la via anti-apoptotica p44/p42-MAPK mediata che è attivata dalle antracicline ed inibisce l'attivazione CHT mediata dell'NF-kB, poendo così le basi per un utilizzo potenzialmente sinergico per il trattamento del MM refrattario in fase avanzata; è stato dunque intrapreso uno studio di fase I con Bortezomib (escalated-dose 0.9-1.5 mg/mq) e doxorubicina peghilata liposomiale (30 mg/mq). Su 22 pazienti valutabili il 73% raggiunse una PR inclusa un 36% di nCR. Alcuni dei pazienti che raggiunsero una nCR avevano un MM antraiclina-refrattario, confermando un potenziale ripristino della farmaco-sensibilità con l'utilizzo di bortazomib.

Sulla base dell'apparente mancanza di cross-resistenza fra bortezomib e talidomide, fu disegnato uno studio di fase I-II con questi due agenti associati a desametasone (VTD) per il MM avanzato e refrattario.

Furono arruolati 85 pazienti, di questi il 74% aveva anomalie citogenetiche inclusa una delezione del 13 nel 47% e l'84% era stato sottoposto ad un singolo trapianto autologo. Inoltre il 73% dei pazienti era stato trattato e risultato refrattario alla talidomide.

In associazione a Bortezomib al dosaggio di 1.0 mg/mq non fu raggiunta la massima dose tollerata di talidomide, al dosaggio di 1.3 mg/mq la MTD di talidomide fu mg 150/ die.

Fra le tossicità la mielosoppressione è stata quella più frequentemente di grado IV.

La risposta minima globale fu del 55% incluso un 16% di nCR; EFS e OS furono rispettivamente di 9 e 22 mesi.

Sulla base di questi dati il trattamento sec. Schema VTD è stato recentemente incluso fra le possibili opzioni terapeutiche nel MM di nuova diagnosi.

Uno studio di fase II valutò se l'aggiunta di doxorubicina poteva superare la rsisistenza a bortezomib in 22 pazienti in cui la terapia con talidomide (100% dei pz) o la terapia con Bortezomib come singolo agente (95% dei pz) o con VTD (45% dei pz) aveva fallito. Di questi pazienti, 14 furono valutabili per la risposta la PR fu del 57% inclusa un 14% di CR. Trombocitopenia e neuropatia di grado 3-4 furono riportate nel 9.5 e 24 % dei pazienti rispettivamente.

Studi pre-clinici ,documentanti un effetto sinergico apoptotico fra la Lenalidomide(un analogo della talidomide) e Bortezomib, hanno fornito il razionale per uno studio di fase I in dose esclating nel MM refrattario avanzato. Le massime dosi programmate furono di 1.3 mg/mq per bortezomib e di 20 mg/die per lenalidomide in assenza di DLT.21 pazienti valutabili con il 52% di PR; due DLT furono osservate a 1.3 mg/mq di bortezomib e 1 a10 mg/ die di lenalidomide un'altra a 15mg/die.

Bortezomib al dosaggio fra 1 mg e 1.3 mg/mq è ben tollerato anche quando associato a Melphalan ad alte dosi (100-250mg/mq) nel trapianto autologo.

Questo nuovo regime di condizionamento fu testato in una coorte di 37 pazienti, la maggior parte dei quali erano affetti da MM ad alto rischio; fra i 27 pazienti valutabili la PR fu del 36% con una CR del 26% ; tossicità non ematologia consistette in polmonite/sepsi (38%), diarrea (30%), neutropenia febbrile (13.5%) e mucosite (13.5%).

Un altro studio valutò la tollerabilità a bortezomib come agente singolo nella terapia di consolidamento precoce dopo trapianto autologo; 40 pazienti furono arruolati, di questi 33

ricevettero almeno un ciclo post-trapianto di bortezomib alla dose standard (1.3 mg/mq); non fu osservata mielo- tossicità di grado 3-4, mentre venne riscontrata neuropatia iatrogena nel 9% dei pazienti, che portò alla discontinuazione del farmaco in due casi: Da rilevare che nel 42.4% dei pazienti si verificò una riattivazione del virus della Varicella Zoster.

Esperienze preliminari condotte in una piccola serie di pazienti che furono trattati con trapianto di midollo allogenico, suggeriscono che bortezomib può essere utilmente impiegato come terapia di consolidamento sia in pazienti che presentino malattia residua dopo trapianto, sia come terapia di salvataggio in pazienti che presentano recidiva o progressione.

Studi di fase II con bortezomib da solo o in combinazione nel Mieloma Multiplo di nuova diagnosi

A seguito dei risultati incoraggianti e del buon profilo di bortezomib per quanto riguarda la tossicità nel MM refrattario o recidivato, sono stati disegnati numerosi trials clinici per valutare l'efficacia e la tollerabilità di bortezomib ne pazienti giovani ed anziani con MM di nuova diagnosi.

In questi studi il ruolo di bortezomib fu analizzato come singolo agente, o più spesso, in combinazione con altri chemioterapici. Si è particolarmente focalizzata l'attenzione sulla realizzazione di protocolli con bortezomib in combinazione volti a migliorare la risposta nei pazienti candidati a trapianto autologo. In aggiunta alla qualità della risposta importanti end-points furono la definizione del profilo di tossicità con particolare attenzione alle problematiche relative alla raccolta di progenitori emopoietici.

La tossicità , particolarmente quella neurologica valutata nell'impiego di bortezomib al dosaggio standard come singolo agente in pazienti con MM in prima diagnosi fu valutata in uno studio di fase II. In questo studio non fu permessa l'aggiunta di desametasone. Dei 65 pazienti che furono valutabili l'incidenza di neuropatia fu del 55% la maggior parte di grado 1- 2;la presenza di neuropatia sub-clinica fu dimostrata in fase di pretrattamento in ca. il 50% dei pazienti. Dei 60 pazienti valutabili la PR dopo 1 o 2 cicli fu del 28% incluso un 10% di CR.

In un altro studio di fase 2 pazienti con MM di nuova diagnosi che non risposero favorevolmente a bortezobib come agente singolo alla dose standard furono trattati con desametasone(mg 40) il giorno della somministraone di bortezomib e il giorno successivo . 50 pazienti furono arruolati, 48 valutabili, di questi 48 12 ricevettero bortezomib come agente singolo e 36 in combinazione con desametasone per via orale.

La migliore risposta (PR del 90% incluso un 20% di nCR fu osservata dopo 2 cicli nel 50% dei pazienti , dopo 4 cicli nel 79% e dopo sei cicli nel 90% dei pazienti.

L'aggiunta di desametasone a bortezomib migliorò la risposta nel 64% dei pazienti, con la maggior parte dei miglioramenti da malattia stabile o da risposta minima a risposta parziale.

Dei 49 pazienti valutabili una neuropatia sensitiva di grado 2 e grado 3 fu riscontrata rispettivamente nel 37 e 12% dei casi.

Bortezomib in associazione con desametasone fu testato ulteriormente come terapia di prima linea nei pazienti candidati a trapianto autologo: Fra i 48 pazienti valutabili la risposta complessiva fu del 67% inclusa una CR del 17% e un 13% di very good PR. Neuropatia sensitiva fu riscontrata nel 29% dei pazienti, un caso necessitò la discontinuazione del farmaco.

Un nuovo regime terapeutico consistente nella combinazione di Bortezomib a 1.3 mg/mq con dosi crescenti di Doxorubicina (0-9 mg/mq) denominato PAD fu testato su un gruppo di 21 pazienti con MM di nuova diagnosi che erano candidati per il trapianto autologo.

La risposta globale fu del 95%, la nCR aumentò dal 29% dopo PAD al 57% dopo trapianto autologo. Neuropatie sensitive furono il più frequente evento tossico e si verificarono nel 48% dei pazienti. In tutti i pazienti eccetto uno la tossicità neurologica fu di grado 1.

Nel tentativo di ridurre la tossicità neurologica bortezomib fu somministrato al dosaggio ridotto di mg1/mq mentre furono mantenute le dosi di doxorubicina Furono valutabili 19 pazienti, la risposta al regime PAD a dosaggio ridotto fu comparabile a quella precedentemente osservata con dosaggio standard; non fu osservata nessuna neuropatia di grado 3-4. 15 pazienti completarono tutti e quattro i cicli di terapia, fra coloro che non riuscirono a completarli un paziente morì di focolaio bronco-pneumonico e un altro di sepsi da CVC.

L'efficacia e la sicurezza di Bortezomib (da1.0 a 1.9 mg/mq) e di talidomide (da 100 a 200 mg/die) e di desametasone (VTD) fu valutata in uno studio di 38 pazienti con MM di nuova diagnosi.

Di questi pazienti la maggioranza erano candidati al trapianto autologo.

Bortezomib fu somministrato alla dose iniziale di 1.3 mg/mq nel 45% dei pazienti, a 1.5 mg nel 29% e a 1.6 mg/mq nei restanti 26%. La risposta globale fu del 92% inclusa una CR del 18% e non fu influenzata dalla dose di bortezomib, il tempo medio per ottenere una risposta fu di 1.5 mesi, cosicché due cicli di VTD furono necessari per preparare i pazienti al successivo trapianto autologo. A causa del breve periodo di trattamento gli eventi avversi furono non gravi e reversibili.

Ulteriore studio del VTD come trattamento del MM in prima diagnosi fu svolto dal Total Therapy 3 (TT3). In questo studio il VTD fu associato a PACE in infusione continua (cisplatino, doxorubicina, ciclofosfamide, etoposide) per 4 giorni in preparazione al doppio autologo. Comparato al TT2 che includeva talidomide, il TT3 fu più efficace nell'indurre nCR (64 vs 81% rispettivamente), dovuto parzialmente al maggior numero di pazienti che espletò il doppio autologo(68 vs 78% rispettivamente). La mortalità ad un anno trattamento correlata fu sovrapponibile nei due trials.

Sulla base della sinergia di bortezomib con melphalan il gruppo spagnolo disegnò uno studio a dosi crescenti di fase I-II associato a melphalan e prednisone (V-MP) come trattamento di prima linea negli anziani (> di 65 anni) non candidati a ricevere trapianto autologo. Lo studio si articolò in una fase I di dose-finding atta a definire la dose ottimale di bortezomib (1.0 o 1.3 mg/mq) e in una successiva fase 2 per valutare la tossicità e l'efficacia di V-MP. Nella fase I non furono osservate DLTs e la dose raccomandata per la successiva fase II fu di 1.3 mg/mq.

Furono arruolati 60 pazienti, 53 dei quali furono valutabili per l'efficacia.

Dopo una media di 7 cicli, la migliore risposta globale (> PR) fu dell'88% includente un 43% di nCR. La più frequente tossicità di grado 3-4 fra i pazienti che ricevettero più di tre

cicli furono la trombocitopenia(17%) e la neutropenia(24%). Severa neuropatia periferica fu riscontrata nel 6% dei casi.

Effetto di Bortezomib sulla raccolta di PBSCs e sull'engraftment

Negli ultimi dieci anni la terapia front-line con vincristina, doxorubicina e desametasone (VAD) o desametasone da solo è stata la terapia standard per i pazienti affetti da MM più giovani candidati al trapianto autologo.

Il vantaggio di utilizzare il regime terapeutico VAD o simili risiede nell'ottenimento di una buona e rapida risposta, con nessuna tossicità sulle cellule staminali emopoietiche.

Recentemente si sono rese disponibili nuove molecole in grado di agire sia sul clone mielomatoso che sulle cellule stromali midollari, rendendo quindi possibile una riduzione della massa neoplastica in preparazione del trapianto autologo.

Tuttavia questi nuovi agenti possono essere considerati appropriati a condizione che la risposta possa essere massimalizzata, la tossicità sia bassa, e la raccolta di cellule staminali non sia influenzata negativamente.

Ques'ultima condizione è di particolare rilevanza, ed ha rappresentato uno dei più importanti obiettivi fino ad oggi perseguiti con bortezomib, da solo o in combinazione con altri agenti, come terapia di prima linea nel MM di nuova diagnosi.

Uno studio recente ha valutato la raccolta di PBSCs utilizzando G-CSF 10 µg/kg/die in 40 pazienti che ricevettero due cicli di tre settimane con bortezomib come agente singolo alla dose di 1.3mg/mq, trattati in precedenza con desametasone o VAD con eventuale aggiunta di talidomide.

Trentotto pazienti furono sottoposti alla raccolta di PBSCs e trentasei raggiunsero la quota minima di raccolta pari a 2.5×10^6 in una (n=29) o due (n=7) raccolte.

Nella prima aferesi la quota media di raccolta fu di 4.24×10^6 /kg cellule CD34+ (Uy GL, Blood 2005 106 821a).

Due altri studi di fattibilità, per quanto riguarda la raccolta e l'engraftment, utilizzarono bortezomib front-line sia singolarmente che associato a desametasone (Harosseau G, J Clin Oncol 2005;23 suppl 16, abstract ; Jagannath S, Blood 2005 106, 231a abstract).

In uno studio bortezomib, a 1.3 mg/mq, da solo o in associazione con desametasone si dimostrò utilizzabile nella terapia di induzione pre-trapianto autologo. 23 pazienti raccolsero con successo con G-CSF da solo con una media raccolta di 12.55×10^6 /kg di cellule CD 34+ (range da $5.11-40.37 \times 10^6$ /kg) mobilizzate in 2-3 giornate.

L'engraftment post-trapianto fu pronto in tutti i pazienti.

In un altro studio, 53 pazienti non trattati in precedenza che erano candidati per l'autologo ricevettero 4 cicli di tre settimane con bortezomib alla dose di 1.3 mg/ mq seguiti da raccolta di PBSCs con G-CSF da solo; la raccolta fu soddisfacente in 42 su 45 pazienti che si sottoposero alla procedura aferetica e il numero medio di CD34+ raccolte fu di 6.7×10^6 /kg. Un numero sufficiente di cellule staminali fu raccolta nel 78.5% dei pazienti.

È stata riportata recentemente in uno studio che ha utilizzato PAD (3 cicli) in 21 pazienti l'efficienza della raccolta. Di questi pazienti 20 mobilizzò una media di 3.75×10^6 /kg (range $1.6-10.4 \times 10^6$ /kg) CD 34+ con ciclofosfamide 1.5 g/ mq e G-CSF; in tre pazienti non fu raggiunta la

soglia sufficiente di raccolta stabilita in $> 2 \times 10^6$ /kg CD 34+. Nei 18 pazienti che ricevettero chemioterapia ad alte dosi e trapianto il tempo medio di recupero dei neutrofili e delle piastrine fu di 15.5 giorni e di 13 giorni rispettivamente (range 10-33)

In altri due studi la raccolta fu facilmente espletata con G-CSF da solo in pazienti precedentemente trattati con VTD (Alexanian R, Blood 2004) 104; 64° abstract) o con l'aggiunta di VTD a PACE (4 giorni di infusione continua di cis-platino, doxorubicina, ed etoposide) come parte del TTF trial (Barbogio B, Blood 2004 : 104:156a abstract).

In quest'ultimo studio coorti di pazienti ricevettero bortezomib in dosi crescenti nel primo e nel secondo trattamento.

Tutti gli 11 pazienti mobilizzarono nel primo ciclo raggiungendo una raccolta $> 20 \times 10^6$ /kg CD 34+.

Al contrario dei 24 pazienti che ricevettero due cicli di trattamento , ciascuno dei quali comprendente quattro dosi di bortezomib, 6 (25%) non raccolsero adeguatamente (Cottler_Fox M Blood 2004): 104:788a, abstract).

Comparati con il precedente trial che incorporava talidomide, i pazienti che ricevettero VTD-PACE come parte del TT3 raccolsero con una maggiore efficienza (20 vs 27 $\times 10^6$ /kg) (Barbogio B, Blood 2005; 106: 337a, abstract).

Tossicità

La più comune tossicità riscontrata negli studi di fase II in tutti i pazienti affetti da MM trattati con bortezomib alla dose standard di 1.3 mg/mq è stata l'astenia (65%), tossicità gastro-enterica (nausea 64%, diarrea 51%; stipsi 43%; vomito 36% trombocitopenia 43% e neuropatia periferica 37% quest'ultima di solito reversibile.

NEUROPATIA PERIFERICA

La neuropatia è stata associata a vari agenti nel trattamento del MM, inclusi talidomide e vincristina, così come con la patologia essa stessa.

La neuropatia osservata durante il trattamento con bortezomib è prevalentemente sensitiva caratterizzata da dolore, parestesie, disestie ed insensibilità, con il distretto distale più colpito rispetto a quello prossimale.

Dei 256 pazienti trattati con Bortezomib nei SUMMIT e CREST trials, il 35% sviluppò una neuropatia sensitiva trattamento-correlata, con il 13% e l'1% di pazienti che la sviluppò di grado 3 e 4 rispettivamente.

Globalmente una riduzione della dose fu necessaria nel 12% dei pazienti con un 5 % che dovette discontinuare il farmaco a causa della neuropatia.

35 pazienti con significativa neuropatia furono seguiti dopo riduzione della dose o sospensione; il 71% mostrò miglioramento o risoluzione del quadro durante il trattamento o dopo la sospensione.

Il tempo medio di miglioramento o risoluzione della neuropatia fu di 47 giorni (da 1 a 529 gg) dall'ultima dose di bortezomib.

Tuttavia circa l'80% dei pazienti arruolati nei trials SUMMIT e CREST avevano evidenza di neuropatia pre-trattamento.

Dei pazienti senza neuropatia soltanto 2/60 (3%) svilupparono neuropatia di grado 3 durante il trattamento.

Dei pazienti senza NP solo il 12% sviluppò NP con ulteriore trattamento con bortezomib.

Una ulteriore quota di pazienti 16 di 22 (73%) non riportò un peggioramento della NP col proseguo del trattamento.

Un precoce riconoscimento della neuropatia è essenziale.

Lo sviluppo anche di una modesta neuropatia dovrebbe imporre la pronta riduzione del dosaggio di bortezomib.

Una più bassa incidenza di neuropatia fu riscontrata nello studio CREST con bortezomib a 1.0 mg/mq rispetto alla dose standard di 1.3 mg/mq, suggerendo un mantenimento di risposta a fronte di un decremento del dosaggio.

I pazienti dovrebbero essere incoraggiati a segnalare difficoltà o limitazione dell'abilità funzionale.

I comuni criteri di tossicità per il grading della NP possono non costituire una valutazione ottimale per la NP derivante da bortezomib, particolarmente a causa dell'inclusione della valutazione soggettiva e dell'esclusione del dolore come criterio.

Una regolare valutazione clinica è fondamentale per valutare i cambiamenti nella sintomatologia del paziente.

Gabapentin o amitriptilina possono essere di aiuto nel trattamento di NP.

In aggiunta supplemento vitaminico e applicazione topica di capsicina possono anche essere di qualche beneficio.

TROMBOCITOPENIA

La più comune tossicità ematologica associata all'impiego di bortezomib è una transitoria piastrinopenia., con ripristino dei valori normali nel periodo di intervallo fra i cicli.

In media l'andamento di decremento e normalizzazione delle conte piastriniche che si verifica durante ciascun ciclo di terapia, non si associa con una tossicità cumulativa considerando un trattamento di 8 cicli.

Nei pazienti che rispondono al trattamento, la media del conteggio piastrinico al giorno 1 (pre-dose) sembra aumentare progressivamente con i cicli successivi dal secondo ciclo in avanti.

In una analisi di 228 pazienti che ricevettero bortezomib alla dose di 1.3 mg/ mq nel contesto dei trials SUMMIT e CREST , il 43% sviluppò trombocitopenia durante il trattamento;il 13% trombocitopenia di grado 1-2 e il 30% di grado3-4.

Il pater di trombocitopenia è indipendente dal coinvolgimento midollare pre-trattamento, essendo state riscontrate piastrinopenia del 64% e 58 % in pazienti con infiltrazione midollare > del 50% e < del 50% rispettivamente.

Lo sviluppo di trombocitopenia di grado 3-4 bortezomib-associata è dipendente dal conteggio piastrinico pre-terapia. Il conteggio piastrinico di partenza è a sua volta esso stesso dipendente da una insufficienza midollare verosimilmente trattamento-indotta e in particolare modo dipendente

dalla severità della malattia, evidenziata dal grado di infiltrazione midollare e dal livello di paraproteina sierica.

Poiché la riduzione piastrinica si verifica precocemente, è improbabile un suo sviluppo con un conteggio di base $\geq 70.000/\mu\text{l}$.

I livelli di trombopoietina sierica non sono ridotti durante la terapia con Bortezomib.

Bortezomib non sembra essere direttamente cito-tossico per la maggior parte delle cellule midollari normali, o citolitico verso i progenitori midollari.

La megacariocitopoiesi si pensa sia dipendente da NF-kB e Bortezomib può sopprimere temporaneamente questo processo spiegando l'insorgenza della piastrinopenia.

Durante i trials di fase II la piastrinopenia non fu associata con eventi emorragici importanti, sebbene ci fu un episodio di emorragia gastro-enterica associato a piastrinopenia di grado 3 ($\text{PLT} < 50.000/\mu\text{l}$).

E' appropriato eseguire un controllo della crasi ematica prima di ciascuna dose di bortezomib per i primi 2 cicli, e in seguito a giudizio clinico, basandosi sulla trombocitopenia riscontrata nei primi due cicli e sulla risposta midollare del paziente.

Tuttavia in pazienti che presentino trombocitopenia basale il conteggio piastrinico deve essere strettamente monitorato.

Nei pazienti che sviluppano significativa trombocitopenia ($\text{PLT} \leq 30.000 \mu\text{l}$) entro il giorno 11, il conteggio dovrebbe essere ripetuto al giorno 14 o 15 per determinare se si è verificata una ulteriore riduzione del conteggio piastrinico e se sia necessario istituire supporto trasfusivo per prevenire importanti complicazioni emorragiche.

In generale bortezomib dovrebbe essere sospeso all'insorgenza di tossicità non ematologica di grado 3 ed ematologica di grado 4, con esclusione della neuropatia periferica.

Alla risoluzione della sintomatologia il trattamento dovrebbe essere ripreso ad una dose ridotta del 25% (1.3 mg/mq ridotta ad 1.0 mg/mq ; 1.0 mg/ mq ridotta a 0.7 mg/ mq).

Nella pratica clinica, viene a volte scelto di continuare il trattamento al dosaggio di partenza supportando il paziente con terapia trasfusionale, questo particolarmente durante i primi due cicli di terapia.

In pazienti con MM avanzato e con moderata a severa trombocitopenia ($\text{PLT} > 50.000\mu\text{l}$) e potenziali fattori di rischio per eventi emorragici, il potenziale beneficio terapeutico dovrebbe essere bilanciato contro i possibili rischi.

Concentrati piastrinici, globuli rossi concentrati e fattori di crescita dovrebbero essere utilizzati nel trattamento della tossicità ematologica.

Nei pazienti che presentano anemia, la causa della stessa dovrebbe essere attentamente valutata, eritropoietina, ferro, B₁₂ e acido folico somministrati se necessario.

Similmente in caso di neutropenia, situazione clinica nella quale l'uso di G-CSF può essere di beneficio.

Trasfusioni profilattiche di concentrati piastrinici dovrebbero essere considerati nei pazienti con trombocitopenia, particolarmente in quelli ad elevato rischio di sanguinamento.

Negli studi SUMMIT e CREST l'incidenza di supporto piastrinico fu bassa, con il 14% dei pazienti che ricevette supporto trasfusionale durante il primo ciclo.

Il conteggio piastrinico basale medio per pazienti che ricevettero trasfusioni fu di $65.000/\mu\text{l}$.

Trombocitopenia che non si risolve nel periodo inter-ciclico può indicare progressione di malattia.

ALTRE TOSSICITA' EMATOLOGICHE

Tossicità ematologiche associate con terapia con Bortezomib includono neutropenia ed anemia, ma non sono di solito problematiche.

Nel SUMMIT trial, l'11% e il 3% dei pazienti sviluppò neutropenia di grado 3 e di grado 4 rispettivamente; < 1% sviluppò neutropenia febbrile, e l'1% necessitò la sospensione del trattamento come risultato della neutropenia.

Lo sviluppo di anemia severa fu un evento infrequente, con 8% dei pazienti che svilupparono anemia di grado 3 e nessun caso di anemia di grado 4.

La frequenza di necessità di supporto trasfusionale diminuì, nei pazienti che rispondevano al trattamento, nel corso della terapia.

Alcuni pazienti che erano trasfusione-dipendenti prima della terapia nel trial SUMMIT divennero trasfusione indipendenti se ottenevano una risposta.

ASTENIA

Dall'analisi dei dati desunti dalle risultanze⁴ dei trials SUMMIT e CREST che assunsero bortezomib alla dose di 1.3 mg/mq, la condizione di astenia risultò essere il più comune effetto collaterale riportato, con una percentuale pari al 65% dei pazienti, portò alla discontinuazione del farmaco nel 2% dei pazienti.

Nello studio SUMMIT, il 41% dei pazienti sviluppò astenia e il 12% presentò un grado pari a 3.

Si riscontrò una riduzione dell'astenia nei pazienti che ottenevano una risposta con una riduzione di malattia.

Nel trial CREST, il 73% e il 68% dei pazienti sviluppò astenia e l'8 e il 7% la sviluppò di grado 3 rispettivamente con bortezomib alla dose di 1.3 e 1.0 mg/mq.

La comparsa di astenia si aveva usualmente entro i primi 2 cicli, persisteva per parecchi cicli prima della risoluzione.

Prednisone a basse dosi e una attenta idratazione può essere di beneficio nel trattamento dell'astenia.

Il trattamento dovrebbe essere sospeso all'insorgenza di una astenia di grado 3 (definita secondo i criteri dell' Assessment of Chronic Illness Therapy).

Alla risoluzione il trattamento può essere ripreso con una riduzione della dose del 25%.

TOSSICITA' GASTRO-ENTERICA

Nei trials di fase II con utilizzo di bortezomib alla dose di 1.3 mg/mq le più comuni tossicità gastroenteriche furono nausea (64%) diarrea (51%) stipsi (43%) e vomito (35%).

Tali tossicità possono insorgere in qualsiasi momento durante il trattamento, anche se la maggiore incidenza fu osservata durante i primi due cicli e fu generalmente di entità da lieve a moderata.

La nausea ed il vomito possono richiedere il ricorso alla terapia sintomatica anti-emetica.

La sindrome dissenterica può essere controllata con agenti anti-diarroici come loperamide idroclorato o difenossilato idroclorato. Una modesta diarrea può essere controllata da cambiamenti dietetici. Può rendersi necessaria terapia riequilibrante idro-elettrolitica.

La stipsi può essere trattata con terapia sintomatica, i pazienti dovrebbero essere incoraggiati ad assumere un quantitativo abbondante di liquidi, evitando la caffeina.

Deve essere sottolineato che la stipsi può essere il risultato di neuropatia del sistema autonomo in forma di ileo paralitico, sebbene ulteriori studi siano necessari per confermare questa ipotesi.

Sono stati inoltre riportati casi di pancreatite.

IPOENSIONE

Si è riscontrato ipotensione ortostatica/posturale nel 12% dei pazienti.

Bortezomib dovrebbe essere utilizzato con cautela nei pazienti con una storia di sincope, pazienti che ricevono farmaci noti come potenzialmente associati ad ipotensione, e in pazienti disidratati.

Il trattamento della ipotensione ortostatica/posturale può richiedere la rivalutazione dei farmaci anti-ipertensivi, l'idratazione, aumento dell'assunzione di sale, la somministrazione di steroidi con effetti mineralcorticoidi; i pazienti dovrebbero passare lentamente dal clinostasi all'orto-stasi, mantenere una moderata attività fisica, guidare o essere addetti a macchinari con cautela.

I pazienti dovrebbero segnalare qualsiasi episodio di ipotensione o sintomatologia di tipo vertiginoso.

Questa sintomatologia può essere ridotta da concomitante idratazione con ciascuna dose di bortezomib.

SINDROME DA LISI TUMORALE (TLS)

La sindrome da lisi tumorale è rara nel MM, con una incidenza del 1.4% (7/496) in pazienti trattati con bortezomib in tre studi multicentrici di fase III, un caso riportato di TLS bortezomib-correlato.

In ciascuno di questi casi, TLS si manifestò durante il primo ciclo di terapia, o entro 21 giorni dal ri-trattamento con bortezomib.

Non sono state riportate morti da TLS, e la sintomatologia tipicamente regredì entro una settimana con terapia di supporto.

Pazienti con MM particolarmente quelli con elevata massa tumorale, dovrebbero essere monitorati per segni di TLS durante il primo ciclo di terapia.

Dovrebbero essere considerati per il trattamento idratazione e allopurinolo.

USO DI BORTEZOMIB NELL'INSUFFICIENZA RENALE

Le opzioni terapeutiche sono limitate per pazienti che presentano MM associato ad insufficienza renale.

Jagannath et al. Riportano che pazienti con insufficienza renale possono essere trattati efficacemente e senza rischi aggiuntivi con bortezomib.

Dieci pazienti con clearance della creatinina fra 14 e 30 ml/min furono arruolati nei trials di fase II (SUMMIT e CREST).

Comparati con la popolazione globale dello studio, questi pazienti presentavano valori più elevati di β_2 microglobulina sierica, più bassi valori di KPS score e una maggiore incidenza di malattia delle catene leggere.

Il trattamento fu iniziato alla dose di 1.3 mg/mq in 6 pazienti e alla dose di 1 mg/mq in 4 pazienti.

Dei 10 pazienti 7 completarono l'intero piano terapeutico di 8 cicli.

Le risposte nei 10 pazienti con severa insufficienza renale inclusero 2 PRs, 1 MR e 1 malattia stabile (4 pazienti progredirono, 2 pazienti non furono valutabili).

La risposta in questo piccolo subset di pazienti con severa insufficienza renale fu dunque comparabile a quella ottenuta nella globalità della popolazione allo studio.

L'incidenza di seri effetti collaterali si correlava con la gravità dell'insufficienza renale, con percentuali del 41%, 51% e 60% per valori di clearance di creatinina rispettivamente di >80 , 51-80 e ≤ 50 ml/min.

Eventi avversi \geq del grado 3 che si verificarono in una percentuale di pazienti \geq del 10% con clearance della creatinina di >80 , 51-80 e ≤ 50 ml/min compresero trombocitopenia, astenia, diarrea, anemia, neutropenia, NP, dispnea e debolezza.

L'unico evento avverso ad avere una incidenza maggiore statisticamente significativa fu la dispnea.

Sono in corso studi per definire la farmacocinetica e il profilo di tossicità di bortezomib nei vari gradi di insufficienza renale.

Giudizio clinico deve essere impiegato per definire rischi potenziali pesati contro i benefici in presenza di insufficienza renale.

In attesa che ulteriori dati siano disponibili, pazienti con una clearance della creatinina ≤ 30 ml/min. possono essere trattati con bortezomib secondo lo schema standard (1.3 mg/mq nei giorni 1-4-8-11 di un ciclo a 21 gg).

Tuttavia questi pazienti devono essere monitorati strettamente ed, in caso di neutropenia o altre tossicità significative, la dose deve essere prontamente ridotta a 1.0 mg/mq o a 0.7 mg/mq.

PAZIENTI IN TRATTAMENTO EMODIALITICO

A tutt'oggi non sono stati pubblicati dati e nessuna raccomandazione formale è stata redatta sul trattamento con bortezomib in pazienti sottoposti a trattamento emo-dialitico.

Come misura precauzionale questi pazienti dovrebbero essere monitorati il più strettamente possibile per l'insorgenza di tossicità.

In uno studio di fase II recentemente completato, la dose iniziale di bortezomib è stata ridotta a 1.0 mg/mq nei pazienti con insufficienza renale severa inclusi quelli in dialisi.

Bortezomib è una piccola molecola e dovrebbe essere dializzabile. Per questa ragione è consigliabile somministrare bortezomib nei giorni in cui il paziente non viene sottoposto a trattamento emo-dialitico, fino a quando ci sono almeno 72 h di intervallo fra le somministrazioni.

Alternativamente, poiché bortezomib ha una breve emi-vita, è possibile somministrare bortezomib dopo la dialisi, o almeno 2 ore o più prima della dialisi.

Si attendono comunque i risultati di ulteriori studi per definire meglio l'uso di bortezomib in questa categoria di pazienti.

USO DI BORTEZOMIB NELL'INSUFFICIENZA EPATICA

Sono disponibili dati limitati riguardo l'uso di bortezomib in pazienti con insufficienza epatica.

Nel trial SUMMIT, in cui furono esclusi i pazienti con valori di bilirubina o di transaminasi significativamente elevati, la somministrazione di bortezomib non ebbe nessun significativo effetto sui valori di fosfatasi alcalina, transaminasi, e bilirubina durante gli 8 cicli di trattamento.

Tuttavia è stato riportato un caso recente di tossicità epatica bortezomib-correlato.

Poiché bortezomib è metabolizzato principalmente dagli enzimi citocromiali, una significativa insufficienza epatica può influenzare il metabolismo di bortezomib ed aumentare la probabilità di interazioni farmacologiche.

Fino a quando saranno disponibili ulteriori dati, pazienti con modesta insufficienza epatica devono essere strettamente monitorati durante il trattamento con bortezomib.

Pazienti con significativa insufficienza epatica, definita da incrementi enzimatici epatici di 2.5-3 volte il limite superiore, non dovrebbero essere trattati con bortezomib.

PROFILASSI ANTI-INFETTIVA

Ulteriori dati sono necessari prima che si possano formulare raccomandazioni formali per la profilassi anti-infettiva.

Nel frattempo la profilassi impiegata varia da centro a centro.

Alcuni centri hanno osservato una più alta incidenza di infezioni da Herpes Zooster e quindi adottano una profilassi con Acyclovir; altri centri impiegano la profilassi sulla base della storia infettiva del singolo paziente.

SVILUPPO DI NUOVI REGIMI TERAPEUTICI

Una delle ipotesi di lavoro su cui si è basato lo sviluppo di nuovi regimi di combinazione degli inibitori del proteasoma con altri chemioterapici fu l'abilità degli stessi di bloccare l'inducibilità della chemio-resistenza attraverso NF-kB.

E' dunque forse ironico che molti studi abbiano mostrato che gli inibitori del proteasoma essi stessi inducano chemio-resistenza.

Uno dei meccanismi meglio studiati coinvolge le heat shock proteins (HSPs) che per molti anni si dimostrò essere attivate dall'inibizione del sistema ubiquitinico.

Le HSPs indotte giocano un ruolo come sistemi navetta cellulari e come modulatori di vie apoptotiche, particolarmente quelle coinvolgenti i mitocondri, conferendo protezione dagli stress come ad esempio i chemioterapici.

Nel Mieloma Bortezomib può indurre l'espressione di HSP-90 -27 e -70.

Geldanamacina e la sua famiglia di analoghi con il sito legante l'ATP di HSP-90 inibendo HSP-90, sensibilizzando le cellule di mieloma agli inibitori del proteasoma.

Inibitori farmacologici diretti di HSP-27 non sono stati ancora identificati, ma siccome HSP-27 viene attivato attraverso una modalità P38/ MaPK dipendente P38 può servire come target surrogato. Inibitori di P38 esistono e ci sono risultati incoraggianti che dimostrano che l'inibizione di P38 aumenta la sensibilità agli inibitori del proteasoma in linee cellulari di mieloma.

Porre come target HSP-70 costituisce anch'essa una strategia interessante e l'uso di oligonucleotidi anti-senso può incrementare l'attività degli inibitori del proteasoma.

Nonostante inibitori farmacologici diretti di HSP-70 nn siano ancora stati sviluppati, può essere comunque possibile modulare l'attività anti-apoptotica di questa proteina attraverso altri approcci.

HSP-70 è in parte indotta attraverso il trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione STAT-1 che risulta esso stesso attivata da IL-6.

Questa citochina è nota svolgere un ruolo fondamentale nella patogenesi del mieloma multiplo costituendo essa stessa un target razionale.

Down-regolazione di IL-6 potrebbe risultare in soppressione di HSP-70 e in chemiosensibilizzazione. Concordemente a questa possibilità è stato da alcuni autori rilevato (Orlowski R. dati non pubblicati) che l'inibizione del legame di IL-6 alle cellule di mieloma down-regola l'attivazione di STAT-1, diminuisce l'induzione bortezomib indotta di HSP-70 e aumenta l'apoptosi mediata dagli inibitori del proteasoma.

Recenti studi hanno anche suggerito che l'attività anti mieloma svolta dagli inibitori del proteasoma possa in parte derivare dalla loro interferenza con la risposta delle proteine non strutturate del reticolo endoplasmatico.

Questa via garantisce alle plasmacellule una congrua strutturazione delle immunoglobuline, permettendo l'eliminazione di proteine alterate.

Bortezomib sopprime questa risposta bloccando il fattore chiave di trascrizione XBP-1, conducendo all'apoptosi delle cellule di mieloma.

Studi pre-clinici hanno anche mostrato che la duplice inibizione dell'aggregoma e del proteasoma, una via alternativa per la rimozione di proteine alterate, risulta in attività anti-mieloma sinergica.

L'ipotesi che la modulazione delle HSPs in combinazione con l'inibizione del proteasoma sta cominciando ad essere testata in clinica.

Un report preliminare di uno studio di fase I che ha utilizzato la combinazione Bortezomib e geldamicina ha dimostrato essere tollerabile e una qualche evidenza di attività biologica.

Inibitori farmacologici della via p38 MAPK IL-6 sono attualmente in fase di studio come agenti singoli in previsione di essere poi testati in regime di combinazione.

SVILUPPI FUTURI NELL'INIBIZIONE PROTEASOMICA

Con la validazione del proteasoma come target per la terapia anti-neoplastica, vi è ora una opportunità per approntare inibitori del proteasoma ancora più efficaci.

Inibitori con una più ampia specificità e una irreversibilità di legame possono avere molteplici attività anti-neoplastiche, e possono essere in grado di superare la resistenza a bortezomib.

Conforto in questo progetto è stato riscontrato in risultati preliminari sull'uso di un composto lactacistina-correlato, il nuovo inibitore non peptidico NP-0052.

Questo agente si è dimostrato in grado di indurre apoptosi e superare la chemioresistenza in linee cellulari di mieloma e in cellule fresche isolate, agendo sinergicamente con bortezomib.

Questi risultati supportano certamente la traslazione di questo agente nell'uso clinico, anche se gli inibitori irreversibili possono anche avere una aumentata tossicità per il ruolo rivestito dal proteasoma nella normale omeostasi cellulare.

Un altro approccio promettente è quello di trovare inibitori più specifici di bortezomib.

Il proteasoma non è una struttura statica e , sotto l'influenza di specifiche citochine, come il γ interferon, tre sub-unità proteoliticamente attive denominate X, Y e Z sono rimpiazzate da differenti sub-unità note come proteine a basso peso molecolare (LMP) -2 -7 e -10.

Questa struttura è nota come immuno-proteasoma, poiché può giocare un ruolo nella presentazione antigenica MHC di classe I mediata; ma l'immuno-proteasoma è anche espresso costitutivamente da alcune cellule di origine emopoietica.

Inibitori specifici dell'immunoproteasoma potrebbero avere l'abilità di indurre apoptosi solo in neoplasie ematologiche , risparmiando altri tessuti.

Se sarà confermato, alcune delle tossicità associate con bortezomib, come la neuropatia ed effetti gastro-intestinali, potrebbero essere ridotti o aboliti preservando l'attività anti-tumorale.

Un gruppo di ricercatori ha evidenziato una serie di inibitori che hanno l'abilità in vitro di inibire preferenzialmente il proteasoma contenente LMP, risparmiando il proteasoma contenente XYZ.

Incubazione delle cellule contenenti LMP- proteasoma con questi agenti determinò l'induzione di apoptosi, risparmiando le linee cellulari contenenti XYZ.

Bortezomib mostrò, in comparazione, attività non specifica e indusse apoptosi in tutte le linee cellulari.

CONCLUSIONI

La via proteasomica ubiquitina-mediata si è ormai imposta come target fondamentale nella terapia dei pazienti con neoplasie ematologiche , quali il mieloma multiplo e il Linfoma non H.

Lo sviluppo dell'inibitore di prima generazione, bortezomib è stato guidato da studi di laboratorio che hanno indicato il più appropriato uso clinico di questo agente in queste patologie.

Studi di laboratorio hanno poi condotto all'ideazione di regimi terapeutici di seconda generazione con bortezomib in combinazione con altri agenti chemioterapici.

Sta già cominciando ad emergere una terza generazione di trattamenti basati sulla conoscenza dei meccanismi molecolari di inibizione del proteasoma a livello dell'espressione genica e del profilo proteico, che prevede l'incorporazione di nuovi agenti come gli inibitori di HSP-90.

Una nuova classe di inibitori è inoltre allo studio.

Questi studi forniranno importanti informazioni riguardo alla migliore sequenza e combinazione di questi agenti e si spera possano identificare il trattamento per migliorare la prognosi dei pazienti con Mieloma ed altre neoplasie ematologiche nel vicino futuro.

BIBLIOGRAFIA

Chiecanover A, Orian A, Schvanz AL. Ubiquitin mediated proteolysis : biological regulation via destruction. *Bioassay* 2000; 22 442-451.

Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B, Orłowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9 6316-6325.

Orłowski M, Wilk S. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Bioch Biophys* 2000; 383: 1-16.

Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, et al. Proteasome inhibitors : a novel class of potent and effective anti-tumor agents. *Cancer Res.* 1999 ; 59:2615-2622.

Zwicki P, Voges D, Baumeister W. The proteasome : a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis *Philos Trans R Soc Lond Sci* 1999 354: 1501-1511.

Almond JB, Cohen GM. The proteasome a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2002; 16: 433-443.

Li B, Dou QP. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome dependent pathway; involvement in tumor survival and progression, *Proc Natl Acad Sci USA* 200; 97:3850-3855.

Hidoshima T, Palombella VJ, Richardson P, Chauhan D, Elliot PJ, Adams J et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001;61: 3071-376.

Ma MH , Yang HH, Parker K, Manyak S, Friedman JM, Altamirano C et al. The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma cells to chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res* 2003; 9 1136-1144.

Chauhan D, et al. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity tu multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 2003; 101: 2377-2380.

Dolic J, Masdehors P, Omura S, Cosset JM, Dumont J, Binet JL et al. The proetasome inhibitor lactacystin induces apoptosis and sentizes chemo and radioresistant human chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to TNF alpha initiated apoptosis. *Br. J. Cancer* 1998 77:1103-1107.

Orlowski RZ, Eswara JR, Lafond-Walker A, Grever MR, Orlowski M, Dang CV. Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res* 1998; 58:4342-4348.

Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Bortezomib (PS-341) a novel first-in-class protasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control* 2003;10:361-369.

Adams J. Benke M, Chen S, Cruickschank AA, Dick LR, Grenier L et al. Potent and selective inhibitors of proteasome dypeptidil boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8:333-338.

Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Anderson KC. Identification and validation of novel therapeutic agents for multiple myeloma. *J. Clin Oncol* 2005; 23:6345-6350

Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Libermann TA et al. Multiple Myeloma cell adhesion –induced interleukine-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kB . *Blood* 1996; 87:1104-1112

Chauhan D, Pandey P, Hideshima T, Treon S, Raje N, Davies Fe et al. SHP2 mediates the protective effect of interleukine-6 against dexamethasone induced-apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 27845-27850.

Dankbar B, Pedro T, Leo R, Feldman B, Kropff M, Mesters RM et al. Vasclat endothelial grow factor and interlukine -6 in paracrine tumor styromal cells interactions in multiple myeloma. *Blood* 2000; 95:2630-2636.

Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai JT et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregolates vascular endothelial grow factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia* 2001; 15:1950-1961.

Lichenstein A, Tu Y, Fady C, Vescio R, Berenson J. Interleukine-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells . *Cell Immunol* 1995;162:248-255.

Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T et al. NF-KB as a therapeutic target in multiple myeloma *J Bio Chem* 2002; 277: 16639-16647.

Anderson KC Targeted therapy for multiple myeloma . *Semin ematol* 2001; 38: 286-294.

- Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma; therapeutic applications. *Oncogene* 2001; 20: 4519-4527.
- Miltsiades N, Miltsiades CS, Poulaki V., Chauhan D, Fanaourakis G, Gu X, et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14374-14379.
- Hideshima T, Miltsiades C, Akyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P et al. Molecular mechanisms mediating anti-myeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood* 2003 101 :1530-1534.
- Berenson JR, Ma HM, Vescio R, The role of nuclear factor kappa- B in the biology and treatment of multiple myeloma. *Semin Oncol* 2001; 28: 626-633.
- Feinman R, Koury G, Thames M, Barlogie B, Epstein J, Siegal DS. Role of Nf-kB in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid-induced apoptosis by bcl-2. *Blood* 1999; 93: 3044-3052.
- Pham LV, Tamaro AT, Yoshimura LC, Lo P, Ford RJ. Inhibition of constitutive activation in mantle cell lymphoma B cells leads to cell cycle arrest and apoptosis. *J Immunol* 2003; 171: 88-95.
- Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, Shahl S et al. Phase I trial of proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2002; 20:4420-4427.
- Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 2003; 348:2609-2617.
- Jagannath S, Barlogie B, Berenson J, Diegel D, Irwin D, Richardson PG et al. A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *Br J Hematol* 2004; 127: 165-172.
- Richardson PG, Sonnevold P, Schuster MV, Irwin D, Stadtmauer MA, Facon T et al. Bortezomib or high dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma, *N Engl J Med* 2005; 352: 2487-2408.
- Bladè J, Samson D, Reece D, Apperley J, Bjorkstrand B, Gahrton G et al. Criteria for evaluating response disease and progression in patients with multiple myeloma treated by high dose therapy and hemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT, European Group For Blood and Marrow Transplant. *Br J Hematol* 1998; 102:1115-1123.
- Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D et al. Clinical factor predictive of outcome with bortezomib in patients with relapsed, refractory multiple myeloma. *Blood* 2005; 106:2977-2981.
- Berenson J, Jagannath S, Barlogie B, Siegel DT, Alexanian R, Richardson PG, et al. Safety of prolonged therapy with bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma *Cancer* 2005; 104: 2141-2148.
- Jagannath S, Barlogie B, Berenson JR, Singhal S, Alexanian R, Srkalovic G et al. Bortezomib in recurrent and/or refractory multiple myeloma. Initial clinical experience in patients with impaired renal function. *Cancer* 2005; 103:1195-1200.

Lonial S, Walker EK, Richardson PG, Jagannath S, Orłowski RZ, Giver CR et al. Risks factors and kinetics of thrombocytopenia associated with bortezomib for relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood* 2005; 106:3777-3784.

Berenson JR, Yang HH, Sadler K, Jarutirasarn SG, Vesco RA, Mapes R et al. Phase I/II trial assessing bortezomib and melphalan combination therapy for the treatment of patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2006; 6: 937-944.

Orłowski RZ, Voorhees PM, Garcia MA, Hall MD, Kudrik FJ, Allred T et al. Phase I trial of proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood* 2005; 105: 3058-3065.

Small GW, Somasundaram S, Moore DT, Shi YY, Orłowski RZ. Repression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 by anthracycline contribute to their anti-apoptotic activation of P44/42-MAPK. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 ; 207: 861-869.

Mitsiades N, Mitsiades CN, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T et al. Apoptotic signal induced by immuno-modulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood* 2002; 99: 4525-4530.

Oakenvee HE, Popat R, Curry N, Smith P, Morris C, Drake M et al. PAD combination therapy (PS-341 /bortezomib, doxorubicin and dexamethasone) for previously untreated patients with multiple myeloma. *Br J Hematol* 2005; 129: 755-762.

Jagannath S, Durie BJ, Wolf J, Camacho E, Irwin D, Luizky J et al. Bortezomib therapy alone and in combination with dexamethasone for previously untreated patients with multiple myeloma. *Br J Hematol* 2005; 129: 776-783.

Cavo M, Zamagni E, Tosi P, Tacchetti P, Cellini C, Cangini D, et al. Superiority of thalidomide and dexamethasone over vincristine –doxorubicine dexamethasone (VAD) as primary therapy in preparation of autologous transplantation for multiple myeloma. *Blood* 2005; 106:35-39.

Rajkumar SV, Blood E, Sesole D, Fonseca R, Greipp PR. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *Clin Oncol* 2006; 24: 431-436.

Rajkumar SV, Hayman SR, Lacy MQ, Dispenzieri A, Geyer SM, Kabat B et al. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood* 2005; 106: 4050-4053.

INDICE

Introduzione:	pag. 2
Introduzione ed overview della proteolisi ubiquitina mediata:	pag. 3
La via proteolitica ubiquitinica:	pag. 4
Struttura gerarchica del sistema ubiquitinico	pag. 5
Struttura del proteasoma	pag. 5
Funzione del proteasoma	pag. 6
Regolazione del proteasoma	pag. 7
Ubiquitazione e patogenesi	pag. 8
Neoplasie	pag. 9
Inibitori del proteasoma	pag. 9
Inibitori del proteasoma nella terapia del mieloma multiplo	pag. 11
Inibitori del proteasoma e superamento della resistenza alle terapie standard	pag. 14
Bortezomid: TRIALS	pag. 15
Neuropatia periferica	pag. 22
Trombocitopenia	pag. 23
Altre tossicità ematologiche	pag. 24
Astenia	pag. 25
Tossicità gastro-enterica	pag. 25
Ipotensione	pag. 26
Sindrome da lisi tumorale (TLS)	pag. 26
Uso di Bortezomid nell'insufficienza renale	pag. 27
Pazienti in trattamento emodialitico	pag. 28
Uso di Bortezomid nell'insufficienza epatica	pag. 28
Profilassi anti-infettiva	pag. 28
Sviluppo di nuovi regimi terapeutici	pag. 29
Sviluppi futuri nell'inibizione proteasomica	pag. 30

Conclusioni

Bibliografia

Indice

pag. 31

pag. 32

pag. 36