

Alma Mater Studiorum - Università degli Studi di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN EMATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE

ED EMOLINFOPATOLOGIA

CICLO XXII

Scienze Mediche (MED 15)

PRALATREXATE SINERGIZZA

IN VITRO ED IN VIVO CON L'INIBITORE DEL PROTEOSOMA

BORTEZOMIB

IN MODELLI PRE-CLINICI DI LINFOMA NON HODGKIN T

Presentata dalla Dott.ssa Enrica Marchi

Coordinatore Dottorato:

Chiar.^{mo} Prof Stefano A. Pileri

Relatore

Prof. Pier Luigi Zinzani

Esame Finale 2010

INDICE

Introduzione	pag 3
Materiali e Metodi	pag 10
Risultati	pag 15
Discussione	pag 20
Figure e Tabelle	pag 26
Bibliografia	pag 47

1. INTRODUZIONE

I linfomi non Hodgkin T rappresentano ancora oggi una sfida per l'ematologo e l'oncologo. Per molti anni questa categoria di neoplasie ematologiche è stata trascurata e le conoscenze anatomo-patologiche e biologiche a riguardo sono estremamente limitate. Nel nostro istituto si è cercato di migliorare e approfondire la ricerca nell'ambito di queste patologie ancora orfane. Questa tesi vuole illustrare, dopo una rapida introduzione biologica e anatomo-patologica le terapie che si sono succedute negli anni, gli innovativi presidi terapeutici a nostra disposizione e vuole proporre, sulla base di un studio preclinico sviluppato in modelli *in vitro* ed *in vivo* di linfoma non hodgkin T a cellule periferiche, una nuova terapia di combinazione da esplorare in futuri studi clinici di fase 1-2. Tutti i dati presentati in questa tesi sono frutto del lavoro sperimentale svolto presso Columbia University nel laboratorio di Owen O'Connor.

I Linfomi non Hodgkin di derivazione dai linfociti T/NK periferici (PTCL) rappresentano un raro gruppo di malattie eterogeneo e spesso difficili da trattare. I PTCL globalmente incidono per circa il 10-15% di tutti i tumori linfoidei in occidente, con solo 6.000-9.000 casi negli Stati Uniti^{1,2}. E' infatti presente una differenza geografica significativa nell'incidenza di tali patologie; nelle isole caraibiche e nel Giappone in particolare l'incidenza dei linfomi T è addirittura superiore a quella dei linfomi B^{3,4,5}. E' stata rilevata una correlazione in tali aree geografiche con la infezione da virus HTLV1, ma tale associazione non è sufficiente da sola a giustificare completamente il fenomeno. Entro la categoria dei PTCL è possibile distinguere differenti sottotipi i quali possono essere identificati in base alle loro caratteristiche cliniche, immunofenotipiche istologiche e biologiche. Secondo la REAL/WHO classification^{6,7} è possibile separare i PTCL in forme cosiddette specifiche e in forme non altrimenti specificabili (PTCL NAS); in queste ultime in effetti, che peraltro rappresentano le forme più comuni, non è stata possibile, a tutt'oggi, una suddivisione sufficientemente riproducibile, in ulteriori categorie⁸. Le forme specifiche e più rare tra cui la leucemia prolinfocitica T, leucemia a cellule ampie e granulati, leucemia NK aggressiva, linfoma/leucemia T dell'adulto, micosi fungoide/sindrome di Sezary, linfoma a grandi cellule anaplastico sistemico e

primitivo cutaneo, linfoma T/NK nasale/simil nasale, linfoma T associato ad enteropatia, linfoma T epatosplenico, linfoma T sottocutaneo simil panniculitico, linfoma T angioimmunoblastico sono invece spesso caratteristiche per presentazione clinica (lesioni facciali o nasali necrotiche nel “nasal type” o ipercalcemia e lesioni cutanee nel linfoma/leucemia T dell’adulto)⁹, immunofenotipo (CD30+ nel linfoma a grandi cellule anaplastico) o alterazioni genetiche tipiche (t 2;5 nel linfoma a grandi cellule anaplastico)^{10, 11, 12, 13, 14}. Generalmente le forme non altrimenti specificabili (NAS) di PTCL presentano un immunofenotipo variabile ed eterogeneo ma nella maggior parte dei casi uno o più antigeni pan T sono espressi (CD7,CD2,CD5,CD3), inoltre in circa il 65% dei casi c’è una positività per il CD4 mentre il CD8 è presente in un 15%, con un 10% di casi rispettivamente di tumori con doppia positività o doppia negatività per CD4 e CD8 e nella maggior parte dei casi sono espressi markers di attivazione come HLA DR, CD25 o il recettore della transferrina. L’eterogeneità genetica è simile, nei PTCL NAS, a quella immunofenotipica, vari cromosomi sono infatti interessati (cr 1;cr 6;cr 2;cr 11;cr 14) con aberrazioni numeriche o strutturali non caratteristiche e il riarrangiamento monoclonale del gene del TCR γ (T-cell receptor gamma) è quasi sempre reperibile¹⁵. Nel nostro istituto, il gruppo del Professor Stefano Pileri è stato in grado di raggiungere risultati di rilievo nell’ambito dei linfomi a cellule T periferiche (LCTP), ampliando notevolmente lo stato delle conoscenze bio-molecolari ed aprendo nuove prospettive terapeutiche in un settore di patologia neoplastica ritenuto incurabile. L’attività di ricerca ha infatti permesso di:

a) caratterizzare dal punto di vista fenotipico un’ampia casistica di LCTP identificando aberrazioni ricorrenti e proponendo un nuovo score prognostico che racchiude sia elementi clinici sia elementi patobiologici¹⁶; b) caratterizzare dal punto di vista molecolare LCTP/NAS e cellule T normali mediante tecniche di *gene expression profiling*; questo studio ha permesso di identificare la possibile controparte normale del tumore e di delucidare alcuni aspetti della biologia di questi linfomi fino ad ora sconosciuti, come i possibili determinanti della farmacoresistenza o dell’invasività tissutale e le alterazioni del ciclo cellulare; inoltre, il riconoscimento di nuovi possibili bersagli terapeutici ha condotto alla proposta di studi clinici pilota di fase II¹⁷; c) definire l’espressione della molecola CD52 nei LCTP. E’ stato così possibile stabilire che tale antigene è frequentemente down-regolato (sia a livello trascrizionale sia,

conseguentemente, in termini di proteina) e che una terapia specifica con anticorpi monoclonali anti-CD52 dovrebbe probabilmente essere riservata al subset di pazienti CD52⁺¹⁸; d) caratterizzare dal punto di vista molecolare LCTP di tipo angioimmunoblastico (AILT) mediante tecniche di *gene expression profiling*; questo studio ha permesso di riconoscere i linfociti TFH quale possibile controparte cellulare della neoplasia e di identificare molecole espresse in maniera peculiare dagli AILT, quali il VEGF ed il VEGFR2 dando luogo all'ipotesi che un loop autocrino a questo livello sostenga la crescita cellulare e che l'inibizione dello stesso possa rappresentare un valido bersaglio terapeutico¹⁹; e) caratterizzare il ruolo della molecola PTEN nella deregolazione della proliferazione in LCTP/NAS²⁰; f) caratterizzare dal punto di vista molecolare linfomi tipo LGCA mediante tecniche di gene expression profiling; questo studio ha permesso di definire un *fingerprint* molecolare dipendente dall'attività della tirosin-chinasi ALK e di STAT3 ed una *signature* molecolare tipica di tutti i LGCA e riconoscere i LGCA ALK- come entità clinico patologica indipendente sia dalle forme ALK+ sia dai LCTP/NAS, identificando, infine, una serie di marcatori che potranno essere utili nella diagnostica differenziale tra LGCA ALK- e LCTP/NAS; g) caratterizzare dal punto di vista molecolare LCTP/NAS mediante tecniche di genotipizzazione ad alta risoluzione con SNPs array; questo studio ha permesso di identificare lesioni genomiche ricorrenti fino ad ora misconosciute e definire un subset di casi caratterizzati dalla presenza di alterazioni strutturali a carico del gene *REL* con conseguente aberrante attivazione del pathway di NFκB.

Dal punto di vista clinico, con la sola eccezione di pochi sottotipi (micosi fungoide, disordine linfoproliferativo CD30+ della cute e la leucemia/linfoma a linfociti ampi e granulati) i PTCL presentano spesso un comportamento aggressivo^{21, 22, 23, 24, 25} con sintomi sistemici, (febbre, calo ponderale, sudorazioni) linfadenopatie e/o localizzazioni extranodali (infiltrazione midollare, splenica, epatica e cutanea). Tali pazienti, con l'eccezione fatta per quelli affetti da forme primitivamente cutanee e da quelli affetti da linfoma a grandi cellule anaplastiche ALK positivo, risultano secondo la maggior parte degli autori, avere una prognosi significativamente peggiore rispetto ai quelli con linfoma B aggressivo (sopravvivenza a 5 anni che va dal 15 al 30% per i PTCL rispetto ad un 50-70% per pazienti affetti da linfoma B a grandi cellule diffuso). Infatti, pur appartenendo alla stessa classe di rischio secondo l'IPI

score²⁶, il fenotipo T sembra rappresentare un fattore prognostico negativo indipendente anche considerando trattamenti come la terapia ad alte dosi ed il trapianto allogenico^{27, 28, 29}. Negli ultimi anni, nuovi indicatori prognostici si sono aggiunti all'IPI score che tuttavia rimane un ottimo indicatore di sopravvivenza tranne che in alcuni casi ed istologie specifiche. Infatti ad esempio l'IPI non è utile in quei sottotipi che primariamente esordiscono come alto rischio, in particolare nel linfoma angioimmunoblastico (che da solo rappresenta il 30% dei linfomi T) appare di limitata utilità rispetto ad altri parametri che possono essere l'anemia o il sesso maschile³⁰. Il gruppo italiano di Gallamini ha proposto il PIT (prognostic index for T-cell lymphoma) capace di discriminare pazienti con un'OS (overall survival) a 5 anni che va dal 18 % (high risk) al 62 % (low risk) e che tuttavia comprende 3 dei parametri dell'IPI a cui viene aggiunta l'importanza del coinvolgimento midollare³¹.

Globalmente possiamo dire che regimi chemioterapici CHOP-based non hanno modificato la storia naturale di queste malattie che continuano a presentare una ORR (overall response rate) compresa tra il 30% ed il 60% con una OS a 5 anni approssivamente del 15-20%. Sforzi mirati a modificare la chemioterapia standard con regimi intensificati^{32, 33} non hanno portato ad alcun beneficio significativo (56% contro 62% di risposte rispettivamente). Considerando quindi i risultati deludenti ottenuti dalla terapia convenzionale per i pazienti con PTCL confrontati con i pazienti affetti da linfoma non hodgkin B, risulta evidente come l'identificazione di nuovi farmaci attivi nel subset dei PTCL sia profondamente necessario.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati un ampio numero di farmaci con attività in monochemioterapia nei PTCL e tra questi possiamo considerare gemcitabina^{34, 35, 36, 37}, alemtuzumab^{38, 39}, e la nuova classe degli inibitori dell'istone deacetilasi⁴⁰ ed in particolare la romidepsina.

Più recentemente, pralatrexate, un nuovo antifolato con una più elevata capacità di trasporto e ritenzione intracellulare è diventato il primo farmaco approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento dei PTCL refrattari o ricaduti alla terapia. I risultati dello studio registrativo PROPEL sulla base dell'analisi di 109 pazienti valutabili ha dimostrato che pralatrexate in monochemioterapia e' in grado di produrre il 29% di risposte globali in pazienti con malattia pesantemente pretrattata⁴¹.

I pazienti trattati nello studio PROPEL avevano infatti fallito una media di 3 regimi chemioterapici con un numero di trattamenti sistemici eseguiti precedentemente compreso tra 1 e 12. Un'analisi eseguita per sottogruppi ha dimostrato come l'attività di pralatrexate sia indipendente dal numero di regimi chemioterapici precedenti, età, trapianto autologo precedente o sottotipo istologico di PTCL.

Pralatrexate appartiene alla classe degli analoghi dei folati conosciuti come deazaaminopterine, che hanno dimostrato marcata superiorità in termini di attività antitumorale in confronto con metotrexate in modelli murini SCID-Beige di linfoma^{42, 43}.

In particolare, pralatrexate è stato disegnato per avere maggiore affinità per il recettore dei folati ridotti (RFC-1) e la folil-poliglutamil-sintasi (FPGS). Queste caratteristiche del farmaco determinano un miglioramento nel suo accumulo e ritenzione intracellulare nelle cellule tumorali.

RFC-1 è un'oncofetoproteina espressa principalmente sulle cellule fetali e sulle cellule tumorali ed è il principale trasportatore dei folati naturali e degli antifolati all'interno delle cellule. La K_M , costante di Michaelis Mentis rappresenta la concentrazione di substrato necessaria affinché la reazione enzimatica e/o di trasporto abbia velocità pari a metà della velocità massima. La K_m è una grandezza caratteristica di ciascun enzima. Essa è un termine che indica quantitativamente l'affinità tra un enzima e il suo substrato: più basso è il valore di K_m e più bassa sarà la concentrazione di substrato che permette di raggiungere un valore di velocità di reazione pari alla metà della velocità massima, il che indica una alta affinità dell'enzima per il substrato. Nel caso specifico di pralatrexate e metotrexate in rapporto a RFC-1, la K_m è rispettivamente uguale a 0.3 e 0.48 $\mu\text{mol/L}$ mentre il valore del rapporto tra V_{max}/K_m (indice del trasporto intracellulare normalizzato per l'affinità di legame) è rispettivamente 12.6 e 0.9. Questi dati suggeriscono che il flusso di pralatrexate all'interno delle cellule sia circa 14 volte superiore a quello di metotrexate. Inoltre la K_m per FPGS per pralatrexate e metotrexate è rispettivamente uguale a 5.9 e 32.3, mentre la V_{max}/K_m per il processo di poliglutamilazione è rispettivamente di 23.2 e 2.2. Nell'insieme questi dati dimostrano delle migliori caratteristiche farmacocinetiche per pralatrexate rispetto a metotrexate.

Un recente studio preclinico del nostro gruppo ha stabilito come pralatrexate sinergizzi con l'attività di altri farmaci attivi nel trattamento dei PTCLs come la gemcitabina⁴⁴. I dati preclinici sono stati confermati in uno studio clinico di fase 1 che valuta l'attività di pralatrexate somministrato in combinazione con gemcitabina con diverse schedule di trattamento in pazienti con linfoma non hodgkin. Le risposte sono state evidenti in diverse tipologie di pazienti inclusi 4 pazienti con linfoma di hodgkin e 2 pazienti con linfoma non hodgkin B diffuso a grandi cellule (DLBCL).

Inoltre, pralatrexate ha dimostrato di essere attivo anche in pazienti affetti da linfoma non hodgkin T cutaneo con malattia resistente alla terapia. Pralatrexate è stato in grado di produrre in questo subset di pazienti un'overall response rate (ORR) pari al 55% in pazienti che avevano precedentemente ricevuto una media di 6 trattamenti chemioterapici (numero di trattamenti compreso tra 1 e 25)⁴⁵. Nell'insieme tutti questi dati suggeriscono che pralatrexate presenta una spiccata attività in differenti tipologie di PTCLs e può probabilmente essere combinato con altri farmaci che presentano attività in monochemioterapia in queste stesse patologie.

Un recente studio del nostro gruppo di bologna ha dimostrato come l'inibitore del proteosoma bortezomib mostri attività in pazienti affetti da PTCLs e CTCL, ed ha suggerito la possibilità di valutare il profilo di efficacia e tossicità di bortezomib in combinazione con pralatrexate in modelli preclinici di PTCL con l'intento di sviluppare nuove strategie terapeutiche per questi pazienti che non siano più correlate con la chemioterapia convenzionale tipo CHOP. Nello studio menzionato precedentemente, Zinzani e colleghi⁴⁶ mostrano come bortezomib produca il 67% di ORR in pazienti con PTCL e CTCL ricaduti e refrattari alla terapia. Nella risposta globale era anche incluso un 17% di pazienti che aveva raggiunto la remissione completa.

In conclusione sulla base della pessima prognosi dei pazienti affetti da linfoma non hodgkin T e dei deludenti risultati portati dalla chemioterapia standard, vi è una forte spinta nel tentativo di sviluppare nuovi farmaci e combinazioni farmacologiche attive nell'ambito del trattamento dei linfomi non hodgkin T.

Sulla base dei primi dati di attività ho quindi deciso di valutare l'attività preclinica della combinazione di pralatrexate e bortezomib in modelli di linfoma non hodgkin T. Al momento attuale non sono disponibili modelli facilmente

fruibili di PTCL e sulla base di questo le linee cellulari utilizzate in questo studio sono linee di leucemia acuta linfoblastica T e micosi fungoide trasformata.

MATERIALI E METODI

Linee cellulari

Le linee cellulari utilizzate sono linee di linfoma non Hodgkin T cutaneo trasformate e linee di leucemia acuta linfoblastica T (LAL-T). Le linee di linfoma non Hodgkin cutaneo trasformate utilizzate sono: HH⁴⁷ e H9⁴⁸ ottenute dalla American Type Culture Collection (Manassas, VA). Le linee di LAL-T utilizzate sono le seguenti: linee sensibili agli inibitori delle gamma-secretasi: KOKT-K1⁴⁹, DND-41, HPB-ALL⁵⁰; e linee resistenti agli inibitori delle gamma secretasi: P12, PF-382, CEM⁵¹. Tutte le linee cellulari di leucemia acuta linfoblastica sono state ottenute per gentile concessione del laboratorio del Dott. Adolfo Ferrando a Columbia University. Tutte le linee cellulari sono state cresciute in RPMI Media (ATCC) con l'aggiunta del 10 % di FBS. Le linee cellulari sono state mantenute in incubazione a 37°C in incubatori con il 5 % di CO₂ e nuovo media e' stato aggiunto a giorni alterni. Le cellule sono state mantenute in coltura alla concentrazione ideale di 0.5 x 10⁶ cellule/mL e trattate come descritto in precedenti studi pubblicati⁵². Le cellule mononucleate del sangue periferico da donatori volontari sono state acquistate da Allcells (Emeryville, CA).

Materiali

Tutti i reagenti per i western blot sono stati ottenuti da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA) e Pierce Biotechnology, Inc (Rockford, IL); il dimetil solfossido (DMSO) è stato ottenuto da Sigma (St. Louis, MO). I farmaci sono stati ottenuti come segue: pralatrexate da Allos Therapeutics (Allos, CO); bortezomib da Millennium (Cambridge, MA).

Esperimenti di citotossicità

In tutti gli esperimenti in vitro le cellule sono state contate e risospese alla concentrazione approssimativa di 3 x 10⁵ cellule/mL in piastre a 96 pozzetti (Becton Dickinson Labware Franklin Lakes, NJ) e incubate a 37°C in un incubatore con il 5 % di anidride carbonica fino ad un massimo di 72 ore. Pralatrexate è stato aggiunto in concentrazioni crescenti da 100 pM fino a 200

uM mentre bortezomib è stato utilizzato in concentrazioni a partire da 1 nM fino a 100 nM per determinare le curve inibenti la crescita in coltura di tutte le linee cellulari. Negli esperimenti di combinazione pralatrexate è stato aggiunto in coltura in concentrazioni tra 2 nM e 5.5 nM, e bortezomib da 3 nM a 6 nM. Le concentrazioni selezionate rappresentano approssimativamente le IC₂₅₋₅₀ (le concentrazioni inibenti in coltura la crescita del 25-50% delle cellule). Successivamente al periodo di incubazione a 37°C in incubatori con il 5 % di anidride carbonica, 100 uL da ogni pozzetto sono stati trasferiti in una piastra a 96 pozzetti con il fondo scuro; il reagente cell-titer-glow (Promega Corporation, Madison, WI) è stato aggiunto in rapporto 1:1 con la sospensione cellulare. Il contenuto delle piastre è stato fatto mischiare su uno shaker orbitale per 2 minuti per permettere la lisi cellulare. Le piastre sono state quindi incubate a temperatura ambiente per 10 minuti prima di misurare il segnale luminoso tramite il luminometro -Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT). Ogni esperimento è stato eseguito almeno due volte con campioni in almeno triplicato.

Utilizzo del citofluorimetro per valutare l'apoptosi

H9, HH, P12 e PF382 sono state risospese alla concentrazione di 3×10^5 cellule/mL e incubate con pralatrexate in concentrazioni comprese tra 2 nM e 5.5 nM e bortezomib tra 2 nM e 6 nM singolarmente o in combinazione per 48 e 72 ore. Un minimo di 1×10^5 eventi sono stati acquisiti per ogni campione. Per quantificare l'apoptosi sono stati utilizzati due coloranti Yo-Pro 1 e Propidium Iodide (PI) (Vybrant apoptosis assay Kit #4, Invitrogen, Carlsbad, CA). Dopo il periodo di incubazione con i due farmaci le cellule sono state lavate in PBS freddo, centrifugate e risospese in PBS. 1 uL di Yo-Pro 1 e 1 uL di PI sono stati aggiunti per ogni mL di sospensione. Il segnale fluorescente è stato acquisito tramite l'utilizzo di FACSCalibur attraverso i canali FL1 e FL2. Le cellule positive per Yo-Pro 1 e negative per PI sono state considerate in fase di apoptosi precoce, le cellule positive per entrambe sono state considerate in fase apoptotica tardiva mentre le cellule positive solo per PI sono state considerate morte. Tutti i dati ottenuti da FACSCalibur sono stati analizzati utilizzando il programma di analisi Flowjo (Ashland, OR).

Utilizzo del citofluorimetro per valutare lo stato di attivazione delle caspasi

Le cellule H9 sono state risospese alla concentrazione di 1×10^6 cellule/mL e incubate con pralatrexate e bortezomib in concentrazioni rispettivamente di 4 nM e 6 nM singolarmente e in combinazione. Dopo incubazione di 24 ore, sono state prelevate aliquote di 300 μ L da ogni campione e trasferite in provette eppendorf. Un μ L di FITC-IETD-FMK (CaspGLOW Fluorescein Active Caspase-8, Biovision) e un μ L di Red-LEDH-FMK (CaspGLOW Red Active Caspase-9, Biovision) sono stati aggiunti ad ogni provetta. In ogni esperimento sono anche stati valutati un controllo negativo contenente l'inibitore dell'attivazione delle caspasi Z-VAD-FMK alla concentrazione di 1 μ L/mL e un controllo positivo con cellule trattate con etoposide 100 nM. Dopo incubazione di 50 minuti - 1 ora in incubatori a 37°C e 5 % di anidride carbonica i campioni sono stati centrifugati 2 volte a 3000 rpm per 5 minuti e risospesi nella soluzione di lavaggio prima dell'acquisizione al citofluorimetro. Tutti i dati ottenuti da FACSCalibur sono stati analizzati utilizzando il programma di analisi Flowjo (Ashland, OR). Ogni esperimento è stato eseguito almeno in duplicato e ripetuto almeno due volte.

Analisi tramite Western Blot

Le cellule sono state incubate alle stesse concentrazioni utilizzate negli esperimenti di citotossicità e apoptosi in condizioni di crescita standard per un massimo di 24 ore. Le proteine estratte dai lisati cellulari sono state separate attraverso elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di 4-20 % SDS e trasferite successivamente su membrane di nitrocellulosa. Il bloccaggio delle membrane è stato eseguito in buffer (0.05% Tween 20 con 5 % di latte) e successivamente è stato aggiunto l'anticorpo primario che è stato lasciato in incubazione tutta la notte a 4°C. Gli anticorpi primari sono stati successivamente ibridati con il corrispettivo secondario coniugato alla perossidasi. Le lastre sono state sviluppate utilizzando "SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate detection reagents". Le membrane sono state esposte per intervalli di tempo variabili. Le immagini sono state ottenute utilizzando il densitometro GS-800 (Bio-Rad), ed il rapporto di intensità dei segnali è stato normalizzato rispetto all'intensità del segnale della α -tubulina.

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali: p27, p100/p52, istone H3 acetilato (HH3) ottenuti da Cell Signaling Technology, Danvers, MA; NOXA è stato comprato da Imgenex Corp., San Diego, CA; RFC-1 (il recettore per i folati ridotti di tipo 1) (l'anticorpo SLC19A1) è stato acquistato da Abcam; ed infine l' α -tubulina da Sigma, Saint Louis, MO).

Esperimento animale con modelli murini di topi SCID-Beige

Gli esperimenti in vivo sono stati eseguiti nel modo seguente: i topi SCID-Beige di età compresa tra le 5 e le 7 settimane sono stati acquistati da Charles River Laboratories, Wilmington, MA. Per ogni topo, è stata eseguita una iniezione sottocutanea in zona dorsale contenente 20×10^6 cellule. Quando il volume tumorale si è approssimativamente avvicinato a 50 mm^3 , i topi sono stati suddivisi in diverse coorti di trattamento costituite da 10 topi ciascuna. I tumori sono stati valutati misurando i diametri perpendicolari (lunghezza e larghezza) con un calibro standard. Il volume tumorale è stato calcolato utilizzando la formula $\frac{4}{3} \pi r^3$, dove $r = (\text{lunghezza} + \text{larghezza}) / 4$. Eventuali perdite di peso ed il volume tumorale sono stati valutati almeno due volte a settimana nei topi che hanno sviluppato tumore. Gli animali sono stati sacrificati quando uno dei diametri principali $\geq 2 \text{ cm}$ e/o con perdite di peso $> 20\%$ del peso corporeo in accordo con le linee guida istituzionali. La risposta completa (RC) è stata definita come assenza di tumore palpabile. Sia pralatrexate che bortezomib sono stati somministrati per via intra peritoneale. Pralatrexate è stato somministrato alla dose di 15 mg/kg (dose equivalente ad 1/4 della dose massima tollerata) ai giorni 1,4,8,11 ; bortezomib è stato somministrato alla dose di 0.5 mg/kg ai giorni 1,4,8,11. Nella coorte di topi trattati con la combinazione i farmaci sono stati somministrati simultaneamente. La coorte di controllo è stata trattata solo con la soluzione salina.

Analisi statistica

Per i differenti gruppi di trattamento negli esperimenti in vitro, sono stati eseguiti test di permutazione per determinare se un gruppo di trattamento fosse superiore agli altri. L'analisi ha comportato la comparazione di gruppi basati sulle ripetizioni, tipicamente tre, utilizzando l'analisi di varianza dopo trasformazione normalizzata. Considerando che multiple ipotesi sono state testate simultaneamente, i *p value* sono stati aggiustati utilizzando il metodo di Dunnett⁵³. Per tutte le linee cellulari le IC₅₀^{54,55} (le concentrazioni inibenti in coltura il 50 % della crescita cellulare) e le interazioni farmaco-farmaco in termini di sinergia, additività e antagonismo sono state calcolate utilizzando come programma Calcsyn (Biosoft, Cambridge, United Kingdom)⁵⁶ negli esperimenti di citotossicità. Un indice di combinazione (CI) < 1 definisce la presenza di sinergismo, CI > 1 definisce la presenza di antagonismo e CI = 1 dimostra la presenza di interazione additiva. Per quanto riguarda i dati di apoptosi le interazioni farmaco-farmaco invece sono state calcolate utilizzando l'analisi dell'indice di rischio relativo (RRR, GraphPad, <http://www.graphpad.com>). Nuovamente un indice di rischio relativo (RRR) < 1 definisce la presenza di sinergismo, RRR > 1 definisce la presenza di antagonismo e RRR=1 dimostra la presenza di additività. Per l'esperimento animale, il volume tumorale e l'area sotto la curva (AUCs) sono state trasformate in scala logaritmica e valutate utilizzando l'analisi di varianza in una valutazione a 4 vie e utilizzando il Wilcoxon test per coppie di comparazione. La deviazione media assoluta è stata utilizzata come misura di variabilità.

2. RISULTATI

Pralatrexate interagisce sinergicamente con bortezomib in linee cellulari di linfoma non Hodgkin T e leucemia acuta linfoblastica T.

Le IC₅₀ per pralatrexate utilizzato da solo dopo 48 e 72 ore di incubazione sono generalmente nell'ordine delle concentrazioni nanomolari. Specificatamente, le IC₅₀ dopo 48 e 72 ore di incubazione nelle diverse linee cellulari studiate sono le seguenti: H9, 1.1 nM e 2.5 nM; P12, 1.7 nM e 2.4 nM; CEM, 3.2 nM e 4.2 nM; PF-382, 5.5 nM e 2.7nM; KOKPT-K1, 1 nM e 1.7 nM; DND-41, 97.4nM e 1.2nM; HPB-ALL, 247.8 nM e 0.77nM (tabella 1, figura 1 e 2). HH e' stata valutata come resistente a pralatrexate dopo 48 ore di incubazione, mentre dopo 72 ore l'IC₅₀ e' stata valutata a 2.8 nM. Due linee di linfoma non hodgkin cutaneo T e due linee di leucemia acuta linfoblastica T sono state selezionate per gli esperimenti di combinazione con bortezomib. Generalmente le IC₅₀s per bortezomib sono risultate nello stesso di range di quelle per pralatrexate. In particolare, le IC₅₀s per bortezomib dopo 48 ore di incubazione sono le seguenti: H9, 6nM; HH, 3.9 nM (dopo 72 ore di incubazione); P12, 4.7 nM; PF-382, 2.2 nM. Negli esperimenti di citotossicità, le combinazioni di pralatrexate e bortezomib hanno mostrato sinergismo in tutte le linee cellulari studiate nel modo seguente: in H9: CI ≤ 0.38; P12: CI ≤ 0.513; PF382: CI ≤ 0.352; HH: CI ≤ 0.4 (figura 3 e 4 e tabella 2). Questi dati supportano l'ipotesi che sia presente sinergia tra i due farmaci *in vitro*.

Pralatrexate e bortezomib aumentano l'apoptosi in linee cellulari di linfoma non Hodgkin T cutaneo e leucemia acuta linfoblastica T

Il Trattamento con la combinazione di pralatrexate e bortezomib dopo 48 ore di incubazione ha mostrato spiccata attività in termini di induzione dell'apoptosi nelle linee cellulari di H9, P12, PF382 e HH. In dettaglio, il trattamento di H9, linea cellulare di linfoma non hodgkin T cutaneo, con pralatrexate alla dose di 5 nM ha indotto l'apoptosi nel 28.6 % delle cellule in coltura. La stessa linea cellulare trattata con pralatrexate alla dose di 3 nM e 4 nM ha determinato, rispettivamente, la presenza del 46 % e 58 % di cellule apoptotiche in coltura.

Quando le stesse cellule sono state trattate con la combinazione di pralatrexate (3 nM e 4 nM) e bortezomib (5 nM) più del 70% delle cellule in coltura sono state valutate come apoptotiche ed il RRR calcolato per la combinazione è risultato \leq a 0.8. Sono state poi valutate diverse concentrazioni di pralatrexate e bortezomib utilizzati da soli o in combinazione. Il 53 % delle cellule è stato valutato come apoptotico quando le cellule sono state trattate con bortezomib 6 nM mentre il 46% e 58% rispettivamente delle cellule sono state valutate come apoptotiche quando trattate con pralatrexate 3 nM e 4 nM. Il trattamento di H9 con 6 nM di bortezomib e la più alta concentrazione di pralatrexate 4 nM ha prodotto quasi il 90 % di apoptosi in coltura (figura 5). Inoltre, il RRR dell'ultima combinazione è risultato inferiore a 0.6. Tutte le combinazioni studiate sono risultate statisticamente superiori ai controlli e ai farmaci utilizzati singolarmente (tabella 3). Queste osservazioni sono state riproducibili su tutto il pannello di linee cellulari T studiate. Infatti, quando la linea cellulare P12 è stata trattata con bortezomib alla dose di 5 nM, o con pralatrexate a 2 nM e 3 nM, il 57 %, 25% e 49% rispettivamente di cellule in coltura sono risultate apoptotiche. La combinazione di pralatrexate con bortezomib ha invece indotto il 75 % e 87 % di apoptosi, con maggiore apoptosi alle più alte concentrazioni di pralatrexate (figura 7 e figura 8). Il RRR calcolato per le combinazioni è \leq a 0.8 e \leq a 0.7 rispettivamente e all'analisi statistica ha nuovamente dimostrato superiorità per la combinazione contro tutti gli altri gruppi (p value \leq 0.0001) (tabella 4). Anche in una delle linee cellulari più resistenti, HH, la combinazione ha dimostrato marcata superiorità rispetto al trattamento con singoli farmaci. In particolare, la combinazione di pralatrexate (3nM) e bortezomib (2nM) dopo 72 ore di incubazione ha indotto apoptosi nel 74.3 % delle cellule contro il 44.8 % (pralatrexate) e il 29.5 % (bortezomib) delle cellule trattate con i singoli farmaci (figura 6). Nuovamente il RRR ha confermato la presenza di interazione sinergistica tra pralatrexate e bortezomib (RRR \leq 0.66). Le tabella 3 e 4 mostrano i dati dopo l'analisi per il RRR. Questi dati supportano l'osservazione già fatta negli esperimenti di citotossicità e confermano la presenza di sinergia tra pralatrexate e bortezomib nel pannello di linee cellulari T studiate.

Pralatrexate potenzia l'attività di bortezomib in termini di attivazione della caspasi 8 e caspasi 9

Abbiamo esplorato l'attività di pralatrexate e bortezomib sull'attivazione delle caspasi 8 e 9 con l'intento di valutare l'effetto dei due farmaci sul pathway estrinseco e intrinseco della cascata apoptotica nella linea cellulare H9. L'incubazione di H9 con pralatrexate 4 nM e bortezomib 6 nM singolarmente e in combinazione ha determinato dopo 24 ore l'attivazione del 14 %, 10 %, e 37% delle caspasi 8 rispettivamente. In parallelo, l'attivazione di caspasi 9 è risultata essere presente nel 13 %, 5 %, e 39 % delle cellule H9 dopo 24 ore di incubazione (figura 9 e tabella 5). Questi dati sono nuovamente in linea con quanto dimostrato negli esperimenti di citotossicità e apoptosi descritti precedentemente e confermano che l'attivazione di caspasi è indotta in maniera sinergistica dalla combinazione di pralatrexate e bortezomib.

Pralatrexate non aumenta la tossicità di bortezomib su cellule mononucleate del sangue periferico da donatori volontari

Abbiamo valutato l'induzione di apoptosi in cellule mononucleate del sangue periferico di donatori volontari con l'intento di valutare se l'utilizzo della combinazione di pralatrexate e bortezomib fosse più tossica dell'utilizzo dei farmaci singolarmente. Abbiamo quindi valutato l'effetto di bortezomib 3 nM e 5 nM e pralatrexate 2 nM, 3 nM, e 4 nM e tutte le possibili combinazioni. Le dosi di farmaci utilizzate sono le stesse utilizzate negli esperimenti di citotossicità e apoptosi. All'analisi finale tutte le possibili combinazioni esplorate non hanno dimostrato maggiore induzione di apoptosi nelle cellule mononucleate del sangue periferico in confronto con le cellule trattate con i singoli farmaci ($p > 0.8$). Pralatrexate non ha mostrato nessuna significativa tossicità in confronto con le cellule non trattate (figura 10).

Pralatrexate e bortezomib influenzano l'espressione di proteine appartenenti a diversi pathway intracellulari.

Utilizzando la tecnica del western blot abbiamo valutato numerosi anticorpi rivolti verso diverse proteine nell'intento di identificare i pathway intracellulari specificatamente influenzati dall'utilizzo dei singoli farmaci e della combinazione. Il trattamento di H9 e P12 con pralatrexate e bortezomib ha rivelato modificazioni nell'espressione di diverse proteine coinvolte nel controllo

del ciclo cellulare, apoptosi, rimodellamento della cromatina (acetilazione degli istoni) e trasporto cellulare dei farmaci. Utilizzando le stesse concentrazioni di pralatrexate e bortezomib che hanno dimostrato sinergia negli esperimenti *in vitro* abbiamo identificato sostanziali modificazioni nell'espressione di alcune proteine tra cui p27, NOXA, HH3, e RFC-1 nelle cellule H9 trattate con pralatrexate 3 nM, bortezomib 5 nM e la combinazione dopo 16 ore di incubazione. Questi dati, come mostrato nelle figura 11, hanno dimostrato che bortezomib aumenta l'accumulo di p27, NOXA, HH3 acetilato. La stessa osservazione e' stata evidenziata nel gruppo di cellule trattato con la combinazione di bortezomib e pralatrexate. Pralatrexate utilizzato da solo ha mostrato un minimo impatto sull'accumulo di NOXA e HH3 acetilato mentre ha chiaramente aumentato il livello di espressione di p27 così come osservato nel gruppo trattato con solo bortezomib. Pralatrexate da solo sembra inoltre aumentare l'accumulo di RFC-1 in H9. Questa osservazione suggerisce il fatto che l'esposizione a pralatrexate possa aumentare l'accumulo intracellulare del farmaco stesso. La figura 12 mostra come l'espressione di p27, NOXA e HH3 nella linea cellulare di leucemia acuta linfoblastica T, P12, risulta aumentata dopo esposizione a bortezomib 5 nM, pralatrexate 2 nM e 3 nM e le possibili combinazioni. Queste osservazioni sono simili a quanto valutato in H9 con l'eccezione che l'espressione di p27 appare più debolmente influenzata. In conclusione, se da un lato questi farmaci sembrerebbero produrre numerosi effetti su queste linee cellulari sia a livello trascrizionale che traduzionale, la valutazione delle proteine implicate suggerisce un'attività della combinazione principalmente sul controllo del ciclo cellulare e sull'apoptosi.

Pralatrexate incrementa l'attività di bortezomib in modelli murini di topi SCID Beige.

L'efficacia *in vivo* di pralatrexate e bortezomib utilizzati in combinazione e' stata valutata in un modello murino SCID- Beige di linfoma T cutaneo (HH, figura 13). HH e' stata intenzionalmente selezionata in quanto negli esperimenti *in vitro* ha dimostrato essere la linea cellulare più resistente. Dopo 30 giorni dall'inizio dell'esperimento, la coorte di topi trattati con la combinazione di pralatrexate alla dose di 15 mg/kg (dose equivalente ad ¼ della massima dose tollerata) e bortezomib alla dose di 0.5 mg/kg ai giorni 1, 4, 8, 11 e' risultata

essere statisticamente superiore alla coorte di topi trattata con pralatrexate singolarmente ($p = 0.002$), bortezomib singolarmente ($p = 0.001$) e la coorte di controllo ($p = 0.001$) in termini di inibizione della crescita tumorale (tabella 6 e 7). Va sottolineato come remissioni complete sono state osservate solamente nella coorte di topi trattati con la combinazione, dove al giorno 18, 6 di 10 topi presentavano un quadro di remissione completa che è stato mantenuto oltre il giorno 30. Nessuna morte tossica, né calo ponderale superiore al 10% del peso corporeo è stata osservata in nessuna delle coorti di trattamento (tabella 8). Questi dati confermano la superiore efficacia della combinazione così come suggerito dagli esperimenti *in vitro*.

3. DISCUSSIONE

I linfomi non Hodgkin T sono considerati, con poche eccezioni, malattie aggressive con una prognosi pessima. Recentemente l'inibitore del proteosoma bortezomib ha dimostrato una significativa attività pre-clinica ed una attività clinica in differenti tipi di malattie ematologiche. Bortezomib è stato infatti approvato dalla Food and Drug Administration per il trattamento del mieloma multiplo e del linfoma non Hodgkin mantellare ricaduto ed è inoltre stato valutato in uno studio multicentrico di fase due in pazienti con linfoma non Hodgkin T cutaneo e PTCL. Nonostante lo studio clinico abbia incluso solo un piccolo numero di pazienti è stata registrata una ORR del 67%, incluse due remissioni complete, con una durata della risposta compresa tra 7 e 14 mesi. Bortezomib ha inoltre mostrato di avere una attività sinergistica con altri farmaci quali gli inibitori dell'istone deacetilasi (HDACI), farmaci che hanno come bersaglio Bcl-2⁵⁷ ed agenti chemioterapici convenzionali⁵⁸.

D'altra parte pralatrexate ha mostrato una spiccata attività su un ampio insieme di linfomi non Hodgkin B e T dimostrando però particolare attività nei pazienti affetti da linfoma non Hodgkin T⁵⁹. Nonostante il meccanismo d'azione di entrambe questi farmaci sembri essere più probabilmente multifattoriale, i dati preclinici mostrati in questa tesi, in modelli di linfoma non Hodgkin T e leucemia acuta linfoblastica T suggeriscono che l'utilizzo in combinazione dei due appare essere sinergistico.

Gli esperimenti presentati precedentemente supportano le osservazioni precedenti riguardo alla potente attività di pralatrexate in un ampio gruppo di linee cellulari di linfoma non Hodgkin T e leucemia acuta linfoblastica T. Gli esperimenti di citotossicità mostrano come i valori di IC₅₀ siano nell'ordine delle concentrazioni basso-nanomolari sia per le linee di linfoma non Hodgkin T cutaneo (H9 e HH) che per le linee di leucemia acuta linfoblastica T (P12, PF 382, CEM, KOKPT K1, DND 41 e HPB-ALL) per entrambe i farmaci. Abbiamo inoltre confermato come anche nelle linee cellulari T pralatrexate sia marcatamente più potente di metotrexate (tabella 1). Questo studio ha chiaramente dimostrato come l'esposizione di un ampio numero di linee cellulari T a concentrazioni nanomolari dei due farmaci sia stato sufficiente per indurre apoptosi in tutte le linee. In particolare, in tutte le linee cellulari studiate (H9,

HH, P12, PF382) la valutazione dell'interazione farmaco-farmaco basata sul calcolo dell'indice di combinazione (CI) e del rapporto di rischio relativo (RRR) ha dimostrato la presenza di interazione sinergistica tra pralatrexate e bortezomib. Per valutare se i due farmaci avessero una azione principalmente sulla via intrinseca o estrinseca della cascata apoptotica abbiamo eseguito citofluorimetria volta a valutare l'attivazione di caspasi 8 e caspasi 9. Precedenti studi avevano già dimostrato come bortezomib sia in grado di attivare direttamente sia la via intrinseca dell'apoptosi che quella estrinseca⁶⁰. Per la prima volta con questi esperimenti abbiamo mostrato come pralatrexate sia a sua volta in grado di attivare nello stesso modo entrambe le vie intrinseca ed estrinseca della cascata apoptotica. La combinazione di pralatrexate e bortezomib non si è solo dimostrata sinergistica negli esperimenti di citotossicità convenzionale ma anche negli esperimenti di apoptosi volti a valutare il ruolo individuale delle due vie di attivazione dell'apoptosi.

Con l'intento di verificare se la sinergia valutata in termini di attivazione dell'apoptosi nelle linee cellulari studiate influenzasse o meno i linfociti normali, abbiamo esplorato la tossicità della combinazione su cellule mononucleate del sangue periferico da donatori volontari. I dati ottenuti dalla valutazione hanno dimostrato che essenzialmente le stesse concentrazioni di pralatrexate e bortezomib che avevano mostrato sinergia non hanno un effetto tossico aggiuntivo sulle cellule mononucleate del sangue periferico. L'effetto della combinazione non è infatti stato più tossico dei singoli farmaci da soli, e la concentrazione di bortezomib sembra guidare l'entità della tossicità sulle cellule mononucleate del sangue periferico.

Nel modello murino SCID-Beige di CTCL utilizzato, quando i topi sono stati trattati con la combinazione di pralatrexate e bortezomib hanno mostrato un vantaggio statisticamente significativo in termini di inibizione della crescita tumorale dopo il 18° giorno di terapia quando confrontati con i topi trattati con entrambe i farmaci singolarmente. Bortezomib è stato somministrato alla dose di 0.5 mg/kg e pralatrexate alla dose di 15 mg/kg (1/4 della massima dose tollerata) nei giorni 1, 4, 8, 11 per ottimizzare l'attività e ridurre la tossicità⁶¹. Le dosi utilizzate sono state selezionate sulla base di un esperimento animale preliminare volto a valutare il profilo tossico dei farmaci. Lo studio preliminare ha infatti evidenziato che pralatrexate a dosi più elevate (30 mg/kg e 60 mg/kg) in combinazione con bortezomib alla stessa dose (0.5 mg/kg) non è tollerato

dagli animali. Utilizzando invece le dosi di farmaco descritte precedentemente 6 animali su 10 della coorte di topi trattata con la combinazione hanno ottenuto la remissione completa. Nessuna tossicità severa intesa come calo ponderale superiore al 10 % del peso corporeo e morte tossica è stata osservata nella coorte di topi trattati con la combinazione. Abbiamo quindi concluso che la combinazione di pralatrexate e bortezomib è efficace e tollerata in maniera ottimale nel modello murino studiato.

E' già ben descritto che l'inibizione del proteosoma influenza diversi pathways intracellulari tra cui NF- κ B attraverso un'alterata degradazione di I κ B, la regolazione del ciclo cellulare mediante accumulo di p27/p21, la modulazione dei membri della famiglia di bcl-2 con un'iperespressione della componente pro-apoptotica ed infine determina l'accumulo di p53^{62, 63, 64}. In due recenti studi pubblicati dal nostro gruppo, AT-101, una piccola molecola con attività inibitoria su bcl-2, bcl-XL e Mcl-1 ha mostrato potente effetto sinergico quando combinata con alcuni agenti chemioterapici convenzionali quali ciclofosfamide e rituximab e l'inibitore del proteosoma calfizomib in modelli preclinici *in vitro* ed *in vivo* di linfoma mantellare e linfoma non hodgkin diffuso a grandi cellule. In aggiunta, anche ABT-737, un BH3-only mimetic, ha mostrato sinergia con l'inibitore del proteosoma bortezomib. L'effetto sinergico dei due farmaci è stato attribuito sia all'influenza di ABT 737 sul legame tra BAX/BAD con alcune proteine antiapoptotiche tra cui Bcl-2 Bcl-XL, Bcl-w sia ad un aumento di alcune proteine quali NOXA e PUMA mediato da bortezomib. E' quindi verosimile che qualunque sia il meccanismo attraverso il quale pralatrexate è in grado di indurre l'apoptosi la riduzione della soglia oltre la quale le cellule vanno incontro ad apoptosi mediato da bortezomib sensibilizzi le cellule all'effetto dell'antifolato. Considerando la moltitudine di ipotesi postulate riguardanti il meccanismo d'azione dell'inibitore del proteosoma è difficile essere dogmatici volendo definire la prevalenza di un meccanismo d'azione sull'altro.

Se d'altra parte pralatrexate ha mostrato evidente efficacia ed attività nel trattamento di pazienti con linfoma non hodgkin T relativamente resistente alla terapia, il meccanismo biologico alla base della sua provata efficacia in questo specifico subset di malattie rimane tuttora non chiaro. Nello sforzo di elucidare eventuali biomarkers di attività in grado di chiarire il meccanismo alla base della sinergia tra pralatrexate e bortezomib abbiamo eseguito una serie di western blot utilizzando anticorpi rivolti verso proteine implicate nella regolazione del

ciclo cellulare e dell'apoptosi. La maggior parte dei biomarkers analizzati non hanno dimostrato di essere influenzati dalla combinazione dei farmaci mentre quattro di questi hanno invece mostrato di essere positivamente influenzati. I biomarkers influenzati sono i seguenti: p27, HH3, NOXA e RFC-1. Alcuni dati preliminari avevano suggerito che l'esposizione delle cellule a pralatrexate potesse indurre l'aumento dell'espressione del suo carrier RFC-1 potenzialmente andando a determinare un aumento dell'accumulo del farmaco stesso a livello intracellulare. Mentre non ci sono dati che dimostrano che bortezomib sia in grado di aumentare l'espressione di RFC-1, i nostri dati supportano l'ipotesi che pralatrexate a basse dosi induca l'espressione del proprio recettore di membrana attraverso una sorta di meccanismo autocrino. Il trattamento delle cellule con pralatrexate ha portato inoltre all'accumulo di p27, determinando probabilmente l'arresto del ciclo cellulare, mentre il trattamento con bortezomib ha aumentato nuovamente p27 ma anche NOXA e HH3. Nuovamente la combinazione di bortezomib e pralatrexate ha indotto l'accumulo di p27, RFC-1, NOXA e in maniera inattesa di HH3.

L'aumento dell'espressione di NOXA sembra emergere come un potenziale biomarker per valutare l'attività degli inibitori del proteosoma. Il suo marcato accumulo dopo esposizione alla terapia di combinazione potrebbe infatti rendere conto del sinergismo osservato senza però chiarire fino in fondo il meccanismo alla base. NOXA appartiene al gruppo dei "Bcl-2 homology domain 3 (BH3) only proteins" e sembra avere un ruolo cruciale nella regolazione fine dei meccanismi di morte cellulare grazie alla capacità di indirizzare Mcl-1, proteina in grado di favorire la sopravvivenza cellulare, verso la degradazione nel proteosoma⁶⁵. Questo evento sembra essere cruciale nella induzione della morte cellulare nelle cellule di linfoma trattate con bortezomib e con la combinazione di bortezomib e pralatrexate. Pralatrexate da solo, ha inoltre recentemente mostrato di indurre selettivamente l'apoptosi nei microascessi di Pautrier⁶⁶ di un paziente trattato con una singola dose del farmaco affetto da leucemia/linfoma T dell'adulto (HTVL-1 pos). Biopsie della cute del paziente hanno mostrato selettiva attivazione delle caspasi e dell'apoptosi solo nelle cellule neoplastiche e non nei cheratinociti normali. Nonostante il fatto che NOXA non sia stata valutata nelle biopsie del paziente, questa osservazione conferma che pralatrexate sembra selettivamente essere in grado di attivare l'apoptosi tramite l'attivazione delle caspasi nelle cellule neoplastiche.

L'accumulo della forma acetilata dell'istone 3 (HH3) riscontrata dopo trattamento con bortezomib è invece inattesa e sembra attribuire proprietà tipo inibitore dell'istone deacetilasi all'inibitore del proteosoma. Marcucci e colleghi⁶⁷ hanno infatti segnalato che bortezomib sembra avere proprietà tipo agente ipometilante e altri dati hanno dimostrato come gli agenti ipometilanti aumentino anche l'acetilazione degli istoni. Queste osservazioni sembrano suggerire come pralatrexate e bortezomib potrebbero venir combinati in una "multitarget therapy" con gli inibitori dell'istone deacetilasi (HDACI) che hanno a loro volta mostrato una specifica attività nell'ambito del trattamento dei linfomi T.

Un numero sempre crescente di studi sta dimostrando come gli inibitori del proteosoma tipo bortezomib inducano il loro effetto a livello intracellulare tramite NOXA e p27 nelle cellule di linfoma T. Linda e colleghi⁶⁸ hanno mostrato come bortezomib induca l'iperpressione di NOXA sia attraverso un meccanismo trascrizionale che a livello proteico direttamente in maniera indipendente da p53 in cellule T mature (modelli di linfoma non hodgkin cutaneo e leucemia a cellule T) e come successivamente la soppressione dell'azione di NOXA mediata da piccoli interfering RNA sia in grado di salvare le cellule di linfoma dall'apoptosi. Questi dati confermano l'osservazione validata anche dal nostro gruppo nei linfomi mantellari che il legame tempo-dipendente di NOXA a Mcl-1 induce una perdita del potenziale mitocondriale transmembrana che ha come effetto finale l'induzione dell'apoptosi. Nuovamente, questi dati si accoppiano perfettamente con l'osservazione di Heider⁶⁹ e colleghi che hanno mostrato come HDACI e bortezomib determinano una iperpressione di p21 e p27 nelle cellule di linfoma non hodgkin T cutaneo e sono inoltre in grado di indurre sinergicamente l'apoptosi, suggerendo un possibile meccanismo d'azione per questi farmaci.

Se fino ad ora il razionale con il quale sono stati combinati farmaci attivi nel trattamento dei linfomi T si è basato su osservazioni di attività clinica risulta ora evidente come il chiarimento dei meccanismi farmacologici-molecolari di attività sia di fondamentale importanza. E' infatti evidente come la conoscenza del meccanismo molecolare di azione dei farmaci possa suggerire nuove combinazioni laddove non vi sia ancora evidenza di una attività clinica. La convergenza dei dati intorno ad una azione su p21/p27, NOXA e Mcl-1 e unicamente legato a pralatrexate su RFC-1 sembra suggerire l'ipotesi di un utilizzo di queste proteine come biomarkers di attività e possibile risposta. Studi

pre-clinici e studi in fase clinica precoce sono già iniziati con l'intento di valutare e sviluppare nuove terapie che non siano correlate alla chemioterapia convenzionale - CHOP - nell'ambito del trattamento dei linfomi T.

Al momento questi sforzi sono indirizzati verso la migliore conoscenza delle interazioni farmaco:farmaco tra pralatrexate, inibitori dell'istone deacetilasi, inibitori del proteosoma, gemcitabina, forodesina e anti Bcl-2.

Abbiamo inoltre disegnato un studio clinico di fase 1 volto a determinare la dose tossica limitante (DLT) e la dose massima tollerata (MTD) di pralatrexate somministrato in combinazione con l'inibitore del proteosoma e con gli inibitori dell'istone deacetilasi.

Nell'insieme questi dati sia pre-clinici che clinici suggeriscono che nel prossimo futuro sarà possibile sviluppare nuove combinazioni farmacologiche in grado probabilmente di modificare la storia naturale dei pazienti affetti da linfoma non hodgkin T.

4. TABELLE E FIGURE

Tabella 1:

Citotossicità di pralatrexate e metotrexate a confronto in 8 linee cellulari di linfoma non hodgkin T cutaneo trasformato e leucemia acuta linfoblastica T. Tutte le linee cellulari sono stata valutate dopo esposizione ad entrambe i farmaci per 24, 48, e 72 ore di incubazione. Tutte le IC₅₀ sono risultate essere in valori nanomolari.

Linee Cellulari	Sottotipo	Pralatrexate		Metotrexate	
		IC ₅₀ 48h (c.i.)	IC ₅₀ 72h (c.i.)	IC ₅₀ 48h (c.i.)	IC ₅₀ 72h (c.i.)
H9	CTCL	1.13 nM (0.1-8.9)	2.54 nM (0.5-12.9)	4.8 nM (2.5-9)	4.41 nM (2.9-6.7)
HH		N/A	2.8 nM (0.3-29.2)	N/A	18.9nM (0.09-3538)
P12	T-ALL (Resistenti ai GSI)	1.73 nM (1.7-1.74)	2.43 nM (1.6-3.6)	4 nM (3.5-4.7)	16.8 nM (15.4-18.4)
CEM		3.23 nM (1.6-6.5)	4.16 nM (3.8-4.6)	3.4 nM (2.3-5)	16.2 nM (13.1-20)
PF 382		5.47 nM (4.3-6.9)	2.72 nM (1.9-3.9)	21.6 nM (17-27.3)	19 nM (13.3-26.1)
KOPT K1	T-ALL (Resistenti ai GSI)	1 nM (0.8-1.3)	1.69 nM (1.3-2.2)	14.1 nM (13.2-14.5)	10 nM (7.3-13.8)
DND 41		97.37 nM (25.8-368.2)	1.21 nM (1-1.3)	188.3 nM (77-458)	6.9 nM (2.4-19.7)
HPB-ALL		247.78 nM (60.6-1012.9)	0.77 nM (0.5-1.1)	156.7 nM (45.8-536)	11.1nM (2.7-46.6)

Figura 1

Le curve dimostrano graficamente la citotossicità di pralatrexate in due delle linee cellulari di linfoma non hodgkin T cutaneo (H9, HH) studiate dopo esposizione al farmaco per 48 ore.

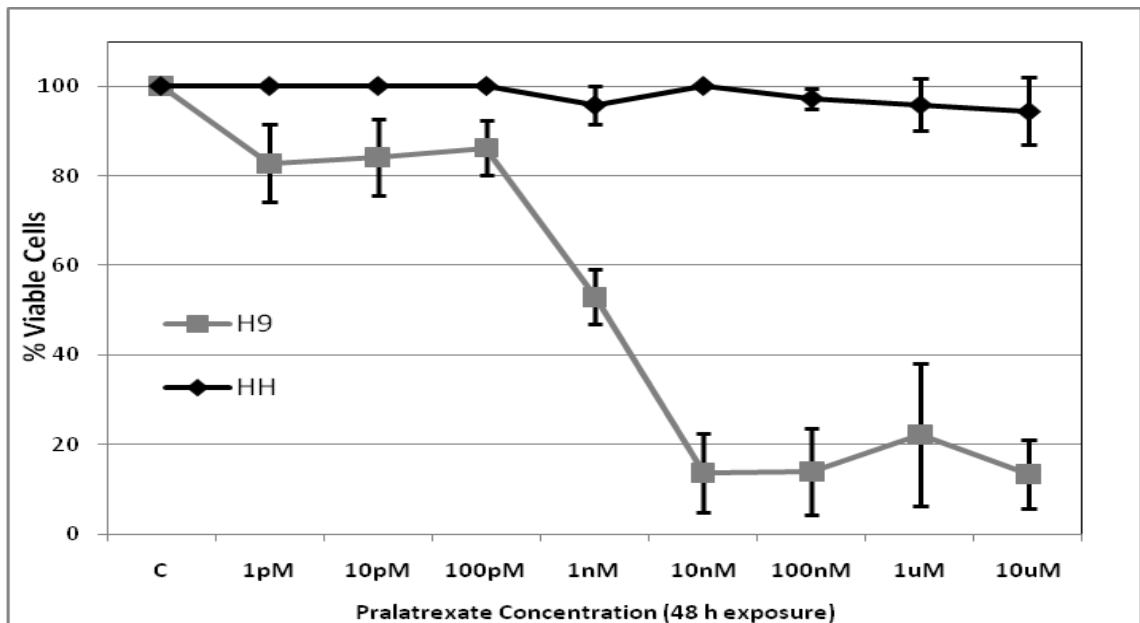


Figura 2

Le curve dimostrano graficamente la citotossicità di pralatrexate in due delle linee cellulari di leucemia acuta linfoblastica T studiate (p12, PF382) dopo esposizione al farmaco per 48 ore.

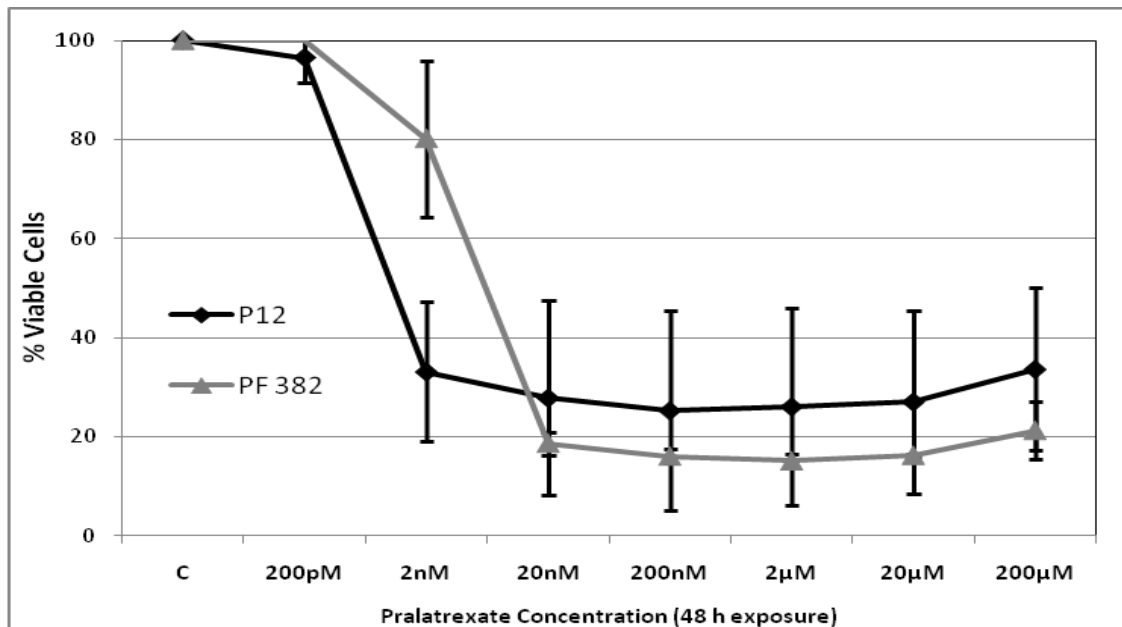


Figura 3

Rappresentazione grafica mediante isobogramma dell'interazione farmaco : farmaco tra pralatrexate e bortezomib nella linea cellulare H9 ed HH dopo 48 ore di incubazione. I punti neri presenti al di sotto della linea rossa indicano la presenza di interazione sinergistica tra i due farmaci.

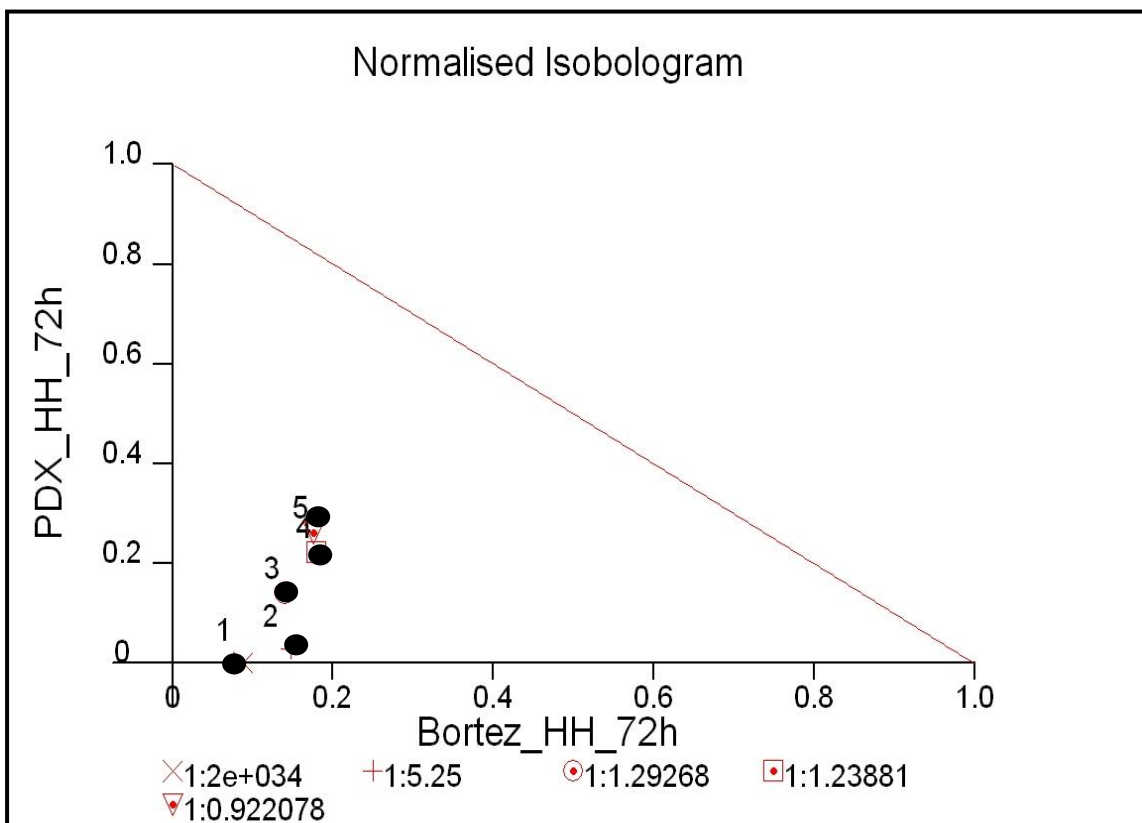
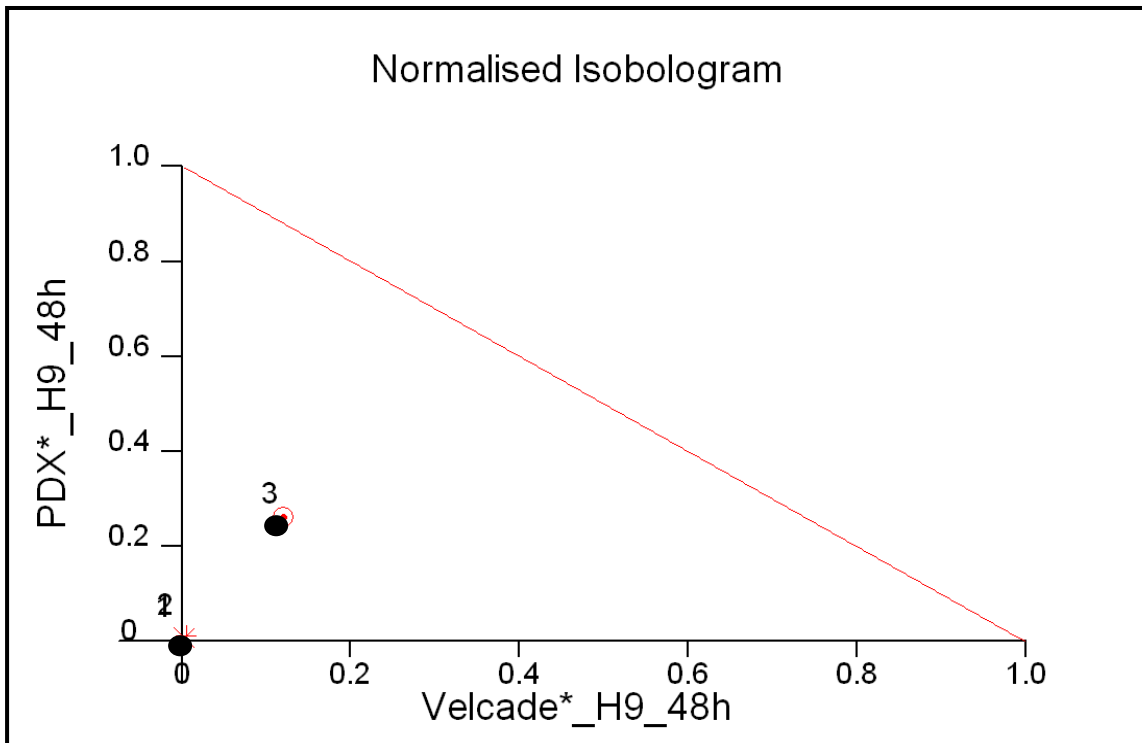


Figura 4

Rappresentazione grafica mediante isobogramma dell'interazione farmaco : farmaco tra pralatrexate e bortezomib nella linea cellulare P12 ed PF382 dopo 48 ore di incubazione. I punti neri presenti al di sotto della linea rossa indicano la presenza di interazione sinergistica tra i due farmaci.

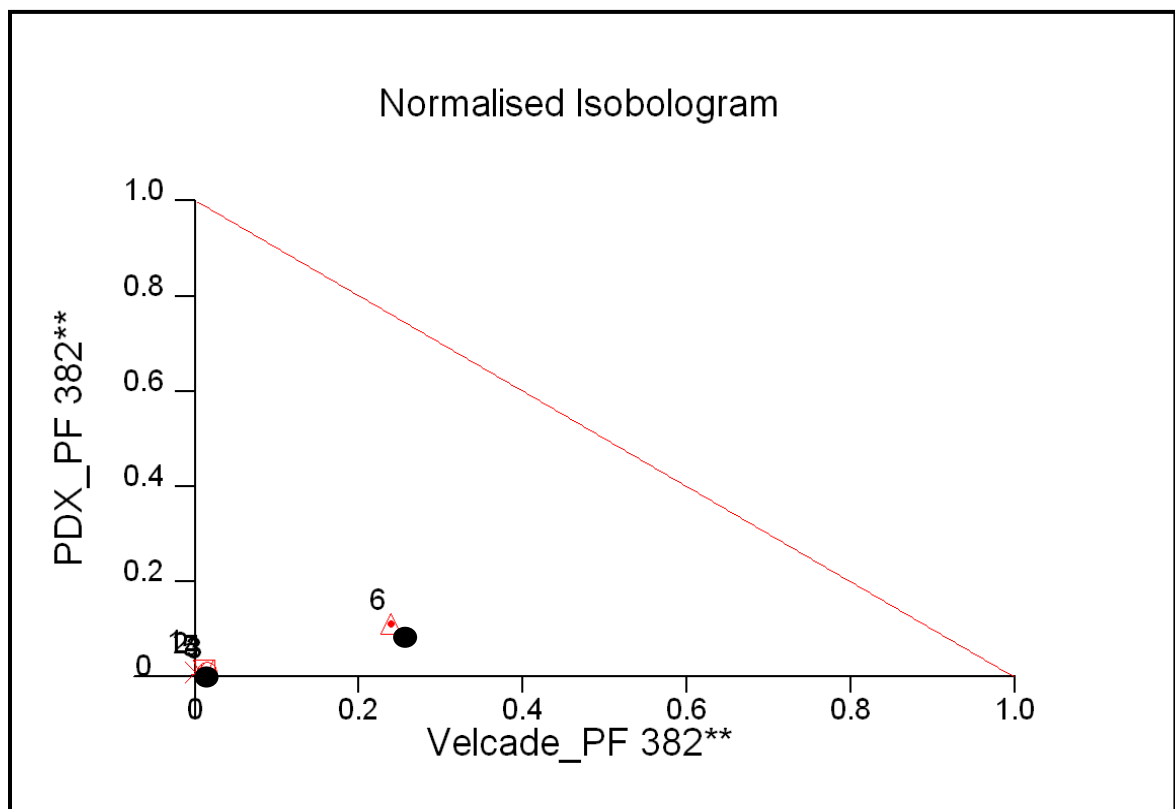
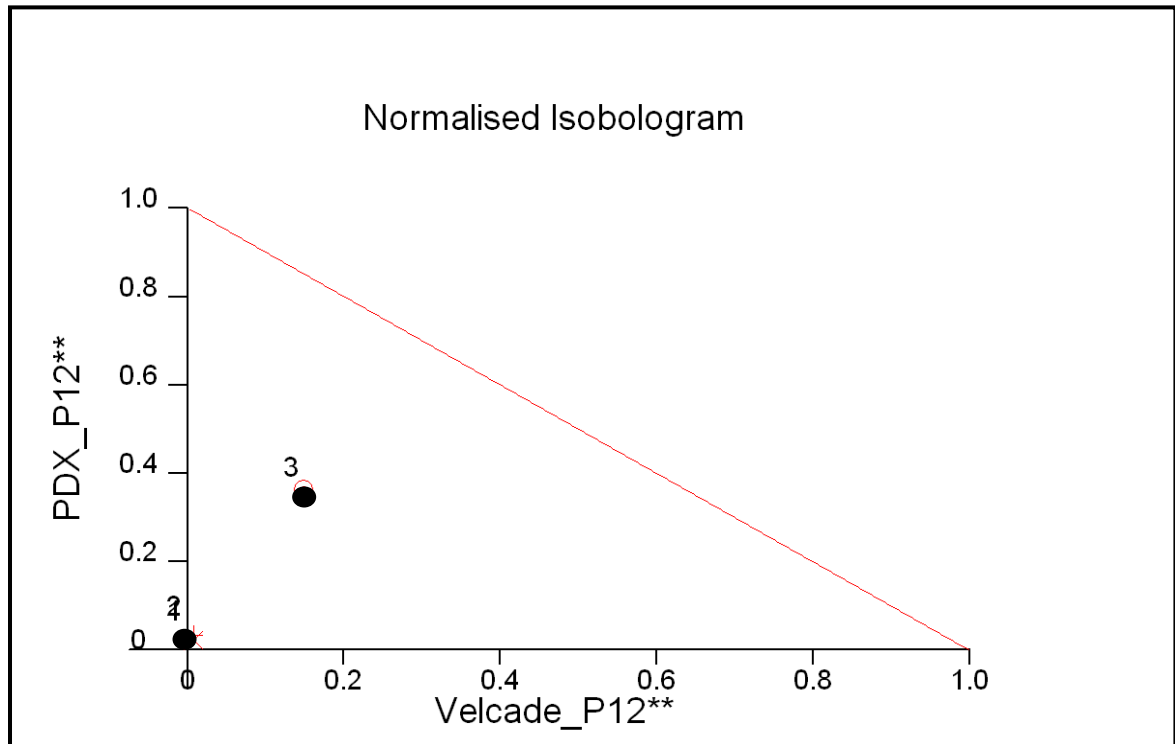


Tabella 2

La tabella elenca le dosi di pralatrexate e bortezomib utilizzando in combinazione con gli indici di combinazione (CI) ottenuti dopo l'analisi eseguita con Calcsyn.

Linee Cellulari	Pralatrexate	Bortezomib	CI
H9	2.8 nM	6 nM	0.01
	3.2 nM	7.3 nM	0.38
HH	1 nM	2.5 nM	0.18
	3 nM	3.5 nM	0.4
P12	1.9 nM	5.5 nM	0.02
	2.2 nM	6.1 nM	0.39
PF 382	5.7 nM	3.6 nM	0.04
	6.2 nM	4 nM	0.33

Figura 5

Aumento della percentuale di cellule che vanno incontro ad apoptosi dopo esposizione alla combinazione di pralatrexate e bortezomib in H9. Il RRR relativo alla combinazione dei farmaci alle dosi valutate è risultato essere uguale a 0.6 - 0.7. Sinergismo presente se $RRR < 1$.

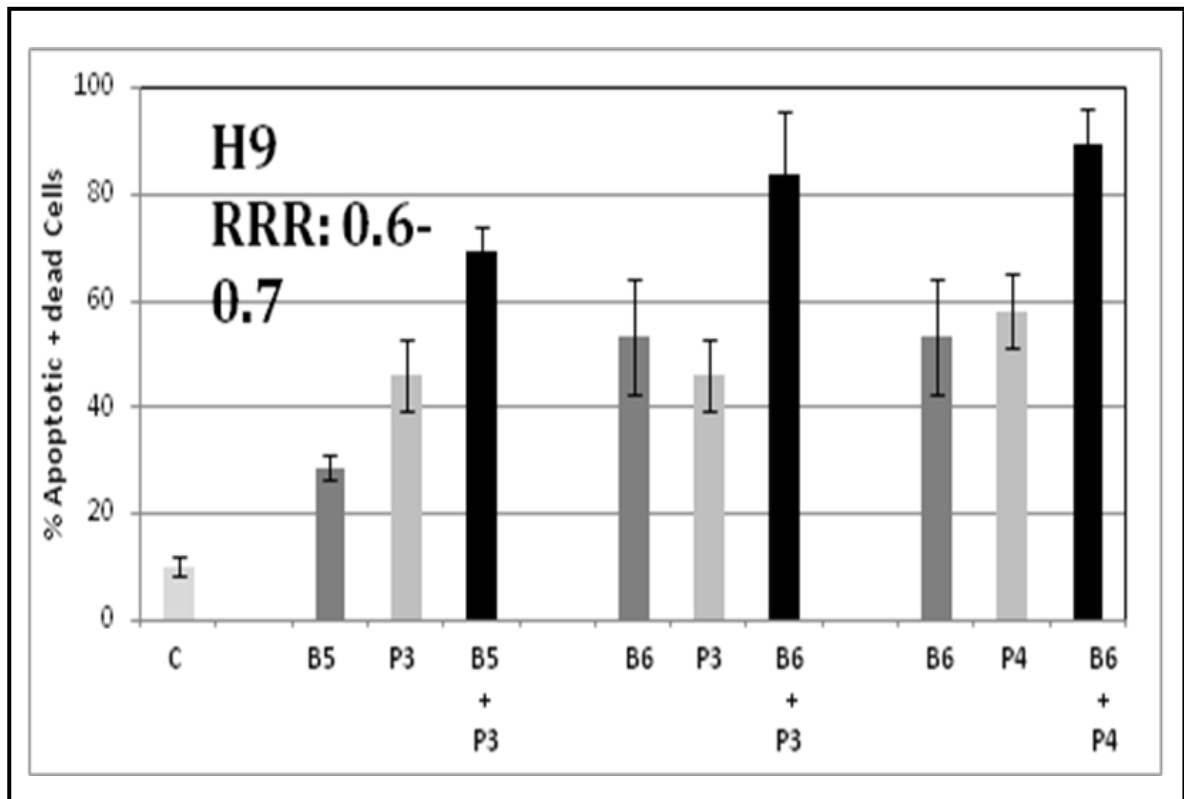


Figura 6

Aumento della percentuale di cellule che vanno incontro ad apoptosi dopo esposizione alla combinazione di pralatrexate e bortezomib in H9.

Il RRR relativo alla combinazione dei farmaci alle dosi valutate è risultato essere uguale a 0.66. Sinergismo presente se $RRR < 1$.

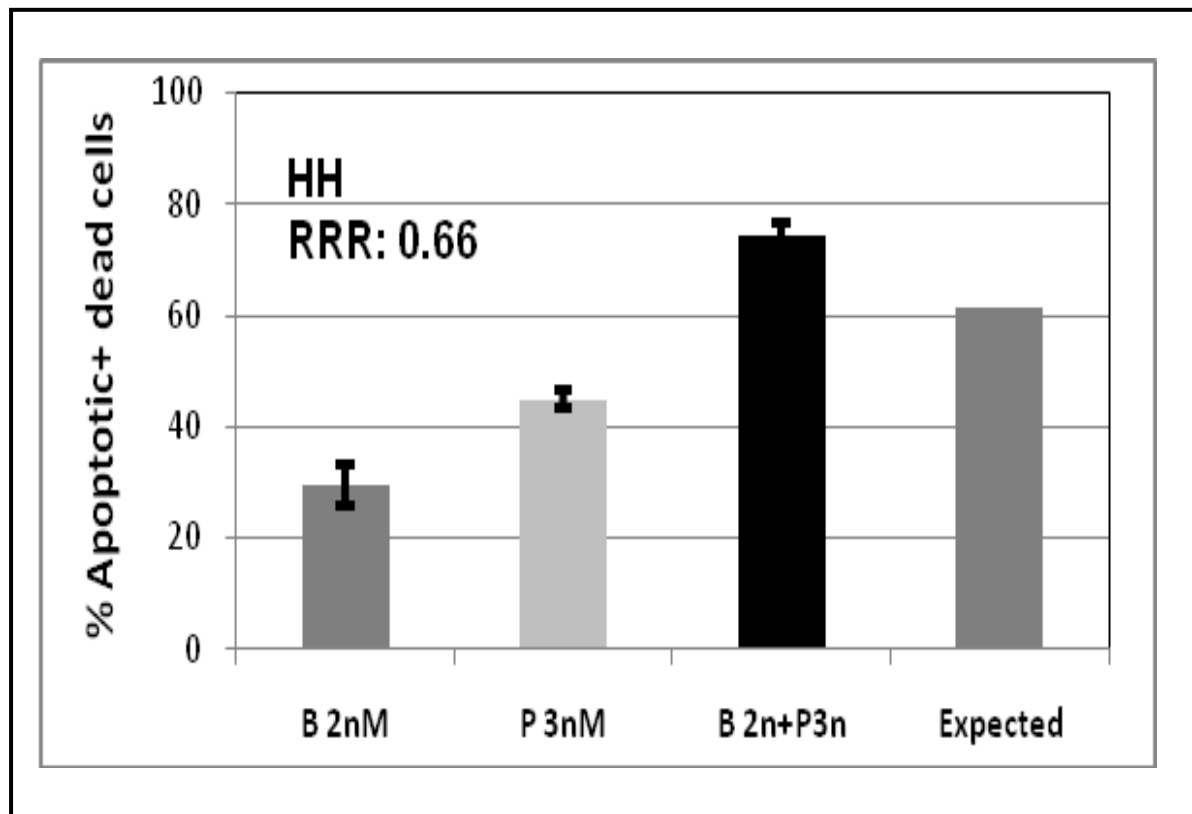


Tabella 3

La tabella elenca le concentrazioni di pralatrexate e bortezomib valutate al citofluorimento con le relative percentuali di induzione di apoptosi per i farmaci utilizzati da soli o in combinazione ed i valori di RRR per le interazioni farmaco: farmaco valutate nelle linee cellulari di linfoma non hodgkin cutaneo.

RRR < 1 uguale interazione sinergica.

Linea Cellulare	Bortezomib (% Apoptosi)	Pralatrexate (% Apoptosi)	Pralatrexate + Bortezomib (% Apoptosi)	RRR
H9	5 nM (26-31%)	3 nM (40-51%)	63-73%	0.7
	6 nM (43-63%)	3 nM (40-51%)	73-92%	0.7
	6 nM (43-63%)	4 nM (51-63%)	83-94%	0.6
HH	2 nM (28-34%)	3 nM (38-41%)	50-55%	0.6

Figura 7

Aumento della percentuale di cellule che vanno incontro ad apoptosi dopo esposizione alla combinazione di pralatrexate e bortezomib in P12.

Il RRR relativo della combinazione dei farmaci alle dosi valutate è risultato essere compreso tra 0.8 e 0.7. Sinergismo presente se $RRR < 1$.

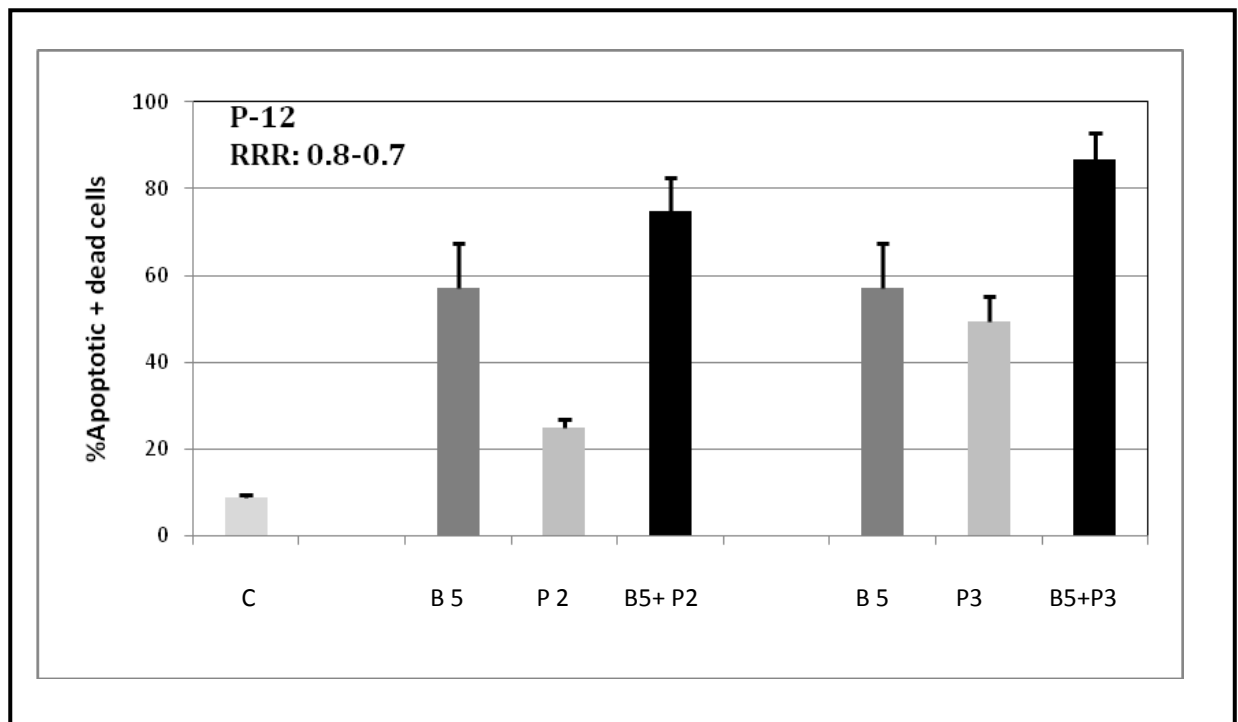


Figura 8

Aumento della percentuale di cellule che vanno incontro ad apoptosi dopo esposizione alla combinazione di pralatrexate e bortezomib in PF382.

Il RRR relativo della combinazione dei farmaci alle dosi valutate è risultato essere uguale a 0.6. Sinergismo presente se $RRR < 1$.

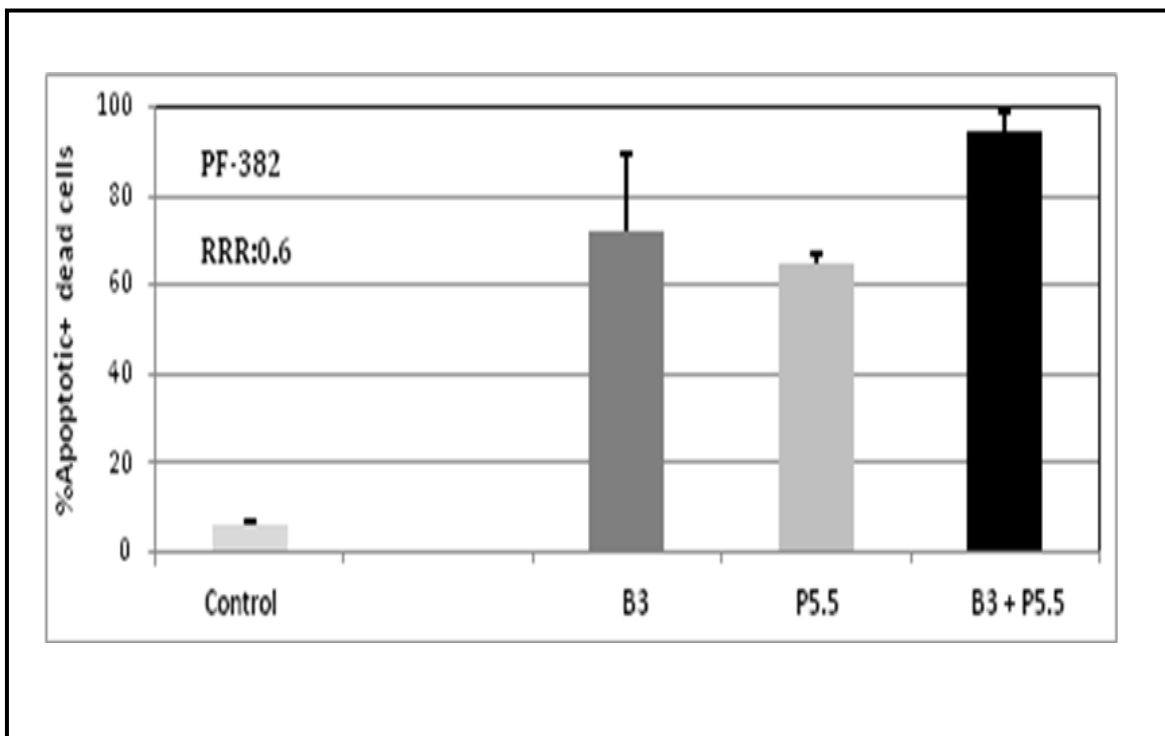


Tabella 4

La tabella elenca le concentrazioni di pralatrexate e bortezomib valutate al citofluorimento con le relative percentuali di induzione di apoptosi per i farmaci utilizzati da soli o in combinazione ed i valori di RRR per le interazioni farmaco: farmaco valutate nelle linee cellulari di leucemia acuta linfoblastica T. RRR < 1 uguale interazione sinergica. Sono stati utilizzati Yo Pro-1 e PI come coloranti per l'apoptosi.

Linee Cellulari	Bortezomib (% Apoptosi)	Pralatrexate (% Apoptosi)	Pralatrexate + Bortezomib (% Apoptosi)	RRR
P12	5 nM (50-67%)	2 nM (21-27%)	65-81%	0.8
	5 nM (50-67%)	3 nM (42-55%)	84-92%	0.7
PF382	3nM (60-85%)	5.5 nM (64-67%)	91-98%	0.6

Figura 9

Gli istogrammi sottostanti dimostrano la percentuale di cellule che presentano attivazione della caspasi 8 e 9 dopo utilizzo di pralatrexate e bortezomib e della combinazione dei due dopo 24 ore di incubazione nella linea cellulare H9.

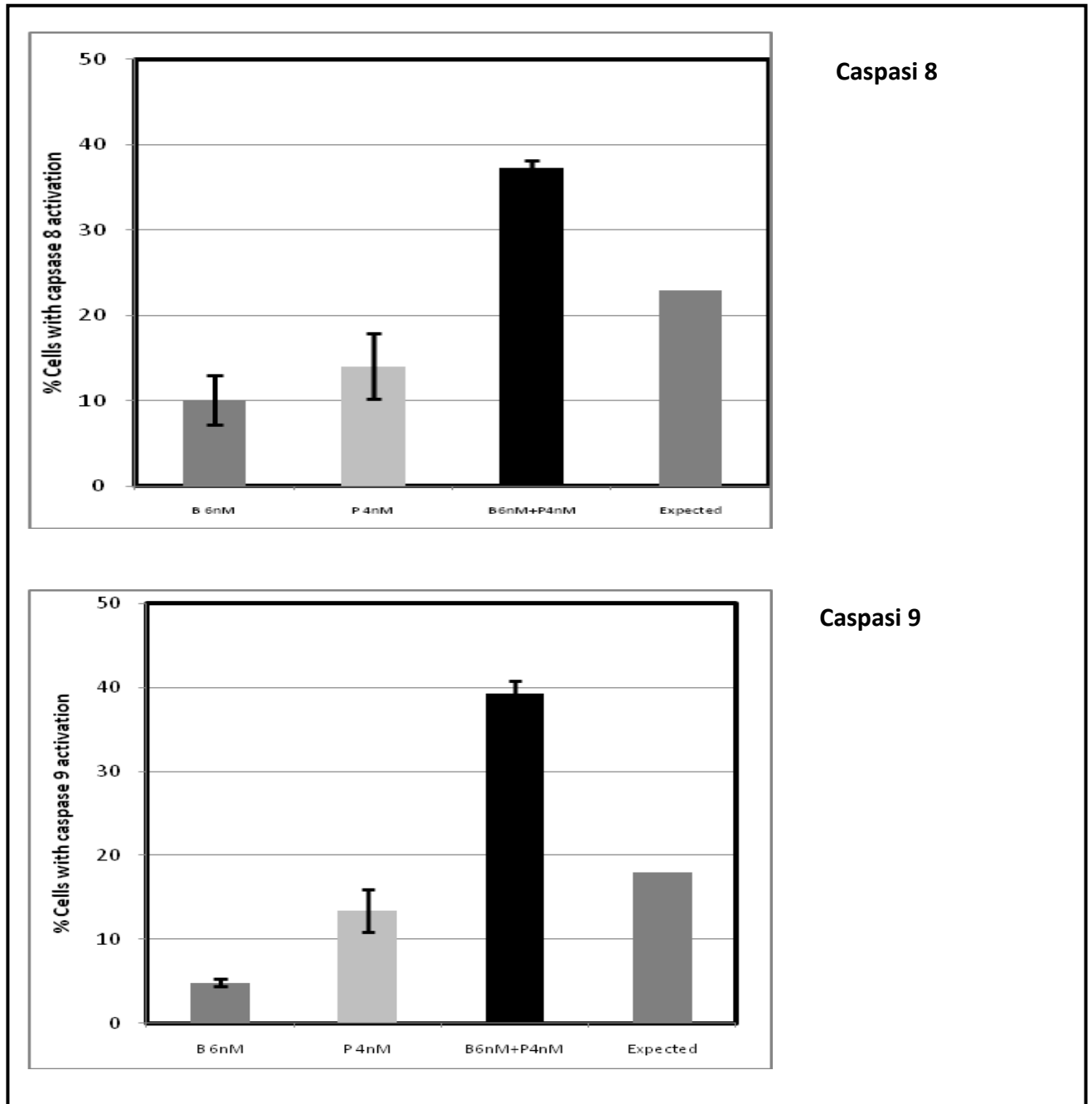


Tabella 5

La tabella elenca le percentuali relative di attivazione di caspasi 8 e 9, dopo analisi del RRR, indotte dal trattamento delle cellule con pralatrexate 4 nM, bortezomib 6 nM e la combinazione dei due farmaci dopo 24 ore di incubazione.

H9	% Attivazione di Caspasi 8	% Attivazione di Caspasi 9
Bortezomib	10%	5%
Pralatrexate	14%	13%
Bortezomib + Pralatrexate	37%	39%

Figura 10

Valutazione della tossicità di pralatrexate e bortezomib e la combinazione dei due su cellule mononucleate del sangue periferico da donatori volontari dopo 48 ore di incubazione. Le concentrazioni utilizzate sono le stesse valutate come sinergiche negli esperimenti di citotossicità e apoptosi. La valutazione mostra come la combinazione non induca maggiore tossicità quando confrontata con la somministrazione di bortezomib da solo.

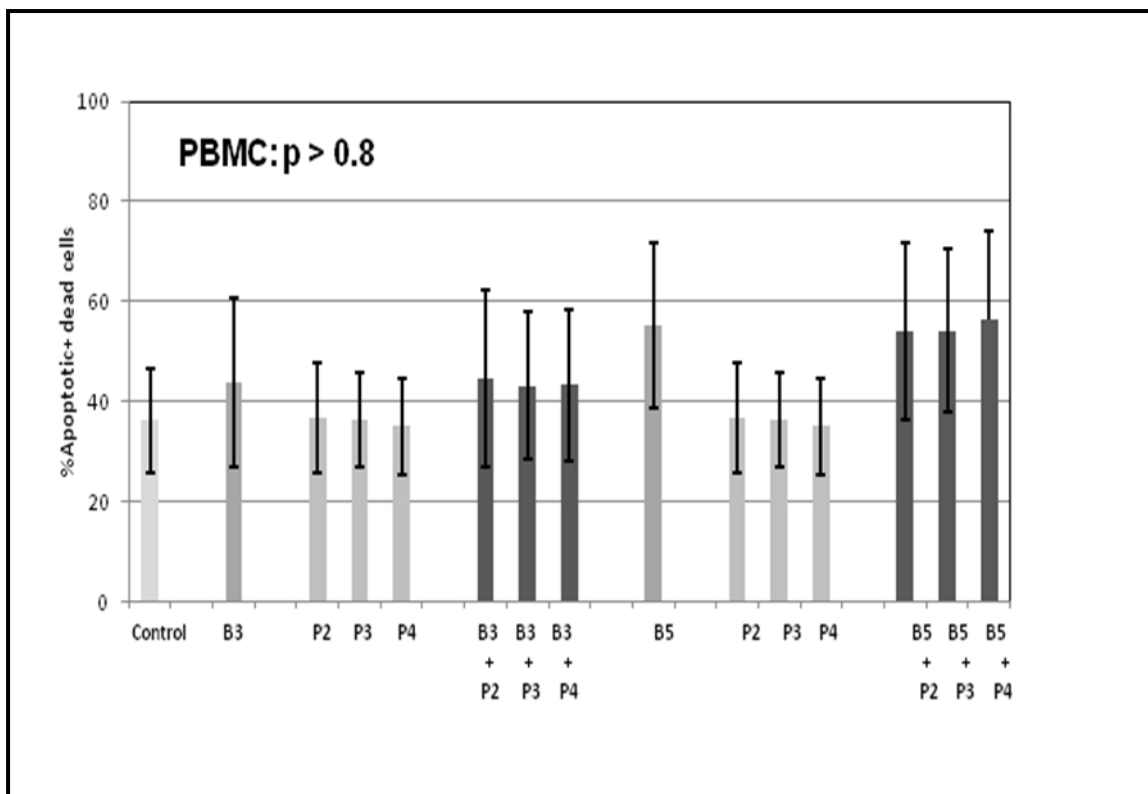


Figura 11

Cambiamenti nell'espressione proteica in H9 dopo il trattamento con pralatrexate, bortezomib e la combinazione dei due farmaci in H9 dopo 16 ore di incubazione.

E' stata valutata l'espressione di p27, NOXA, HH3 ed RFC-1 tramite westernblot. L' α -tubulina è stata utilizzata per normalizzare tutti i campioni studiati.

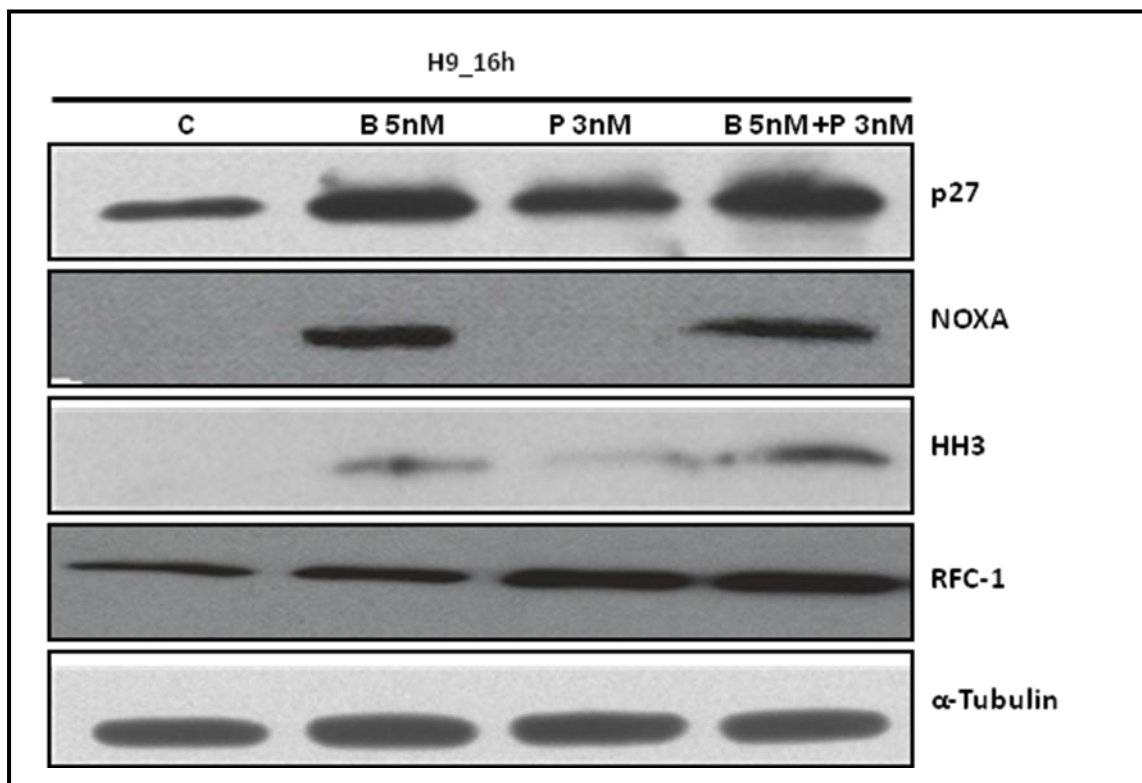


Figura 12

Cambiamenti nell'espressione proteica in P12 dopo il trattamento con pralatrexate, bortezomib e la combinazione dei due farmaci in H9 dopo 16 ore di incubazione. E' stata valutata l'espressione di p27, NOXA e HH3 tramite western blot. L' α -tubulina è stata utilizzata per normalizzare tutti i campioni studiati.

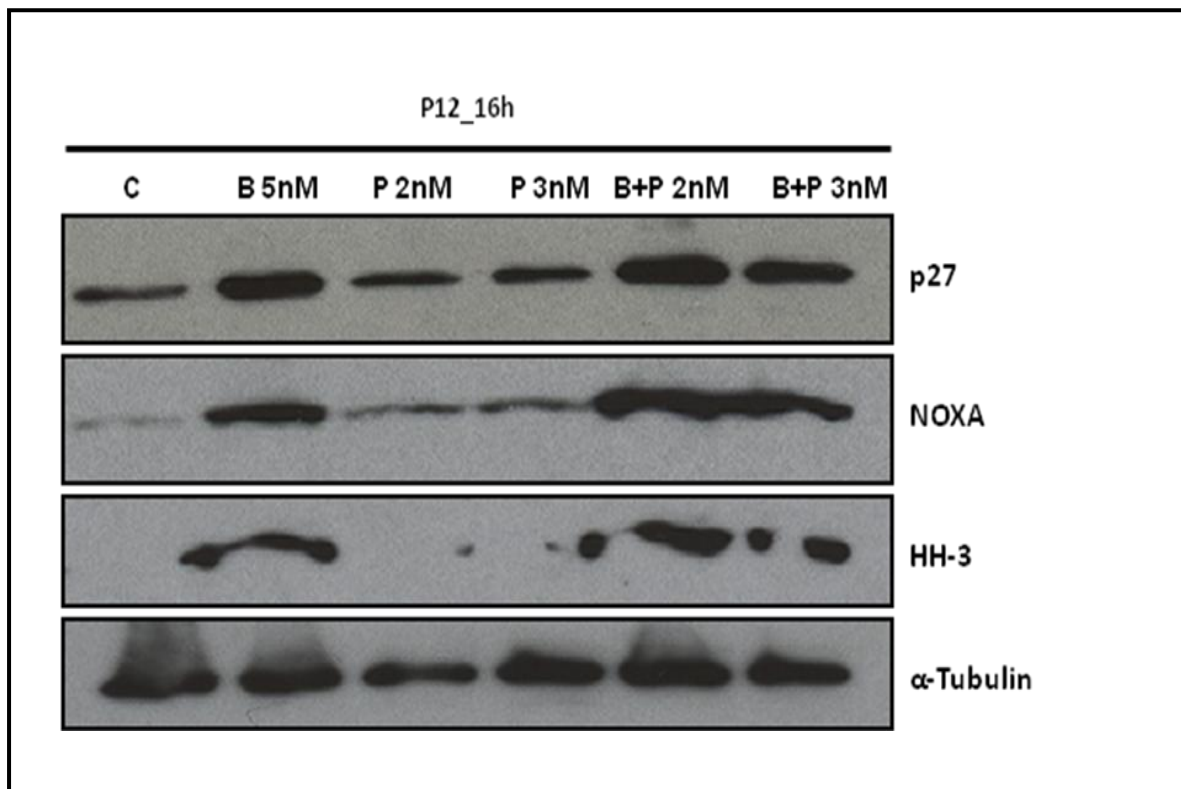


Figura 13

Il grafico rappresenta i dati riguardanti lo studio animale eseguito su un modello di topi SCID-Beige nei quali è stata iniettata HH.

Bortezomib è stato somministrato alla dose di 0.5 mg/kg, pralatrexate è stato somministrato alla dose di 15 mg/kg ai giorni 1, 4, 8, 11 per via intraperitoneale. I farmaci sono stati somministrati simultaneamente nella coorte di combinazione. Tutte le coorti sono state trattate due volte alla settimana per due settimane consecutive.

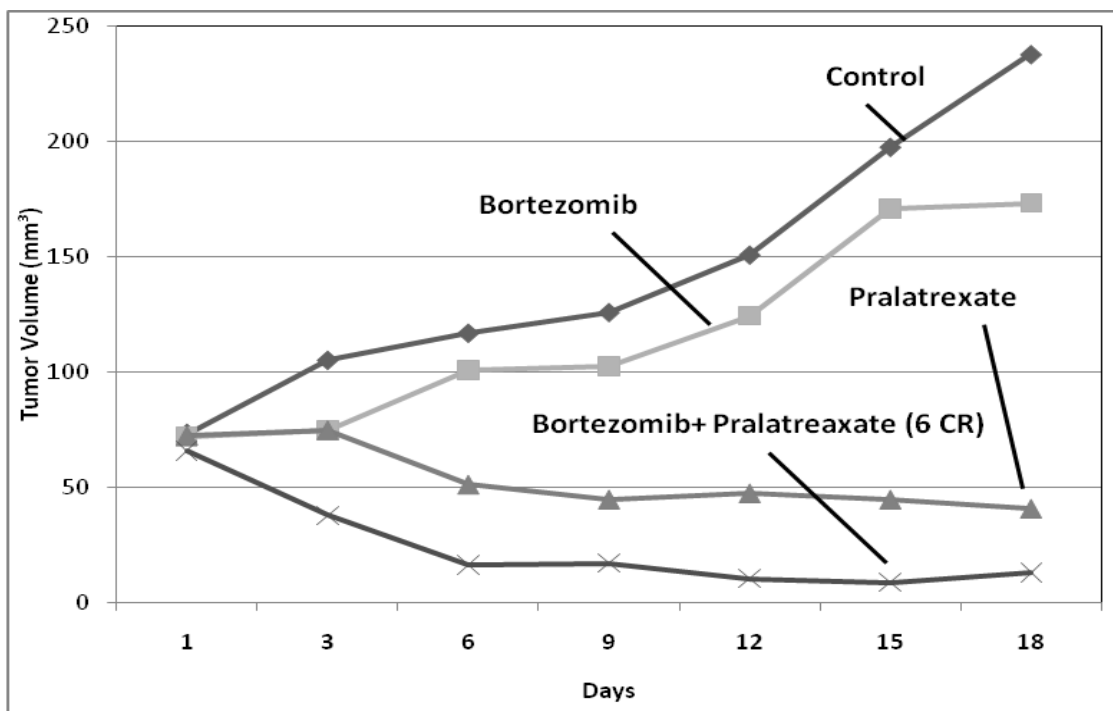


Tabella 6

La tabella evidenzia tutti i valori p risultati dalla comparazione statistica delle coorti di trattamento nell'esperimento animale. L'analisi statistica è stata eseguita su tutte le possibili comparazioni.

Giorno di trattamento	C vs BP	B vs BP	P vs BP
3	0.003	0.044	0.004
6	0.001	0.001	0.012
9	0.001	0.001	0.012
12	0.001	0.001	0.007
15	0.001	0.001	0.002
18	0.001	0.001	0.002

Tabella 7

La tabella evidenzia il valore medio della massa tumorale e la deviazione standard per tutte le coorti studiate valutate in specifici giorni durante e al termine del trattamento.

Coorte di trattamento	Volume Tumorale (mm ³) ± SD					Giorno 18
	Giorno 3	Giorno 6	Giorno 9	Giorno 12	Giorno 15	
Controlli	110.0± 31.7	120.7± 34.3	125.9± 48.4	136.4± 58.8	176.8± 75.5	230.0± 87.6
Bortezomib	79.3± 23.7	103.3± 28.1	112.9± 37.4	107.2± 50.7	184.4± 67.6	166.2± 72.5
Pralatrexate	72.9± 26.9	59.5± 34.1	45.4± 25.1	49.0± 17.8	45.5± 16.5	45.2± 17.5
B + P	27.4± 26.3	18.0± 18.8	7.1± 21.0	7.8± 12.3	0.0± 15.0	0.0± 18.8

Tabella 8

La tabella sottostante dimostra come in tutte le coorti di trattamento non si sia misurata nessuna tossicità significativa a fronte di una netta maggiore efficacia della terapia di combinazione in termini di inibizione della crescita tumorale nel modello murino studiato.

TRATTAMENTO	Calo Ponderale ≥ 10%	Morti Tossiche	Risposte (RC)
Controlli	0	0	0
Pralatrexate 15mg/Kg	0	0	0
Bortezomib 0.5 mg/Kg	0	0	0
B 0.5 mg/Kg + P 15 mg/Kg	0	0	6

5. BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Rudiger T, Weisenburger DD, Anderson JR, et al. Peripheral T-cell lymphoma (excluding anaplastic large-cell lymphoma): results from non Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann. Oncol.* 2002;13:140-9.
- ² Savage KJ. Prognosis and primary therapy in peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008:280-8.
- ³ Kwong YL, Anderson BO, Advani Ret al. Management of T-cell and natural-killer-cell neoplasms in Asia: consensus statement from the Asian Oncology Summit 2009. *Lancet Oncol.* 2009 Nov;10(11):1093-101. Review.
- ⁴ Aozasa K, Takakuwa T, Hongyo T, Yang WI. Nasal NK/T-cell lymphoma: epidemiology and pathogenesis. *Int J Hematol.* 2008 Mar;87(2):110-7. Epub 2008 Feb 8. Review.
- ⁵ Vose J, Armitage J, Weisenburger D; International T-Cell Lymphoma Project. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol.* 2008 Sep 1;26(25):4124-30. Epub 2008 Jul 14.
- ⁶ Harris NL et al., A revised European-American classification of Lymphoid neoplasms: a proposal from the international Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361-92.
- ⁷ Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997 [see comments]. *J Clin Oncol.* 1999;17:3835-3849.
- ⁸ Jaffe et al. Tumors of haematopoietic and lymphoid tissue. IRAC Press; Lyon.2001
- ⁹ Jaffe ES et al. The pathologic spectrum of adult T-cell leukemia/lymphoma in the United States. *Am J Surg Pathol* 1984; 8: 263-75.
- ¹⁰ Benharroch D et al. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood* 1998; 91: 2076-84.
- ¹¹ Pileri SA et al. Anaplastic large cell lymphoma (CD30+/Ki-1+): results of a prospective clinico-pathological study of 69 cases. *Br J Haematol* 1994; 86: 513-23.

-
- ¹² Pileri SA et al. Anaplastic large cell lymphoma: a concept reviewed. *Adv Clin Pathol* 1998; 2: 285-96.
- ¹³ Stein H et al. CD30+ anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic and clinical features. *Blood* 2000; 96: 3681-95.
- ¹⁴ Ralfkiaer E et al. Peripheral T-cell lymphoma, unspecified. In: WHO classification of Tumors, Pathology and genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon 2001; 227-9.
- ¹⁵ Martinez-Delgado B et al. Expression profiling of T-cell lymphomas differentiates peripheral and Lymphoblastic lymphomas and defines survival related genes. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4971-82.
- ¹⁶ Went, P., Agostinelli, C., Gallamini, A. et al. Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score. *J. Clin. Oncol.*, 24:2472-2479, 2006.
- ¹⁷ Piccaluga, P.P., Agostinelli, C., Califano, A. Et al. Gene expression analysis of peripheral T-cell lymphoma, unspecified, reveals distinct profiles and new potential therapeutic targets. *J. Clin. Invest.*, 117:823-834, 2007.
- ¹⁸ Piccaluga, P.P., Agostinelli, C., Righi, S. et al. Expression of CD52 in Peripheral T-Cell Lymphoma Unspecified. *Haematologica*, 92:566-567, 2007.
- ¹⁹ Roncador, G., Verdes-Montenegro, J.F., Teodoldi, S., et al. Expression of two markers of germinal center T-cells (SAP and PD-1) in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica*, 92(8):1059-66, 2007.
- ²⁰ Gazzola, A., Bertuzzi, C., Agostinelli, C., et al. Physiological *PTEN* expression in Peripheral T cell Lymphoma Not Otherwise Specified. *Haematologica*. 2009 Jul;94(7):1036-7.
- ²¹ Arrowsmith ER et al. Peripheral T-cell Lymphomas: clinical features and prognostic factors of 92 cases defined by the Revised European-American Lymphoma Classification. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 241-9.
- ²² Ascani S et al. Peripheral T-cell Lymphomas. Clinico-Pathological study of 168 cases diagnosed according to the REAL Classification. *Ann Oncol* 1997;8: 583-92. Gallamini A et al Peripheral T-cell Lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood* 2004; 103: 2474-9.

-
- ²³ Gallamini A et al Peripheral T-cell Lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood* 2004; 103: 2474-9.
- ²⁴ Rodriguez J et al. High-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in peripheral T-cell lymphoma: the GELTAMO experience. *Ann Oncol* 2003; 14: 1768-75.
- ²⁵ Rudiger T et al Peripheral T-cell Lymphoma (excluding Anaplastic large-cell Lymphoma): results from the Non- Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol* 2002; 13:140-9.
- ²⁶ A predictive model for aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. The international Non-Hodgkin's Lymphoma prognostic factors project. *N Engl J Med.* 1993; 329: 987-994.
- ²⁷ Armitage JO et al Clinical significance of immunophenotype in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 1998 ; 7 : 1783-90.
- ²⁸ Coiffier B et al Peripheral T-cell Lymphomas have a worse prognosis than B-cell lymphomas: a prospective study of 361 immunophenotyped patients treated with the LNH-84 regimen. *The GELA Ann Oncol.* 1990; 1:45-50.
- ²⁹ Grogan TM et al Peripheral T-cell Lymphoma : aggressive disease with heterogeneous immunotypes. *Am J Clin Pathol.* 1995; 83: 279-288
- ³⁰ Mourad N, Mounier N, Briere J, et al. Clinical, biologic, and pathologic features in 157 patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trials. *Blood.* 2008; 111:4463-4470.
- ³¹ Gallamini A, Stelitano C, Calvi R, et al. Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood.* 2004;103:2474-2479.
- ³² Gressin R, Peoch M, Deconick E et al. The VIP-ABVD regiment is not superior to the CHOP 21 for the treatment of non epidermotropic peripheral T cell lymphoma. Final results of the LTP95 protocol of the GOELAMS [Abstract]. *Blood.*2006; 108. Abstract #2464
- ³³ Escalon MP, Liu NS, Yang Y et al. Prognostic factors and treatment of patients with T-cell non-Hodgkin lymphomas: the M.D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer.* 2005;103:2091-2098

-
- ³⁴Marchi E, Alinari L, Tani M et al. Gemcitabine as frontline treatment for cutaneous T-cell lymphoma: phase II study of 32 patients. *Cancer* 2005 Dec 1;104(11):2437-41.
- ³⁵Zinzani PL, Baliva G, Magagnoli M, et al. Gemcitabine treatment in pretreated cutaneous T-cell lymphoma: experience in 44 patients. *J Clin Oncol*. 2000;18:2603-2606.
- ³⁶Arkenau HT, Chong G, Cunningham D, et al. Gemcitabine, Cisplatin and methylprednisolone for the treatment of patients with peripheral T-cell lymphoma: the Royal Marsden Hospital experience. *Haematologica*. 2007; 92:271-272.
- ³⁷Spencer A, Reed K, Arthur C. Pilot study of an outpatient-based approach for advanced lymphoma using vinorelbine, gemcitabine, and filgrastim. *Intern Med J*. 2007;37:760-766.
- ³⁸ Enblad G, Hagberg H, Erlanson M, et al; A pilot study of alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) therapy for patients with relapsed or chemotherapy-refractory peripheral T-cell Lymphomas. *Blood*. 2004;103:2920-2924.
- ³⁹ Moon J, Kim J, Sohn D et al. Alemtuzumab plus CHOP as front-line chemotherapy for patients with peripheral T-cell lymphomas [abstract]. *J Clin Oncol*. 2007;25 Abstract #8069.
- ⁴⁰ Prince HM, Bishton MJ, Harrison SJ. Clinical studies of Histone Deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2009;15(12) June 15, 2009.
- ⁴¹ O'Connor OA, Pro B, Pinter-Brown L, et al; Pralatrexate in patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma (PTCL). Results from the pivotal PROPEL study. *NEJM* submitted Nov 2009.
- ⁴² Sirotnak FM, DeGraw JI, Moccio DM, et al; New Folate analogs of the 10-deaza-aminopterin series. Basis for the structural design biochemical and pharmacologic properties. *Cancer Chemother Pharmacol* 1984;12:18-25.
- ⁴³ Wang ES, O'Connor OA, She Y et al. Activity of a novel anti-folate (PDX, 10-propargyl10-deazaaminopterin) against Human Lymphoma is superior to methotrexate and correlates with tumor RFC-1 gene expression. *Leuk Lymphoma* 2003 Jun; 44(6):1027-35.
- ⁴⁴ Toner LE, Vrhovac R, Smith EA, et al. The schedule-dependent effects of the novel antifolate pralatrexate and gemcitabine are superior to methotrexate and

cytarabine in models of human non-Hodgkin's lymphoma. Clin Cancer Res. 2006 Feb 1;12:924-32.

⁴⁵ Horwitz S, Duvic M, et al. Pralatrexate (PDX) is active in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): results of a multicenter dose finding trial. Abstract 919 ASH 2009

⁴⁶ Zinzani PL, Musuraca G, Tani M, et al; Phase II Trial of Proteasome Inhibitor Bortezomib in Patients With Relapsed or Refractory Cutaneous T-Cell Lymphoma. J Clin Oncol 2007 25:4293-4297.

⁴⁷ Starkebaum G, et al. Establishment of an IL-2 independent, human T-cell line possessing only the p70 IL-2 receptor. Int. J. Cancer 49: 246-253, 1991.

⁴⁸ Gootenberg JE, et al. Human cutaneous T cell lymphoma and leukemia cell lines produce and respond to T cell growth factor. J. Exp. Med. 154: 1403-1418, 1981.

⁴⁹ Ohnishi H, et al; Blood 1995, 86:1269-1275.

⁵⁰ Sangster R.N. et al; J. Exp. Med 1986. 163: 1491-1508.

⁵¹ Drexler HG et al; DSMZ Catalogue of Cell Lines, Braunschweig, Germany (1999).

⁵² O'Connor OA, Smith EA, Toner LE, et al; The combination of the proteasome inhibitor bortezomib and the bcl-2 antisense molecule oblimersen sensitizes human B-cell lymphomas to cyclophosphamide. Clin Cancer Res. 2006; 12:2902-2911.

⁵³ Hockberg Y, Tamhane AC. Multiple comparison procedures. Wiley : New York , NY; 1987:1-450.

⁵⁴ Chou TC. Relationship between inhibition constants and fractional inhibitions in enzyme-catalyzed reactions with different numbers of reactants, different reaction mechanisms, and different types of mechanisms of inhibition. Mol Pharmacol. 1974;10:235-47.

⁵⁵ Chou TC. Derivation and properties of Michaelis-Menten type and Hill type equations for reference ligands. J Theoret Biol. 1976;39:253-76.

⁵⁶ Zhao L, Wientjes G, Au JLS. Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. Clin Cancer Research. 2004;10:7994-8004.

-
- ⁵⁷ Paoluzzi L, Gonen M, Bhagat G, et al; The BH3-only mimetic ABT-737 synergizes the antineoplastic activity of proteasome inhibitors in lymphoid malignancies. *Blood*. 2008 Oct 1;112(7):2906-16. Epub 2008 Jun 30.
- ⁵⁸ Paoluzzi L, Gonen M, Gardner JR, et al. Targeting Bcl-2 family members with the BH3 mimetic AT-101 markedly enhances the therapeutic effects of chemotherapeutic agents in in vitro and in vivo models of B-cell lymphoma. *Blood* Jun 1;111(11): 5350–5358.
- ⁵⁹ O'Connor OA, Horwitz S, Hamlin P, et al; Phase II-I-II study of two different doses and schedules of pralatrexate, a high-affinity substrate for the reduced folate carrier, in patients with relapsed or refractory lymphoma reveals marked activity in T-cell malignancies. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 10;27(26):4357-64. Epub 2009 Aug 3.
- ⁶⁰ Zang QL, Wang L, Zhang YW, et al; The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid to induce T-leukemia/lymphoma cells apoptosis. *Leukemia* 2009 Aug;23(8):1507-14. Epub 2009 Mar 12.
- ⁶¹ Toner LE, Vrhovac R, Smith EA, et al; The Schedule-Dependent effects of the novel antifolate pralatrexate and gemcitabine are superior to methotrexate and cytarabine in models of human non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):924-32.
- ⁶² Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, et al; The Ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and activation of NF-kappa B. *Cell*. 1994;78:773-785.
- ⁶³ Adams J. The Proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:349-360.
- ⁶⁴ Paoluzzi L, O'Connor OA. Mechanistic rationale and clinical evidence for the efficacy of the proteasome inhibitors against indolent and mantle cell lymphomas. *BioDrugs*. 2006;20:13-23.
- ⁶⁵ Ploner C, Kofler R, Villunger A; Noxa: at the tip of the balance between life and death. *Oncogene* (2009) 27, S84–S92.
- ⁶⁶ Marneros AG, Grossman ME, Silvers DN, et al; Pralatrexate-induced tumor cell apoptosis in the epidermis of a patient with HTLV-1 adult T-cell lymphoma/leukemia causing skin erosions. *Blood*. 2009 Jun 18;113(25):6338-41. Epub 2009 Apr 23.

⁶⁷ Shujun Liu, Zhongfa Liu, Zhiliang Xie, et al; Bortezomib induces DNA hypomethylation and silenced gene transcription by interfering with Sp1/NF- κ B-dependent DNA methyltransferase activity in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):2364-73.

⁶⁸ Ri M, Iida S, Ishida T, Ito A, Yano H, et al; Bortezomib-induced apoptosis in mature T-cell lymphoma cells partially depends on upregulation of NOXA and functional repression of Mcl-1. *Cancer Sci*. 2008 Dec 4.

⁶⁹ Heider U, Rademacher J, Lamottke B, et al; Synergistic interaction of the histone deacetylase inhibitor SAHA with the proteasome inhibitor bortezomib in cutaneous T cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2009 Jun;82(6):440-9. Epub 2009 Feb 10.