

IL MICROAMBIENTE TUMORALE COME BERSAGLIO TERAPEUTICO

Alessandro Gianni

Struttura complessa Oncologia Medica 3, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

Base di partenza e razionale

La terapia dei tumori, sviluppatasi a partire dagli anni '50, si basa quasi esclusivamente sull'impiego di farmaci dotati di citotossicità diretta nei confronti della cellula tumorale.

Questo approccio riflette largamente le modalità di screening impiegate fino a pochi anni or sono nella ricerca di composti ad attività antitumorale, consistenti nel testare l'attività antiproliferativa di un gran numero di composti empiricamente selezionati su linee cellulari coltivate *in vitro*. All'opposto, *in vivo* la crescita tumorale è influenzata in modo determinante dalle cellule che costituiscono il microambiente tumorale. Lo stroma co-evolve con il tumore e concorre a formare un microambiente sfavorevole alle terapie sia dal punto di vista strutturale sia fornendo fattori di sopravvivenza. I principali attori cellulari del microambiente tumorale sono i fibroblasti dello stroma, le cellule del sistema immunitario sia innato che adattativo, e le cellule della rete vascolare e linfatica. A questi si associano i componenti della matrice extracellulare che hanno sia funzione strutturale che regolatoria.

La maggiore comprensione della biologia della crescita tumorale *in vivo*, e il riconoscimento del ruolo critico giocato dal microambiente, incoraggia oggi la ricerca di trattamenti in cui il bersaglio non sia la cellula tumorale, ma le cellule del microambiente con funzioni di supporto. Promettenti risultati clinici sono stati osservati in alcuni tumori umani con farmaci capaci di inibire le cellule endoteliali (talidomide nel mieloma, bevacizumab nei tumori epiteliali) o i B linfociti (rituximab nel linfoma di Hodgkin classico, CD20-negativo).

Queste osservazioni, anche se preliminari e perfettibili, rappresentano un'importante prova di principio a favore di strategie terapeutiche dirette contro il microambiente. Se combinate con la chemioterapia tradizionale possono potenziarne l'efficacia favorendone l'attività citotossica e/o la biodistribuzione del farmaco al tumore.

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi generali del progetto sono:

1. identificare nel microambiente tumorale nuovi bersagli terapeutici basandosi su modelli preclinici biologicamente ben caratterizzati;
2. identificare meccanismi responsabili di effetti biologici o efficacia terapeutica in studi clinici in cui l'attività sul microambiente è ipotizzabile;
3. validare, in studi clinici di fase I-II, l'effettivo targeting di cellule dello stroma e loro efficacia.

Obiettivi specifici principali del progetto sono:

1. valutare l'attività di un anticorpo anti-SPARC (di topo > in topo) nel favorire l'accesso al tumore di farmaci e anticorpi terapeutici;

2. confermare l'esistenza della nicchia per la leucemia mieloide acuta e modularne l'interazione con le cellule staminali leucemiche;
3. definire il ruolo di PTX-3 (una proteina solubile di fase acuta prodotta dai macrofagi) e dei macrofagi nel favorire la crescita tumorale dei sarcomi;
4. verificare in pazienti affetti da linfoma di Hodgkin l'attività antilinfomatosa di farmaci diretti contro cellule del microambiente (in particolare T-linfociti CD4-positivi);
5. verificare l'attività antitumorale di farmaci dotati di attività inibitoria sull'autofagia, un processo cellulare influenzato dal microambiente e responsabile di resistenza ai farmaci antitumorali.

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione del progetto Il microambiente tumorale come bersaglio terapeutico

Proponente (Cordinatore del progetto)	Unità Operativa (UO) (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
INT (Alessandro M. Gianni)	UO1 (INT: Alessandro M. Gianni)	INT	Alessandro M. Gianni
		INT	Andrea Anichini
		INT	Mario P. Colombo
		INT	Elda Tagliabue
	UO2 (IEO: Pier Giuseppe Pelicci)	IEO	Pier Giuseppe Pelicci
		IEO	Giuliana Pelicci
		IEO	Bruno Amati
		ISS	Walter Malorni
	UO3 (Humanitas: Paola Allavena)	Humanitas	Paola Allavena
		HSR	Angelo Corti

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

L'attività delle UO coinvolte nel progetto si è incentrata su due aspetti principali:

1. *Studi preclinici che hanno esplorato il ruolo del microambiente tumorale nella genesi, nella progressione e nella terapia dei tumori*

Il microambiente dei tumori solidi è caratterizzato dalla presenza di cellule e mediatori infiammatori i quali contribuiscono al continuo rimodellamento tissutale, alla neo-angiogenesi alla progressione e invasione tumorale. Pertanto, il microambiente del tumore non soltanto può contribuire alla genesi e alla progressione neoplastica ma rappresenta un potenziale bersaglio terapeutico. Gli studi preclinici eseguiti nel corso del secondo anno del progetto hanno investigato molteplici aspetti del ruolo del microambiente.

SPARC è una proteina della matrice extracellulare il cui gene è differenzialmente espresso in molti tumori. Dati ottenuti in topi knockout (KO) per SPARC e mediante

trapianti di midollo osseo reciproci tra questi e topi wild type hanno identificato ruoli distinti per SPARC prodotto da cellule leucocitarie e dal tumore stesso. L'anticorpo generato in topi KO contro tessuti esprimenti SPARC, pur non riconoscendo SPARC, interferisce con attività biologiche di SPARC. Per esempio, cellule di carcinoma mammario altamente metastatiche producono poche metastasi in topi SPARC KO ma anche in topi trattati con l'anticorpo.

Lo studio dell'interazione melanoma-stroma basato sulla valutazione dell'attività di IL-19 sul profilo di espressione genica dei fibroblasti tumore-associati (TAF) ha dimostrato che il cross-talk tra melanoma e stroma mediato da citochine espresse nel tumore, contribuisce alla produzione, nel microambiente neoplastico, di fattori dell'infiammazione, e che farmaci bersaglio specifici possono inibire questa interazione.

Sono stati eseguiti studi *in vitro* e *in vivo* per valutare la suscettibilità di linee cellulari umane di melanoma metastatico all'apoptosi e/o all'autofagia in condizioni di microambiente sfavorevole e la modulazione farmacologica di questi processi. Gli studi *in vitro* hanno evidenziato che il trattamento con anti-folati, quali la pirimetamina, induce una significativa apoptosi e inibisce il processo autofagico in cellule derivanti da melanoma metastatico. Conferma *in vivo* si è ottenuta studiando topi nudi inoculati con linee cellulari di melanoma umano altamente metastatiche.

È stata valutata la capacità di Trabectedin di inibire la produzione di citochine, chemochine e proteine della matrice. In linee di liposarcoma mixoide, è stato dimostrato che Trabectedin inibisce in modo significativo alcuni mediatori infiammatori (CCL2, CCL5, CXCL8, IL-6, VEGF). *In vivo*, in liposarcomi mixoidi umani trapiantati come xenograft in topi immunodeficienti, Trabectedin riduce CCL2 e CXCL8 nei tumori, così come l'infiltrazione dei macrofagi e la densità dei vasi tumorali. È stata inoltre valutata l'attività anti-angiogenica della cromogranina-A e della vasostatina-1 in saggi basati sull'uso di anelli di aorta di ratto e saggi CAM (chick corioallantoic membrane assay). La cromogranina A è risultata capace di inibire la formazione di capillari indotta da FGF mentre la vasostatina è risultata essere 30 volte meno attiva. La cromogranina circolante, ma non la vasostatina-1, potrebbe svolgere un ruolo rilevante nella regolazione dell'angiogenesi in condizioni normali e patologiche.

È stato approfondito da un punto di vista molecolare il ruolo svolto dall'inibitore del ciclo cellulare p21 nel processo leucemogenico e a caratterizzare le cellule leucemiche quiescenti. Le cellule staminali (*Stem Cells*, CS), sia normali che leucemiche, necessitano di una relativa quiescenza o di una "pausa" nella divisione cellulare. Questa pausa è necessaria alla SC leucemica per riparare, e contenere, l'accumulo di danno al DNA causato dallo stress proliferativo indotto da un oncogene (AML1-ETO e PML-RAR). In assenza di p21 le SC perdono la quiescenza e non sono più in grado di riparare il danno al DNA che si accumula fino a portare alla loro eliminazione. I nostri dati rivelano il potenziale oncogenico di p21, suggerendo come strategia efficace per l'eradicazione delle SC leucemiche poco proliferanti l'inibizione di meccanismi di riparazione del DNA.

È stato indagato il ruolo della chinasi ciclino-dipendente Cdk2 sia in cellule staminali ematopoietiche (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC) che in tumori ematopoietici. In saggi di ripopolazione, non è stato riscontrato alcun difetto/vantaggio delle HSC delete di Cdk2, ma la perdita di Cdk2 sensibilizza vari tipi cellulari, tra i quali i linfociti B, ad una risposta di senescenza dopo attivazione dell'oncogene c-myc. In un modello tumorale transgenico, questo ritarda la linfomagenesi indotta da c-myc in assenza di Cdk2. Inoltre, l'inibizione farmacologica di Cdk2 causa senescenza in cellule over-esprimenti c-myc, suggerendo un possibile approccio terapeutico in tumori con espressione elevata di questo oncogene.

2. *Studi clinici di chemioimmunoterapia o con farmaci antiangiogenetici aventi l'obiettivo di bersagliare sia le cellule neoplastiche che le cellule del microambiente tumorale.*

Il linfoma di Hodgkin (LH) è caratterizzato istologicamente dalla presenza di un numero limitato di cellule tumorali (cellule di Hodgkin/Reed-Sternberg) che rappresentano meno del 5% delle cellule del tessuto linfomatoso e sono circondate da un numero preponderante di cellule infiammatorie, in particolare T- e B-linfociti. L'eliminazione di queste cellule dal microambiente potrebbe sottrarre alla cellula di Hodgkin/Reed-Sternberg fattori indispensabili alla sua sopravvivenza con conseguente arresto maturativo e morte cellulare. È stato iniziato l'arruolamento in uno studio clinico di fase III da condurre in pazienti con LH in stadio precoce che vengono randomizzati a ricevere chemioterapia secondo lo schema ABVD seguito da radioterapia oppure ABVD supplementato con l'anticorpo monoclonale anti-CD20 Rituximab.

Publicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo secondo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18:3-10.
2. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 2008;222:155-61.
3. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:1-9.
4. Angelone T, Quintieri AM, Goumon Y, Di Felice V, Filice E, Gattuso A, Mazza R, Corti A, Tota B, Metz-Boutigue MH, Cerra MC. Cytoskeleton mediates negative inotropism and lusitropism of chromogranin A-derived peptides (human vasostatin1-78 and rat CgA(1-64) in the rat heart. *Regul Pept* 2009 (in corso di stampa).
5. Bellone M, Mondino A, Corti A. Vascular targeting, chemotherapy and active immunotherapy: teaming up to attack cancer. *Trends Immunol* 2008;29:235-41.
6. Bergamaschi A, Tagliabue E, Sorlie T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R, Tammi R, Giercksky H, Nesland JM, Ménard S, Borresen-Dale AL. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol* 2008;214:357-67.
7. Campaner S, Doni M, Hydbring P, Verrecchia A, Bianchi L, Sardella D, Schleker T, Perna D, Tronnersjö S, Murga M, Fernandez-Capetillo O, Barbacid M, Lars-Gunnar Larsson LG, Amati B. Cdk2 suppresses cellular senescence induced by the myc oncogene. *Nature Cell Biology* 2010;12(1):54-9.
8. Chiesa C, Botta F, Coliva A, Maccauro M, Devizzi L, Guidetti A, Carlo-Stella C, Seregini E, Gianni AM, Bombardieri E. Absorbed dose and biologically effective dose in patients with high-risk non-Hodgkin's lymphoma treated with high-activity myeloablative 90Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin®). *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009;36:1745-57.
9. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30:1073-81.
10. Corti A, Curnis F, Arap W, Pasqualini R. The neovasculature homing motif NGR: more than meets the eye. *Blood* 2008;112:2628-35.
11. Cretich M, Longhi R, Corti A, Damin F, Carlo GD, Sadini V, Chiari M. Epitope mapping of human chromogranin a by peptide microarrays. *Methods Mol Biol* 2009;570:221-32.

12. Crippa L, Gasparri A, Sacchi A, Ferrero E, Curnis F, Corti A. Synergistic damage of tumor vessels with ultra-low dose endothelial-monocyte activating polypeptide-II and neovasculature-targeted TNF α . *Cancer Res* 2008;68:1154-61.
13. Curnis F, Sacchi A, Gasparri A, Longhi R, Bachi A, Doglioni C, Bordignon C., Traversari C, Rizzardi GP, Corti A. Isoaspartate-glycine-arginine: a new tumor vasculature targeting motif. *Cancer Res* 2008;68:7073-82.
14. Devizzi L, Guidetti A, Tarella C, Magni M, Matteucci P, Seregini E, Chiesa C, Bombardieri E, Di Nicola M, Carlo-Stella C, Gianni AM. High-dose yttrium-90-ibritumomab tiuxetan with tandem stem-cell reinfusion: an outpatient preparative regimen for autologous hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2008;26:5175-82.
15. Di Comite G, Previtali P, Rossi CM, Dell'Antonio G, Rovere-Querini P, Praderio L, Dagna L, Corti A, Doglioni C, Maseri A, Sabbadini MG, Manfredi AA. High blood levels of chromogranin A in giant-cell arteritis identify patients refractory to corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis* 2009;68:293-5.
16. Di Comite G, Rossi CM, Marinosci A, Lolmede K, Baldissera E, Aiello P, Mueller RB, Herrmann M, Voll RE, Rovere-Querini P, Sabbadini MG, Corti A, Manfredi AA. Circulating chromogranin A reveals extra-articular involvement in patients with rheumatoid arthritis and curbs TNF- α -elicited endothelial activation. *J Leukoc Biol* 2009;85:81-7.
17. Di Nicola M, Zappasodi R, Carlo-Stella C, Mortarini R, Pupa SM, Magni M, Devizzi L, Matteucci P, Baldassari P, Ravagnani F, Cabras A, Anichini A, Gianni AM. Vaccination with autologous tumor-loaded dendritic cells induces clinical and immunological responses in indolent B-cell lymphoma patients with relapsed and measurable disease: a pilot study. *Blood* 2009;113:18-27.
18. Giammarioli AM, Maselli A, Casagrande A, Gambardella L, Gallina A, Spada M, Giovannetti A, Proietti E, Malorni W, Pierdominici M. Pyrimethamine induces apoptosis of melanoma cells via a caspase and cathepsin double-edged mechanism. *Cancer Res* 2008;68:5291-300.
19. Laghi L, Bianchi P, Miranda E, Balladore E, Pacetti V, Grizzi F, Allavena P, Torri V, Repici A, Santoro A, Mantovani A, Roncalli M, Malesci A. CD3 $^{+}$ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *Lancet Oncol* 2009;10:877-84.
20. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454:436-44.
21. Marchesi F, Piemonti L, Fedele F, Destro A, Roncalli M, Albarello, Doglioni, Anselmo, Doni, Bianchi, Laghi, Malesci, Cervo, Malosio, Reni, Zerbi, Di Carlo, Mantovani A, Allavena P. The Chemokine Receptor CX3CR1 Is Involved in the Neural Tropism and Malignant Behavior of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Res* 2008;68:9060-9.
22. Matarrese P, Ciarlo L, Tinari A, Piacentini M, Malorni W. Xeno-cannibalism as an exacerbation of self-cannibalism: a possible fruitful survival strategy for cancer cells. *Curr Pharm Des* 2008;14:245-52.
23. Matarrese P, Manganelli V, Garofalo T, Tinari A, Gambardella L, Ndebele K, Khosravi-Far R, Sorice M, Esposti MD, Malorni W. Endosomal compartment contributes to the propagation of CD95/Fas-mediated signals in type II cells. *Biochem J* 2008;413:467-78.
24. Mortarini R, Vegetti C, Molla A, Arienti F, Ravagnani F, Maurichi A, Patuzzo R, Santinami M, Anichini A. Impaired STAT Phosphorylation in T Cells from Melanoma Patients in Response to IL-2: Association with Clinical Stage. *Clin Cancer Res* 2009;15:4085-94.
25. Porta C, Laghi P, Rimoldi M, Grazia Totaro M, Allavena P, Mantovani A, Sica A. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* 2009;214:761-77.

26. Righi M, Giacomini A, Lavazza C, Sia D, Carlo-Stella C, Gianni AM. A computational approach to compare microvessel distributions in tumors following antiangiogenic treatments. *Lab Invest* 2009;89:1063-70.
27. Sangaletti S, Colombo MP. Matricellular proteins at the crossroad of inflammation and cancer. *Cancer Lett* 2008;267:245-253.
28. Sangaletti S, Di Carlo E, Gariboldi S, Miotti S, Cappetti B, Parenza M, Brekken RA, Chiodoni C, Colombo MP. Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer Res* 2008;68:9050-59.
29. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009;86:1065-73.
30. Spitaleri A, Mari S, Curnis F, Traversari C, Longhi R, Bordignon C, Corti A, Rizzardi GP, Musco G. Structural basis for the interaction of isoDGR with the RGD-binding site of alphav/beta3 integrin. *J Biol Chem* 2008;283:19757-68.
31. Viale A, De Franco F, Orleth A, Cambiaghi V, Giuliani V, Bossi D, Ronchini C, Ronzoni S, Muradore I, Monestiroli S, Gobbi A, Alcalay M, Minucci S, Pelicci PG. Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells. *Nature* 2009;457:51-6.