

IMMUNOTERAPIA CON IL PEPTIDE EGFRvIII NEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME E IN ALTRI TUMORI SOLIDI

Gaetano Finocchiaro

Unità di Biochimica e Genetica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico “Carlo Besta”, Milano

Base di partenza e razionale

L'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) è spesso amplificato e mutato in diversi tumori solidi in particolare in gliomi maligni e carcinomi dell'ovaio. Esistono varie forme mutanti di HER1/EGFR, ma la variante III (EGFRvIII) rimane sicuramente la più frequente. EGFRvIII risulta dall'eliminazione degli esoni 2-7 e dalla conseguente delezione *in-frame* di 801 paia di basi nella porzione genica codificante per il dominio extracellulare; ciò determina la mancanza del dominio di legame con il ligando e un'attivazione costitutiva del recettore, che porta ad alterazioni di trascrizione genica e traduzione proteica, tumorigenicità, inibizione dell'apoptosi, adesione, angiogenesi, aumento della motilità cellulare e, in molte linee tumorali, anche radioresistenza. EGFRvIII è considerato un ottimo potenziale target di terapia in quanto esclusivamente espresso nelle cellule tumorali.

L'espressione di EGFR è up-regolata nel 50-60% dei glioblastomi, mentre a livello clinico EGFRvIII è un fattore prognostico negativo negli astrocitomi anaplastici e nei glioblastomi che sopravvivono un anno o più. Per quanto riguarda il carcinoma ovarico l'espressione di EGFRvIII è documentata, mentre il suo ruolo nei carcinomi mammari non è definito in modo univoco. Linee cellulari di carcinoma mammario, infatti, non sembrano esprimere EGFRvIII, mentre 67% dei tumori invasivi sono positivi. Inoltre, in pazienti con carcinoma mammario l'espressione di EGFRvIII in cellule circolanti correla con lo stadio della malattia.

Diversi gruppi di ricerca hanno precedentemente studiato *in vivo* sia la vaccinazione profilattica con EGFRvIII, intesa come l'immunizzazione contro EGFRvIII e la successiva iniezione intracerebrale di cellule tumorali esprimenti EGFRvIII, sia la vaccinazione terapeutica, successiva cioè all'induzione della crescita tumorale. Sono state svolte anche diverse sperimentazioni cliniche per lo studio del potenziale terapeutico di un vaccino che riconosce in modo specifico le cellule tumorali grazie alla loro esclusiva espressione di EGFRvIII. In particolare Heimberger *et al.* Nel 2006 hanno condotto una sperimentazione su 19 pazienti affetti da GBM di prima diagnosi ed EGFRvIII positivi, dimostrando un significativo incremento di “time to tumor progression” rispetto ai 39 controlli storici ad essi confrontati (12 mesi vs 7,1; $p=0,0058$). Visti i promettenti risultati ottenuti e pubblicati in letteratura, questo progetto intende analizzare l'efficacia del trattamento con CDX-110, un vaccino prodotto dalla Celldex Therapeutics e costituito dalla sequenza di EGFRvIII coniugata a Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) come adiuvante. Lo studio vedrà l'inclusione di pazienti affetti da GBM, o tumore all'ovaio o tumore alla mammella; criterio chiave per l'inclusione nello studio sarà la positività del paziente all'espressione di EGFRvIII, dimostrata per immunostochimica. Vista l'assenza di tossicità del peptide, in questo studio per tutti i pazienti sarà considerato come endpoint primario la risposta immunologica al trattamento in analisi in termini di risposta cellulare e umorale, e come endpoint secondario il tempo alla progressione.

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

I promettenti risultati già pubblicati in letteratura sul potenziale terapeutico e l'assenza di effetti avversi significativi del trattamento con CDX-110 ci hanno spinto a selezionare degli obiettivi che indagassero maggiormente il meccanismo di azione di questo farmaco, prendendo solo inizialmente in considerazione gli aspetti di studio della tossicità.

Obiettivo generale del progetto e necessario per il suo sviluppo è l'identificazione e l'arruolamento di soggetti affetti da GBM o tumore all'ovaio o tumore alla mammella e contemporaneamente positivi per l'espressione di EGFRvIII. L'espressione di EGFRvIII sarà valutata mediante tecniche di PCR e/o immunoistochimica utilizzando anticorpi già testati dalla ditta produttrice di CDX-110, la CellDex Therapeutics, e secondo una metodica messa a punto dalla stessa.

Per quanto riguarda la parte di progetto dedicata ai pazienti affetti da GBM, l'obiettivo primario sarà inizialmente la valutazione di diverse dosi di CDX-110 in gruppi di pazienti, e, in un secondo momento, lo studio degli effetti della contemporanea somministrazione di Imiquimod. Imiquimod è un immunomodulatore che potrebbe fungere da ulteriore adiuvante con un'azione di potenziamento del trattamento. Endpoint primario della sperimentazione clinica di fase I-II sarà la risposta immunologica al vaccino in termini di risposta cellulare e umorale, mentre l'endpoint secondario sarà il tempo alla progressione tumorale (*Progression Free Survival*, PFS).

Il progetto prevede anche di studiare l'espressione di EGFRvIII in tumorosfere da GBM e adenocarcinoma mammario.

Obiettivo principale in questo caso sarà la definizione dell'importanza di EGFRvIII per il fenotipo simil-staminale (crescita di tumorosfere; tumorigenicità *in vivo*; potenziale clonale e differenziativi).

Per ciò che concerne invece il trattamento dei tumori della mammella e dell'ovaio, lo studio comincerà con la valutazione su pezzi paraffinati mediante immunoistochimica dell'espressione di EGFRvIII dei pazienti i cui campioni sono conservati nella banca di tessuti dello IEO. Per quanto riguarda i pazienti affetti da tumore al seno l'espressione di EGFRvIII sarà valutata soprattutto in quelli definiti "triplici negativi", non esprimenti cioè PgR, ER ed Erb-B2. Dopo aver identificato la tipologia di pazienti che potrebbero maggiormente beneficiare del trattamento con CDX-110 (n.=20) e dopo aver ottimizzato le tecniche per la valutazione della loro risposta immunologica (anticorpi e citotossicità), verrà proposta una sperimentazione di fase II con il farmaco di interesse. Si preferiranno pazienti con malattia assente al termine della chemioterapia adiuvante o malattia minima residua dopo un trattamento di prima linea per malattia metastatica. Anche in questo caso, la sperimentazione avrà come endpoint primario la risposta immunologica al vaccino in termini di risposta cellulare e umorale, e come endpoint secondario il tempo alla progressione.

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione del progetto Immunoterapia con il peptide EGFRvIII nel glioblastoma multiforme e in altri tumori solidi

| Proponente (<i>Cordinatore del progetto</i>) | Unità Operativa (UO) (<i>ente di appartenenza: responsabile</i>) | Gruppi di ricerca afferenti | Responsabile scientifico del gruppo |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------|
| Besta (<i>Gaetano Finocchiaro</i>) | UO1 (<i>Besta: Gaetano Finocchiaro</i>) | Besta | Gaetano Finocchiaro |
| | | Besta | Amerigo Boiardi |
| | | Besta | Renato Mantegazza |
| | | Besta | Maria Grazia Bruzzone |
| | UO2 (<i>IEO: Maria Rescigno</i>) | IEO | Maria Rescigno |
| | | IEO | Giuseppe Viale |
| | | IEO | Giuseppe Curigliano |
| | | IEO | Nicoletta Colombo |
| | | IRE | Carmine M. Carapella |
| | | IRE | Antonello Vidiri |
| | | IRE | Anna Cianciulli |
| | | Università degli studi Sapienza di Roma | Felice Giangaspero, Mario Piccoli |

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Il progetto ha due obiettivi principali: 1) studiare l'espressione di EGFRvIII (Epidermal Growth Factor Receptor variant III), una variante del recettore di EGF caratterizzata dalla delezione degli esoni 2-7 che mantiene un *frame* di lettura e crea un nuovo epitopo unicamente espresso nelle cellule neoplastiche, in diversi tumori (gliomi maligni, carcinomi ovarici, carcinomi mammari); 2) condurre uno studio clinico di fase I-II sull'immunoterapia con un peptide corrispondente alla sequenza dell'epitopo EGFRvIII, coniugato con l'adiuvante KLH (Keyhole Limpet Hemocianin), denominato CDX-110 e attualmente prodotto dall'azienda statunitense Celldex Therapeutics.

Per quanto riguarda il primo obiettivo, tutte le UO hanno fornito interessanti risultati sull'espressione di EGFRvIII in glioblastoma multiforme (GBM) (UO1 e UO3) e nel cancro al seno (BC) e all'ovaio (OC) (UO2).

Il raggiungimento del secondo obiettivo, e quindi la progettazione e conduzione di uno studio clinico, è al momento in stallo in quanto gli accordi presi con Celldex prima di presentare il progetto non sono attualmente più validi. La ditta americana è stata infatti acquistata da Pfizer che ha ora la licenza esclusiva mondiale per CDX 110, attualmente in fase II di sviluppo per il trattamento del GBM, oltre ai diritti in esclusiva per l'uso dei vaccini EGFRvIII in altre potenziali indicazioni. La possibilità di una sperimentazione con CDX110 in Italia è stata quindi improvvisamente vincolata ad un accordo con Pfizer, al momento non praticabile.

È in corso di valutazione la possibilità di sintesi del peptide da parte della ditta svizzera Bachem (www.bachem.it), che opera nel rispetto delle norme europee e in linea con le GMP. Trattandosi di una sintesi svolta per scopi di ricerca clinica, non dovrebbero presentarsi problemi di brevetto. A Bachem è possibile ordinare la sola produzione del vaccino "bulk", o anche il successivo infialamento in singole dosi pronte per la somministrazione ai pazienti; ovviamente il prezzo del servizio, nella seconda opzione, è considerevolmente più elevato. Le spese dello studio clinico possono essere completamente coperte con il finanziamento "ISS per ACC" solo nel primo caso, ordinando cioè un unico lotto di vaccino e prevedendo quindi un

infiamento in Italia presso la farmacia dell'IFO-Istituto Regina Elena di Roma secondo la *Nota per l'applicazione dell'articolo 15 del DL.vo 200/2007 in strutture ospedaliere pubbliche o ad esse equiparate, nonché in Istituti di ricovero e cura a carattere scientifico privati* della Dott.ssa A. Meneguz (luglio 2008). Dal momento che la produzione del vaccino da parte di Bachem non può includere la fase di coniugazione con KLH, è stata ipotizzata la possibilità di una sintesi esclusiva del peptide da parte della ditta svizzera e l'utilizzo di imiquimod crema (da spalmare sul sito di iniezione) come adiuvante.

Nel luglio 2009 è stata ottenuta inoltre da Bachem tutta la documentazione relativa al vaccino eventualmente prodotto (*Certificate of GMP Compliance, Manufacturing License, Specification and CMC documentation of the API, based on the EMEA guidelines CHMP/QWP/185401/2004, certificate of analysis, ecc.*) e inviato all'IFO per l'infiamento.

Su suggerimento della Dott.ssa Meneguz, verrà fatta richiesta di audizione pre-submission alla *Commissione per l'accertamento dei requisiti dei prodotti farmaceutici di nuova istituzione* dell'ISS entro il mese di novembre 2009. In questa occasione verranno discussi i diversi punti critici del progetto con particolare attenzione alla fattibilità dello studio clinico dal punto di vista regolatorio e alla definizione della documentazione da presentare all'ISS per la valutazione dello studio clinico. Visto il ritardo accumulato nelle fasi di pianificazione dello studio clinico, dovuto all'imprevedibile indisponibilità del vaccino, è stata fatta richiesta di proroga di un anno per il completamento del progetto; la proroga è stata accettata.