

RETE NAZIONALE PER STUDI CLINICI E DI STRUTTURE GMP PER LE BIOTERAPIE DEI TUMORI

Giorgio Parmiani (a), Enrico Proietti (b)

(a) *Unità Immuno-Bioterapia Tumori Solidi Fondazione S. Raffaele del Monte Tabor, Milano*

(b) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Riassunto del progetto

Il progetto comprende 5 Work Package (WP) tra loro integrati con la partecipazione di 19 Unità di Ricerca appartenenti a varie istituzioni private e pubbliche italiane interessate alle bioterapie e immunoterapie dei tumori.

Il primo obiettivo era quello della promozione della comunicazione sulle caratteristiche della ricerca traslazionale in campo delle terapie immunobiologiche contro il cancro nel tentativo di aumentare la interazione tra ricercatori di base e ricercatori clinici. Questo obiettivo viene perseguito attraverso l'organizzazione in diverse città italiane (Milano, Genova, Siena, Bari) di workshop e master dedicati. Inoltre si elaboreranno documenti consenso da proporre alla comunità scientifica, alle agenzie regolatorie, alla industria farmaceutica per facilitare e promuovere le terapie immunobiologiche le cui caratteristiche non sempre rientrano in quelle dei farmaci chemioterapici. Il progetto vuole anche favorire l'attivazione di nuovi studi pre-clinici e clinici di *proof-of-concept* promossi dai gruppi coinvolti nel progetto anche in collaborazione con altre reti di gruppi di ricerca quali il NIBIT (Network Italiano di Bioterapie contro il Tumore) e anche network europei come quello tedesco (CIMT) e scandinavo.

Un altro obiettivo è la costruzione di una rete per la standardizzazione di metodiche per il monitoraggio immunobiologico e l'identificazione di bio-marcatori della risposta alla bioterapia dei tumori che ha coinvolto diverse UO nel tentativo di creare una vera rete di laboratori esperti nella valutazione dei meccanismi che sono alla base di risposte o non risposte nei pazienti che ricevono bioterapie. Il progetto valuterà anche il problema dei laboratori GMP necessari nel nostro paese per la terapia biologica cellulare perché molti di questi laboratori devono ancora essere autorizzati e la loro esistenza dipenderà anche dall'incremento delle ricerche cliniche nel settore della immunobioterapia. Infatti l'introduzione della Direttiva europea 2001/20/CE che estende l'obbligatorietà della produzione in GMP anche ai prodotti medicinali sperimentali ha portato ad una riduzione consistente del numero di sperimentazioni basate sulla bioterapia dei tumori. Saranno quindi organizzati, in collaborazione con AIFA, corsi di formazione per giovani operatori e ricercatori coinvolti nella attività di laboratori GMP che comprende anche brevi stage in aziende farmaceutiche/biotecnologiche nazionali ed europee.

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Nel terzo anno di attività tutte le UO coinvolte nello sviluppo dei diversi WP hanno contribuito allo sviluppo del progetto e hanno collaborato attivamente alle iniziative di seguito riassunte.

Nel WP1 la UO1 (M. Maio) ha attivato differenti iniziative in collaborazione con altre UO afferenti al Progetto ed al Network Italiano per la Bioterapia dei Tumori (NIBIT): 1) è stato arricchito il sito web del NIBIT (www.nibit.org) attraverso lo sviluppo della versione in lingua inglese; 2) è proseguita la distribuzione a livello nazionale della versione cartacea della Guida “Utilizzo dei vaccini in oncologia” indirizzata ai pazienti affetti da neoplasia ed agli operatori sanitari. La Guida è scaricabile dal sito web del NIBIT; 3) È stato attivato un programma educativo in collaborazione con NIBIT che prevede quattro “Corsi di formazione sulla immunobioterapia dei tumori umani” a valenza regionale, di cui due già tenuti a Milano e Siena, mentre altri due eventi si terranno a Genova e Palermo in dicembre 2010. Insieme alla UO11 (A. Meneguz), la UO12 (P. Ascierto) hanno organizzato a Siena nel giugno 2010 un master con due giornate di lavoro, la prima centrata su anticorpi terapeutici e la seconda sugli aspetti regolatori delle bioterapie.

Dati recenti mostrano come sia indispensabile effettuare un’analisi dei pazienti che ricevono bioterapia per evidenziare quali siano i meccanismi d’azione ed identificare fattori predittivi di risposta clinica. A questo scopo nell’ambito del WP2, la UO3 (G. Parmiani) e UO4 (C. Pintus) è stato organizzato il meeting internazionale su Combined Biotherapy of Cancer a Milano (Istituto San Raffaele) nell’aprile 2010 con la presenza di 135 partecipanti di cui 117 italiani e altri di nazioni europee o USA. Inoltre la UO3 (G. Parmiani) coordinerà il monitoraggio immunologico di studi clinici di terapia con anticorpi immunomodulanti (es. ipilimumab) che vede coinvolti anche altre UO del progetto 2 (UO1, M. Maio; UO5, L. Rivoltini).

Nell’ambito del WP3, si è promossa l’ Organizzazione di una Rete Nazionale di centri di eccellenza capaci di monitorare le reattività indotte dal trattamento con bioterapia e/o chemio-immunoterapia in pazienti affetti da melanoma metastatico. Il laboratorio della UO5 (L. Rivoltini) effettuerà la analisi della frequenza e funzione di cellule T regolatorie e mieloidi soppressorie del sangue periferico e del sito tumorale prima ed a diversi tempi del trattamento. Inoltre, insieme alla UO5 (L. Rivoltini), la UO6 (P. Nisticò) ha contribuito a stabilire una rete interistituzionale per definire linee guida per il monitoraggio dei pazienti. Nell’ambito di una migliore analisi funzionale di linfociti, la UO7 (M. Rescigno) ha messo a punto nuove tecniche sia di ristimolazione che di analisi con tetrameri di linfociti circolanti e su cellule T tumore-specifiche in situ su tessuto congelato oltre allo screening di anticorpi per monitoraggio dei pazienti, mentre la UO8 (E. Proietti) ha messo a punto e iniziato ad utilizzare in pazienti con melanoma, trattati con chemio-immunoterapia, un metodo di analisi multiparametrica della risposta immune specifica contro il tumore. L’UO9 (M.P. Protti) ha studiato la natura dell’infiltrato tumorale linfocitario nei pazienti con carcinoma del pancreas con una analisi focalizzata su linfociti CD4Th. Queste analisi condotte da più UO (UO5-UO10) sono integrabili e definiscono un sistema innovativo di monitoraggio dei pazienti in trattamento con immunobioterapie. La UO10 (M. Maio) ha creato una banca biologica con sieri e plasma, prelevati prima del trattamento ed a varie fasi della terapia, di pazienti neoplastici inseriti in diversi protocolli di immunoterapia. Questa seroteca sarà caratterizzata per la presenza ed attività funzionale (*Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity*, ADCC, *Complement Dependent Cytotoxicity* CDC) di anticorpi circolanti anti-tumore indotti o iper-regolati dal trattamento. È stata effettuata una valutazione iniziale della risposta anticorpale contro antigeni tumorali (*Tumor-Associated Antigen*, TAA) in pazienti con melanoma lungo-sopravvivenenti, sottoposti a immunoterapia, che verrà estesa per definire la potenziale associazione tra risposta umorale anti-TAA e intervallo di sopravvivenza. Sono state attivate le procedure per la messa a punto della tecnologia dei protoarray per valutare la presenza qualitativa e quantitativa di anticorpi circolanti diretti contro circa 9000 proteine umane.

Nell’ambito del WP5 si è continuato a perseguire la realizzazione di una rete di laboratori GMP per la produzione di prodotti medicinali avanzati e la verifica della loro operatività (UO13, G. Migliaccio; e UO14, M.C. Galli). Con la cooperazione delle strutture di riferimento, già identificate nel corso dell’anno precedente, è in corso di valutazione la standardizzazione dei metodi e procedure

di questi laboratori. La UO15 (R. Ridolfi) ha delineato una possibile rete di Cell Factories a livello italiano tenendo conto della distribuzione disomogenea delle strutture sul territorio nazionale. Tale informazione consentirebbe una ottimizzazione dei costi, e una condivisione delle attività di convalida per conferire un requisito di qualità alle strutture stesse. Il modello “Hub and Spoke” potrebbe risultare il sistema di gestione più accettabile. Si prevede di discutere questi dati in una ultima riunione Operativa da organizzare nella primavera del 2011 per giungere ad un disegno conclusivo dell’ipotesi di rete. UO17 (P. Rebulla). Durante il terzo anno si sono valutati tempi e temperature di trasporto di sacche di sangue placentare prelevate presso sale parto in Lombardia e nella provincia di Trento e consegnate alla Milano Cord Blood Bank. I risultati sono di grande utilità pratica e verranno utilizzati per documentare la qualità dei trasporti ed eventualmente migliorare la procedura. La UO18 (R. Maccario) ha definito il programma di controllo qualità per valutare il rischio della trasformazione neoplastica e cioè morfologia e tasso di replicazione, immuno-fenotipo, cariotipo e CGH array, telomerasi. UO19 (C. Rozera) ha studiato l’induzione di apoptosi da UV a diversi tempi di esposizione per valutare sicurezza e qualità della inattivazione fisica di cellule di melanomi umani. Si è potuto così dimostrare che a 48 ore nessuna cellula tumorale sopravvive.

L’insieme delle attività condotte nel terzo anno del progetto dalle diverse UO costituisce un importante crescita delle conoscenze scientifiche e organizzative nell’area delle terapie biologiche dei tumori e pone la ricerca italiana del settore a livello delle altre nazioni europee ed extra-europee.

Articolazione del progetto

L’articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione della Rete nazionale per studi clinici e di strutture GMP per le bioterapie dei tumori

Proponente (<i>Cordinatori della rete</i>)	Ente di appartenenza dell’Unità Operativa	Responsabile scientifico dell’Unità Operativa
ISS (<i>Enrico Proietti</i>) HSR (<i>Giorgio Parmiani</i>)	UO1 - Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena	Michele Maio
	UO2 - ISS	Maria Ferrantini
	UO3 – HSR	Giorgio Parmiani
	UO4 – AIFA	Cristina Pintus
	UO5 – INT	Licia Rivoltini
	UO6 - IRE	Paola Nisticò
	UO7 – IEO	Maria Rescigno
	UO8 – ISS	Enrico Proietti
	UO9 – HSR	Maria Pia Protti
	UO10 - CRO	Michele Maio
	UO11 - ISS	Annarita Meneguz
	UO12 - Pascale	Paolo Ascierto
	UO13 – ISS	Giovanni Migliaccio
	UO14 - ISS	Maria Cristina Galli
	UO15 – IRST	Ruggero Ridolfi
	UO16 - ISTGE	Barbara Parodi
	UO17 - Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena	Paolo Rebulla
	UO18 - San Matteo	Rita Maccario
	UO19 - ISS	Carmen Rozera

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il progetto ha prodotto le seguenti pubblicazioni:

1. Avanzini MA, Bernardo ME, Cometa AM, Perotti C, Zaffaroni N, Novara F, Visai L, Moretta A, Del Fante C, Villa R, Ball LM, Fibbe WE, Maccario R, Locatelli F. Generation of mesenchymal stromal cells in the presence of platelet lysate: a phenotypic and functional comparison of umbilical cord blood-and bone marrow-derived progenitors. *Haematologica* 2009;94:1649-60.
2. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, *et al.* Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term *in vitro* culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 2007;67:9142.
3. Butterfield L, *et al.* Recommendations from the iSBTc/FDA/NCI Workshop on Immunotherapy Biomarkers. *J Transl Med* (in corso di stampa).
4. Camisaschi C, Casati C, Rini F, *et al.* LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *J Immunol* 2010;184:6545-51.
5. Cappello P, Tomaino B, Chiarle R, *et al.* An integrated humoral and cellular response is elicited in pancreatic cancer by alpha-enolase, a novel pancreatic ductal adenocarcinoma-associated antigen. *Int J Cancer* 2009;125:639-48.
6. Comoli P, Basso S, Zecca M, *et al.* Preemptive therapy of EBV-related lymphoproliferative disease after pediatric haploidentical stem cell transplantation. *Am J Transplant* 2007;7:1648.
7. Daudt L, Maccario R, Locatelli F, *et al.* Interleukin-15 favors the expansion of central memory CD8+ T cells in *ex vivo* generated, antileukemia human cytotoxic T lymphocyte lines. *J Immunother* 2008;31:385.
8. Di Giacomo AM, Danielli R, Guidoboni M, Calabrò L, Carlucci D, Miracco C, Volterrani L, Mazzei MA, Biagioli M, Altomonte M, Maio M. Therapeutic efficacy of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with metastatic melanoma unresponsive to prior systemic treatments: clinical and immunological evidence from three patient cases. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:1297-306.
9. Fox BA, Schendel D, Butterfield L, Masucci G, Kawakami Y, Shiku H, Grizzi F, Pawelec G, Characiejus D, Nicolini A, Maccalli C, *et al.* Defining the critical hurdles in cancer immunotherapy. *J Transl Med* (in corso di stampa)
10. Huber V, De Milito A, Harguindey S, *et al.* Proton dynamics in cancer. *J Transl Med* 2010;8:57.
11. Lattanzi L, Rozera C, Marescotti D, *et al.* IFN-alfa boosts epitope cross-presentation by dendritic cells via modulation of proteasome activity. *Immunobiology* 2010 Oct 21 (online prima della stampa)
12. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Maio M, Rivoltini L, Fais S. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009;4:e5219.
13. Maio M, Fonsatti E, Burigo A, Parmiani G. The Italian Network for Tumor Biotherapy (NIBIT). Sharing visions, goals and efforts at European level. *Tumori* 2008;94:179-81.
14. Maio M, Nicolay HJ, Ascierto PA, Belardelli F, Camerini R, Colombo MP, Queirolo P, Ridolfi R, Russo V, Fonsatti E, Parmiani G; NIBIT. Seventh annual meeting of the Italian Network for Tumor Biotherapy (NIBIT), Siena, 1-3 October 2009. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1895-901.
15. Maio M, Nicolay HJ, Ascierto PA, Belardelli F, Camerini R, Colombo MP, Queirolo P, Ridolfi R, Russo V, Fonsatti E, Parmiani G; NIBIT. Sixth annual meeting of the Italian network for

- tumor biotherapy (NIBIT), Siena, 16-18 October 2008. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:963-9.
16. Maio M, Nicolay HJM, Ascierto P, Belardelli F, Camerini R, Colombo MP, Queirolo P, Ridolfi R, Russo V, Anzalone L, Fonsatti E, Parmiani G. The Italian Network for Tumor Biotherapy (NIBIT): getting together to push the field forward. *Journal of Translational Medicine* 2008;6:8.
 17. Montagna D, Maccario R, Locatelli F. Expansion of antileukaemia CTL lines and clones for adoptive cell therapy in paediatric patients given allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet* 2008;35:389.
 18. Nisticò P, Capone I, Palermo B, *et al.* Chemotherapy enhances vaccine-induced antitumor immunity in melanoma patients. *Int J Cancer* 2009;124:130-9.
 19. Palermo B, Del Bello D, Sottini A, Serana F, Ghidini C, Gualtieri N, Ferraresi V, Catricalà C, Belardelli F, Proietti E, Natali PG, Imberti L, Nisticò P. Dacarbazine treatment before peptide vaccination enlarges T-cell repertoire diversity of melan-a-specific, tumor-reactive CTL in melanoma patients. *Cancer Research* 2010;70:7084-92.
 20. Saccheri F, Pozzi C, Avogadri F, *et al.* Bacteria-induced gap junctions in tumors favor antigen cross-presentation and antitumor immunity. *Sci Transl Med* 2010;2:44ra57.
 21. Serana F, Sottini A, Caimi L, *et al.* Identification of a public CDR3 motif and a biased utilization of T-cell receptor V beta and J beta chains in HLA-A2/Melan-A-specific T-cell clonotypes of melanoma patients. *J Transl Med* 2009;24:7:21.
 22. Tassi E, Gavazzi F, Albarello L, Senyukov V, Longhi R, Dellabona P, Doglioni C, Braga M, Di Carlo V, Protti MP. Carcinoembryonic antigen-specific but not antiviral CD4+ T cell immunity is impaired in pancreatic carcinoma patients. *J Immunology* 2008;181:6595-603.
 23. Tomaino B, Cappello P, Capello M, *et al.* Circulating autoantibodies to Phosphorylated alpha-Enolase are a Hallmark of pancreatic. *Cancer J Proteome Res* 2011;10:105-12.
 24. Turin I, Pedrazzoli P, Tullio C, *et al.* GMP production of anti-tumor cytotoxic T-cell lines for adoptive T-cell therapy in patients with solid neoplasia. *Cytotherapy* 2007;9:499.