

SVILUPPO DI NUOVI FARMACI CAPACI DI ALTERARE IL MICROAMBIENTE TUMORALE E RIPRISTINARE LA RISPOSTA IMMUNE ANTI-TUMORALE

Vincenzo Bronte
Istituto Oncologico Veneto (IRCCS), Padova

Base di partenza e razionale

Da tempo è nota la connessione fra infiammazione e cancro. Studi epidemiologici indicano che l'infiammazione cronica predispone verso forme neoplastiche a carico del colon, prostata, fegato e l'uso di farmaci antinfiammatori non steroidei può conferire una protezione all'insorgenza dei tumori.

La comunicazione tra tumori e cellule infiammatorie avviene attraverso un circuito di mediatori pro-infiammatori comprendenti citochine, chemochine e metaboliti; questa risposta pro-infiammatoria può essere innescata e mantenuta, nelle stesse cellule tumorali, dall'attivazione di alcuni oncogeni.

Abbiamo di recente dimostrato che il tessuto tumorale è infiltrato da linfociti T citotossici differenziati che tuttavia non controllano la crescita tumorale e non rispondono ai classici stimoli di attivazione a causa degli elevati livelli di perossinitriti nell'ambiente tumorale, la cui produzione dipende dall'attività di due enzimi, arginasi (ARG) e ossido nitrico sintetasi (NOS), entrambi iper-espressi in diversi tumori umani, sia all'interno delle stesse cellule neoplastiche che nell'infiltrato mielomonocitario. Inibendo l'attività di ARG e NOS è stato possibile recuperare la funzionalità dei linfociti tumore-specifici, sia nel tessuto tumorale umano sia in modelli tumorali murini (colon, mammella, prostata). Questo studio ha, quindi, identificato un nuovo e cruciale meccanismo di immunosoppressione mediato dal tumore e apre la strada a nuove strategie terapeutiche. Abbiamo quindi valutato una nuova classe di farmaci in grado di influire sul metabolismo dell'arginina che hanno mostrato profili di sicurezza soddisfacenti nei trials clinici di fase I-II. Al fine di ridurre la tossicità gastrointestinale dei convenzionali farmaci anti-infiammatori non steroidei, questi ultimi sono stati coniugati con un gruppo nitro (NO). La somministrazione orale di uno di questi nuovi composti, la nitro-aspirina, ha normalizzato lo stato immunitario dell'ospite portatore di tumore, aumentando il numero e la funzionalità di linfociti T tumore-antigeni specifici, e incrementando l'efficacia terapeutica della vaccinazione antitumorale.

Questi studi hanno mostrato, per la prima volta, che un approccio farmacologico è in grado d'interferire con i meccanismi usati dai tumori per sopprimere i linfociti T, rimuovere il blocco che li rende inattivi e ripristinare la loro capacità di reagire agli antigeni tumorali. Sulla base della nostra scoperta, riteniamo quindi che farmaci in grado di controllare ARG e/o NOS possano essere utili come adiuvanti in approcci immunoterapeutici contro il cancro, in quanto capaci di ricreare un ambiente adatto per l'attività del sistema immunitario. La nitroaspirina, tuttavia, ha mostrato alcuni limiti che non consentono di pensare ad un suo trasferimento clinico: non è in grado, ad esempio, di correggere la mancata risposta dei linfociti T umani infiltranti il tumore prostatico in organo-culture *in vitro*. Abbiamo sviluppato nuove piccole molecole in grado di interferire con l'attività degli enzimi indicati in precedenza e recuperare la funzionalità dei linfociti tumore-specifici *in vitro*. Dopo uno screening iniziale, almeno due

nuove molecole che hanno mostrato proprietà anti-immunosoppressive sono state testate in esperimenti con colture d'organo prostatiche umane. È interessante notare come, in contrasto alla NO-aspirina, che era inefficace sui tessuti neoplastici umani, almeno due dei nuovi composti siano risultati attivi anche in colture d'organo di cancro della prostata.

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Lo scopo principale del presente progetto è quello di definire le attività biologiche, i meccanismi d'azione e le possibili sinergie fra nuove molecole di sintesi in grado di alterare lo stato infiammatorio mantenuto dalla crescita/progressione neoplastica e responsabile dell'inibizione della risposta antitumorale dei linfociti T tumore-specifici. In particolare, intendiamo valutare estesamente l'efficacia *in vivo* e gli eventuali effetti collaterali di queste nuove molecole immunomodulatrici, da sole o in combinazione con farmaci attivi su oncogeni proinfiammatori. L'obiettivo traslazionale è quello di avviare i farmaci più promettenti alla sperimentazione clinica entro 3 anni, un obiettivo alla portata dei gruppi partecipanti. Questo studio potrebbe definire una nuova classe di adiuvanti specifici per l'immunoterapia contro il cancro, un'esigenza avvertita dalla comunità scientifica internazionale come fondamentale per traghettare l'immunoterapia verso l'applicazione clinica. Accanto a questi composti, intendiamo valutare l'azione di inibitori di oncogeni studiati dai gruppi afferenti all'Istituto Superiore di Oncologia (ISO), con lo scopo di valutare se, alterando programmi trascrizionali controllati da oncogeni, sia possibile influire sullo stato infiammatorio tumore-associato ed esplorare possibili sinergie tra questi nuovi composti. L'obiettivo principale si articola in una serie di obiettivi secondari definiti di seguito:

- Obiettivo 1. Progettazione, sintesi e modulazione strutturale di nuovi farmaci NO-donatori e loro caratterizzazione chimico-fisica e funzionale sia *in vitro* che *in vivo*
 - Azione 1a. Valutazione dell'azione di farmaci NO-donatori sui meccanismi soppressori indotti in modelli sperimentali murini di crescita neoplastica.
 - Azione 1b. Valutazione dell'azione di farmaci NO-donatori sull'attività di linfociti T infiltranti il tumore in colture d'organo di tumori umani (prostata e colon).
 - Azione 1c. Caratterizzazione delle modifiche fenotipiche e funzionali apportate da farmaci NO-donatori a popolazioni cellulari umane e murine appartenenti all'immunità innata e acquisita.
 - Azione 1d. Analisi dell'azione di farmaci NO-donatori sull'angiogenesi tumore-indotta e sulla permeabilità dei vasi tumorali a proteine plasmatiche e cellule infiammatorie.
- Obiettivo 2. Nuove terapie biologiche integrate: studi *in vitro* e *in vivo*
 - Azione 2a. Valutazione in colture tumorali d'organo di inibitori di oncogeni: studio dell'azione sul microambiente infiammatorio tumorale.
 - Azione 2b. Studio di inibitori sintetici di oncogeni in associazione con farmaci NO-donatori: analisi di potenziali effetti sinergici *in vitro* e in modelli tumorali sperimentali.

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Scopo principale di questo studio è la progettazione, sintesi e modulazione strutturale di nuovi farmaci capaci di modulare la risposta immune nel microambiente tumorale. In particolare, abbiamo rivolto la nostra attenzione ad alcuni composti leader, con proprietà di contrasto dell'azione immunosoppressiva esercitata dai tumori, che possano essere proposti come candidati per successive applicazioni cliniche.

Le molecole sintetizzate portano un gruppo NO-donatore sullo *scaffold* dell'acido acetilsalicilico (classe delle "NO-donor aspirins"), e si differenziano tra loro per differenziate caratteristiche di NO-rilascio.

Fino ad oggi sono stati sottoposti a screening 78 composti differenti. Sono stati eseguiti saggi di proliferazione cellulare e di valutazione delle funzioni effettrici dei linfociti T citotossici *in vitro* e *in vivo*. Lo scopo di questi esperimenti è stato quello di valutare la capacità di ripristino delle funzioni citolitiche dei linfociti T CD8+ in condizioni di immunosoppressione indotte da cellule mieloidi soppressorie murine (MDSC).

Abbiamo messo a punto un iter di screening a tappe separate e progressive che prevedeva la valutazione iniziale della capacità dei composti di ripristinare la proliferazione indotta dall'antigene nei linfociti T citotossici, per poi proseguire con saggi di ripristino delle funzioni citolitiche in condizioni di bassa o elevata immunosoppressione. Fino ad oggi, dei 16 composti risultati efficaci in proliferazione 10 sono stati in grado di ripristinare le funzioni effettrici dei linfociti T CD8+ in condizione di forte immunosoppressione. Successivamente i composti candidati sono stati sottoposti a prove di stabilità in ambiente acido, solubilità in un veicolo non tossico compatibile con la somministrazione *in vivo* e assorbimento mediante dosaggio ematico del composto somministrato in animali sani. Grazie a queste informazioni abbiamo selezionato, per gli esperimenti *in vivo*, due composti principali: AT38 e AT27. I composti scelti sono stati somministrati per valutare la capacità di ripristinare nel topo portatore di tumore la risposta tumore-specifica indotta dalla vaccinazione. Nessuno dei due composti è riuscito a normalizzare la risposta immune in animali con colon-carcinoma. Inaspettatamente, infatti, questi composti hanno mostrato un'azione negativa, dose-dipendente, sulla capacità dei linfociti T di topi normali di rispondere ad uno stimolo antigenico.

Tuttavia, AT38 è stato in grado di ridurre significativamente la produzione intratumorale di perossinitriti, uno degli obiettivi prefissati dal progetto (vedi di seguito) e ripristinare l'attivazione dei linfociti T intratumorali in organoculture di cancro prostatico umano. Abbiamo, quindi, avviato uno studio di farmaco-modulazione dei sopra citati farmaci lead, attraverso appropriate modifiche strutturali, al fine di individuare quale sia la porzione induttrice di attività anti-proliferativa sui linfociti T e gli eventuali modulatori dell'attività medesima. Questa seconda categoria di composti sarà oggetto di studio nel secondo anno del progetto. Questi problemi hanno ritardato la presentazione di un brevetto che intendiamo, comunque, conseguire entro i primi mesi del 2009.

Un interessante risvolto di queste ricerche ha riguardato le interazioni tra specie reattive del nitrogeno, come i perossinitriti, e le chemochine intratumorali. La chemochina CCL2 è in grado di agire come chemoattraente per i linfociti T citotossici (i quali sopprimono la crescita tumorale) e per le MDSC (che sopprimono, invece, la risposta antitumorale e favoriscono lo sviluppo del tumore).

I dati sperimentali hanno dimostrato che dopo trattamento con perossinitriti, la chemochina CCL2 perde la capacità di attrarre i linfociti T, mentre può ancora reclutare MDSC. Per verificare che l'incapacità dei linfociti di infiltrare la massa tumorale è correlata alla presenza di

perossinitriti nel microambiente, è stato utilizzato il farmaco AT38, di cui si è detto sopra. Il farmaco è stato somministrato per 8 giorni a topi precedentemente inoculati con il colon carcinoma C26GM. I dati indicano che il farmaco AT38 è in grado di ridurre la produzione di perossinitriti nel microambiente tumorale e di incrementare, in maniera dose-dipendente, l'afflusso di linfociti T nel tumore stesso. Questi promettenti risultati saranno oggetto di ulteriori studi in cui il trasferimento adottivo di linfociti T anti-tumoralis sarà abbinato alla somministrazione di AT38 nei giorni che precedono il trasferimento adottivo, un protocollo che dovrebbe minimizzare gli effetti secondari del farmaco NO-donatore.

AT38 sarà anche oggetto di studio delle altre Unità che hanno messo a punto dei test di permeabilità *in vitro* e *in vivo* con cui saggiare l'azione dei nuovi composti NO-donatori sulla vascolatura intratumorale. Diversi sistemi di analisi quantitativa e morfologica sono stati perfezionati e sono adesso disponibili per lo studio di quei composti NO-donatori che sembrano essere in grado di modificare le risposte vascolari e la migrazione dei linfociti T.

Inoltre, si è messa a punto una tecnica avanzata al microscopio confocale per poter seguire *in vivo* le modificazioni delle giunzioni intercellulari nei tumori. Avremo anche a disposizione una serie di marcatori surrogati di attività anti-angiogenica.

Infine, analisi citofluorimetriche avanzate condotte in collaborazione tra le diverse Unità del progetto, hanno permesso di delineare il profilo di marcatori delle cellule MDSC umane e di valutarne, in via preliminare, le variazioni in pazienti con diverse neoplasie, inclusi soggetti affetti da carcinoma prostatico.

Nell'ottica di gettare le basi per possibili terapie combinate, alcuni gruppi hanno proseguito nel loro sforzo di identificare nuove molecole che agiscano su vie di segnalazione chiave del processo neoplastico.

In accordo con i risultati esposti finora, particolare attenzione è stata rivolta ai recettori delle chemochine; in particolare, l'attività di CXCR2 e CXCR4 è stata bloccata utilizzando inibitori farmacologici e RNA interference.

La sequenza Int è stata utilizzata per trasportare all'interno del nucleo cellulare minianticorpi scFv diretti contro il dominio aminotermine di c-Myc ottenendo un'attività antiproliferativa in linee cellulari tumorali, in cui c-Myc è sovraespresso.

Inoltre, è stato approfondito lo studio del peptide 072RB, un inibitore di Bcl-XL. Quando somministrato endovena, 072RB ha rallentato/inibito in modo significativo lo sviluppo delle cellule leucemiche nei topi trattati, rispetto al controllo.

Un potenziale bersaglio nel secondo anno degli studi sarà rappresentato dalla subunità p50 NF- κ B, un elemento chiave della trascrizione genica di enzimi che portano alla produzione di perossinitriti. Prove *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che l'assenza di p50 NF- κ B altera significativamente il fenotipo protumorale di MDSC, ripristinando funzioni antitumorali che sono assenti. Tali osservazioni sono state parzialmente convalidate anche in tumori umani (carcinoma ovarico e carcinoma epatocellulare).

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione del progetto Sviluppo di nuovi farmaci capaci di alterare il microambiente tumorale e ripristinare la risposta immune anti-tumorale

Proponente (Coordinatore del progetto)	UO (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
IOV (Vincenzo Bronte)	UO1 (IOV: Vincenzo Bronte)	IOV	Vincenzo Bronte
		Università Degli Studi di Torino	Alberto Gasco
		Istituto Superiore di Oncologia	Giancarlo Vecchio
		Istituto Superiore di Oncologia, Univ. degli Studi di Genova	Silvio Parodi
	UO2 (IRCCS Fondazione S. Lucia: Luca Battistini)	IRCCS Fondazione S. Lucia.,	Luca Battistini
		IRCCS Fondazione S. Lucia	Giovanna Borsellino
	UO3 (Humanitas: Antonella Viola)	Humanitas	Antonella Viola
		Humanitas	Antonio Sica
		IFOM	Elisabetta Dejana
		IEO	Francesco Bertolini

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Agliano A, Martin-Padura I, Marighetti P, Mancuso P, Rabascio C, Pruneri G, Shultz LD, Bertolini F. Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. *Int J Cancer* 2008;123:2222-7.
2. Avignolo C, Bagnasco L, Biasotti B, Melchiori A, Tomati V, Bauer I, Salis A, Chiossone L, Mingari MC, Orecchia P, Carnemolla B, Neri D, Zardi L, Parodi S. Internalization via Antennapedia Protein Transduction Domain (PTD) of a scFv antibody toward c-Myc protein *FASEB J* 2008;2:1-9.
3. Bertolini F. Chemotherapy and the tumor microenvironment: the contribution of circulating endothelial cells. *Cancer Metastasis Review* 2008;27:95-101.
4. Birdsey GM, Dryden NH, Amsellem V, Gebhardt F, Sahnun K, Haskard DO, Dejana E, Mason JC, Randi AM. The transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. *Blood* 2008;111(7):3498-506.
5. Bronte V, Mocellin S. Suppressive influences in the immune response to cancer. *J Immunother* 2008 (in corso di stampa).
6. Castellone MD, De Falco V, Rao DM, Bellelli R, Fusco A, Gutkind JS, Santoro M. The β -catenin Axis Integrates Multiple Signals Downstream From RET/PTC and Leads to Cell Proliferation. *Cancer Res* (in corso di stampa).
7. Cermenati S, Moleri S, Cimbri S, Corti P, Del Giacco L, Amodeo R, Dejana E, Koopman P, Cotelli F, Beltrame M. Sox18 and Sox7 play redundant roles in vascular development. *Blood* 2008;111:2657-66.
8. Contento RL, Molon B, Boullaran C, Pozzan T, Manes S, Marullo S, Viola A. CXCR4-CCR5: a couple modulating T-cell functions. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2008;105:10101-10106.
9. Dellapasqua S, Bertolini F, Bagnardi V, Campagnoli E, Scarano E, Torrisi R, Shaked Y, Mancuso P, Goldhirsch A, Rocca A, Pietri E, Colleoni M. Metronomic cyclophosphamide and

- capecitabine combined with bevacizumab in advanced breast cancer: clinical and biological activity. *J Clin Oncol* 2008;26:4899-905.
10. Dolcetti L, Marigo I, Mantelli B, Peranzoni E, Zanovello P, Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation. *Cancer Lett* 2008;267(2):216-25.
 11. Gri G, Piconese S, Frossi B, Manfroi V, Merluzzi S, Tripodo C, Viola A., Odom S., Rivera J, Colombo MP, Pucillo CE. 2008. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 2008;29(5):771-81.
 12. Kerbel RS, Benezra R, Lyden DC, Hattori K, Heissig B, Nolan D, Mittal V, Bertolini F, Rafii S. Endothelial progenitors are cellular hubs essential for neo-angiogenesis of certain aggressive tumors and metastatic transition. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 2008;105(34):E54; author reply E55.
 13. Li H, Raia V, Bertolini F, Price DK, Figg WD. Circulating endothelial cells as a therapeutic marker for thalidomide in combined therapy with chemotherapy drugs in a human prostate cancer model. *BJU International* 2008;101:884-8.
 14. Lodyga M, De Falco V, Bai XH, Kapus A, Melillo RM, Santoro M, Liu M. XB130, a tissue-specific adaptor protein that couples the RET/PTC oncogenic kinase to PI3-K pathway. *Oncogene* (in corso di stampa).
 15. Mandruzzato S, Solito S, Falisi E, Francescato S, Chiarion-Sileni V, Mocellin S, Zanon A, Rossi CR, Nitti D, Bronte V, Zanovello P. IL4R+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients, 2008, inviato per la pubblicazione.
 16. Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P, and Bronte V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid-derived suppressor cells. *Immunol Rev* 2008;222:162-79.
 17. Martin-Padura I, Bertolini F. Circulating endothelial cells in cancer: Towards marker and target identification. *Current Pharmaceutical Design* 2008;14(36):3780-9.
 18. Mennuni C, Ugel S, Mori F, Cipriani B, Iezzi M, Pannellini T, Lazzaro D, Ciliberto G, La Monica N, Zanovello P, Bronte V, Scarselli E. Preventive vaccination with telomerase controls tumor growth in genetically engineered and carcinogen-induced mouse models of cancer. *Cancer Res* 2008;68(23):9865-74.
 19. Peranzoni E, Marigo I, Dolcetti L, Ugel S, Sonda N, Taschin E, Mantelli B, Bronte V, Zanovello P. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology* 2008;212:795-812.
 20. Ponassi R, Biasotti B., Tomati V, Bruno S, Poggi A, Malacarne D, Cimoli G, Salis A, Pozzi S, Miglino M, Damonte G, Cozzini P, Spyraiki F, Campanini B, Bagnasco L, Castagnino N, Tortolina L, Mumot A, Frassoni F, Daga A, Cilli M, Piccardi F, Monfardini I, Perugini M, Zoppoli G, D'Arrigo C, Pesenti R, Parodi S. A novel Bim-BH3-derived Bcl-XL inhibitor *Cell Cycle* 2008;7(20):1-14.
 21. Rudini N, Felici A, Giampietro C, Lampugnani MG, Corada M, Swirsding K, Garrè M, Liebner S, Letarte M, ten Dijke P and Dejana E. VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J* 2008;27(7):993-1004.
 22. Shaked Y, Henke E, Roodhart J, Mancuso P, Langenberg M, Colleoni M, Daenen LG, Man S, Xu P, Emmenegger U, Tang T, Zhu Z, Witte L, Strieter RM, Bertolini F, Voest E, Benezra R, Kerbel RS. Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: Implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell* 2008;14:263-1273.
 23. Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, Potente M, Daly C, Dimmeler S, Dejana E. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol* 2008;10(8):923-34

24. Turowski P, Martinelli R, Crawford R, Wateridge D, Papageorgiou AP, Lampugnani MG, Gamp AC, Vestweber D, Adamson P, Dejana E, Greenwood J. Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. *J Cell Sci* 2008;121:29-37.
25. Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2008;48:171-197.
26. Viola A, Molon B, Contento RL. Chemokines: coded messages for T cell missions. *Frontiers in Biosciences* 2008;13:6341-53.