

TERAPIE BIOLOGICHE COMBinate E PERSONALIZZATE NEI TUMORI SOLIDI: STUDI DI FASE I-II

Giorgio Parmiani
Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor, Milano

Base di partenza e razionale

Precedenti studi hanno dimostrato che l'immunoterapia, mentre induce frequenti risposte biologiche nei pazienti trattati, raramente influenza la storia naturale del tumore. Esistono altri approcci terapeutici che, pur avendo da soli un'efficacia limitata, hanno la potenzialità di amplificare la funzione del sistema immunitario. Quindi proponiamo trials di fase I-II in cui la vaccinoterapia viene combinata con questi trattamenti, prevalentemente biologici che, utilizzando meccanismi rivelati da precedenti studi pre-clinici e clinici, possono migliorare la risposta immunologica e clinica in pazienti con neoplasie farmaco-resistenti. Inoltre verranno introdotte nei protocolli manipolazioni destinate a inibire fattori che recentemente si sono dimostrati capaci di ridurre la risposta immune alle terapie immuno-biologiche. Tra questi fattori i più importanti sono la presenza di linfociti T regolatori (Treg) e le cellule mieloidi soppressive (*Myeloid Suppressive Cells*, MSC). Infatti, cercheremo di aumentare tale risposta somministrando ATRA (*All trans Retinoic Acid*) per ridurre le MSC, e ciclofosfamide per impedire la funzione soppressiva dei linfociti T regs.

Valuteremo anche se il polimorfismo di alcuni geni può spiegare la variabilità individuale della risposta biologica e clinica al trattamento. Sarà anche analizzata la risposta immunologica sia anticorpale sia cellulare vaccino- e tumore-specifica nel sangue e, quando possibile, nei linfonodi e nell'infiltrato neoplastico. Poiché il ruolo dell'immunità innata è ignoto nell'attivazione della risposta adattativa dipendente, valuteremo l'utilità di monitorare la concentrazione di un pannello di citochine e chemochine seriche (mediante Bioplex) nonché di marcatori della immunità innata e di attivazione alternativa dei macrofagi.

Attiveremo quattro studi clinici che combinano la vaccinazione con i seguenti approcci terapeutici nelle patologie indicate:

1. Studio di fase II randomizzato di IFN- α 2b ad alte dosi somministrato per un mese in combinazione con un vaccino peptidico in pazienti con melanoma metastatico (razionale: recenti risultati indicano la capacità di IFN- α di amplificare le risposte immuni);
2. Studio di fase I-II di vaccinazione con oncolisato cellulare autologo associato ad IFN- α in pazienti con melanoma metastatico (razionale: gli antigeni unici espressi dal tumore autologo possono evocare forti risposte immuni amplificabili dall'IFN- α , iniettato ad alte dosi nella sede di inoculo del vaccino). In entrambi gli studi, obiettivi primari sono la tossicità e la risposta immune anticorpo e cellulo-mediata. Come obiettivo secondario verrà valutata la risposta clinica.
3. Studio di fase I-II di combinazione di chemio/tomoterapia e vaccino peptidico in pazienti con carcinoma spinocellulare della testa/collo localmente avanzato (razionale: il trattamento chemio/radiante migliora il controllo locale, induce rilascio di antigene delle cellule tumorali e aumenta l'espressione del complesso HLA/antigene sulla loro

membrana aumentando così il bersaglio per la risposta immune indotta dal vaccino che potrebbe migliorare il controllo delle metastasi a distanza).

4. Studio di fase I-II di combinazione di vaccino peptidico e del reagente anti-angiogenico NGR-hTNF attualmente in fase II, come aggiunta alla chemioterapia in pazienti con cancro del colon (razionale: risultati pre-clinici indicano un potenziamento dell'effetto antitumorale della vaccinazione in seguito alle alterazioni dell'endotelio tumorale). La risposta clinica verrà valutata secondo i criteri RECIST.

A livello pre-clinico si propongono tre studi i cui risultati potranno avere un rapido trasferimento clinico anche sui protocolli proposti. Il primo consiste nella ri-analisi della immunogenicità dei peptidi dell'antigene hTERT già utilizzato in clinica come vaccino con risultati discordanti. Nel secondo verranno identificati epitopi promiscui dell'antigene survivina riconosciuti da linfociti T CD4 così da poterli usare per stimolare linfociti dei pazienti. Nel terzo si verificherà se un trattamento de-metilante *in vitro* possa aumentare l'espressione di antigeni e quindi l'immunogenicità dei tumori e se ciò sia ottenibile anche *in vivo* utilizzando farmaci appropriati.

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivo principale è di valutare se la combinazione di vaccino con altri agenti terapeutici (citochine, es. IFN- α), chemio/radioterapia (tomoterapia), nuovo reagente anti-vascolare (NGR/TNF) può indurre una più forte e duratura risposta immunologica e una migliore risposta clinica in confronto (storico) alla sola vaccinazione già praticata con gli stessi vaccini peptidici in pazienti con le patologie e lo stadio di malattia indicato. Inoltre se la riduzione dei principali effetti soppressori indotti dalla presenza del tumore (MSC, linfociti T reg) può tradursi in un significativo miglioramento della risposta immunologica e clinica.

Obiettivi secondari sono:

- Nello studio di vaccinazione con oncolisato di cellule di melanoma autologo, valutare se, interferendo coi meccanismi soppressori (Treg e MSC) e migliorando l'attivazione delle cellule dendritiche mediante somministrazione *in vivo* di IFN- α , si ottengono risposte di linfociti T dirette anche contro gli antigeni unici (da mutazione) in confronto a quelli cross-reagenti "self";
- Valutare se la risposta immune al vaccino si associa a varianti alleliche (polimorfismo) di geni coinvolti nella risposta immune dei singoli pazienti;
- Valutare se l'effetto dell'IFN- α di amplificazione della risposta autoimmune può far aumentare anche la risposta al vaccino, condizione essenziale per ottenere anche una risposta clinica;
- Valutare l'utilità di molecole marcatrici innovative (Pentrassine) per il monitoraggio della risposta macrofagica/infiammatoria (immunità innata);
- Valutare la potenzialità immunogena *in vitro* di hTERT, un antigene universale già usato come vaccino in clinica con risultati contraddittori, con lo scopo di verificare se la immunizzazione genera CTL capaci di lisare cellule tumorali e non solo di riconoscere cellule presentanti l'epitopo;
- Valutare la possibilità di aumentare la risposta ad antigeni tumorali (soprattutto di melanoma) in seguito a stimolazione con cellule trattate con composti de-metilanti.

Obiettivo generale è di verificare se qualcuna delle combinazioni terapeutiche testate può generare una frequenza e intensità di risposta immune ai vaccini tale da tradursi in una significativa risposta clinica misurata come risposta del tumore (RECIST) o come tempi di sopravvivenza rispetto a controlli storici.

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione del progetto Terapie biologiche combinate e personalizzate nei tumori solidi: studi di fase I-II

Proponente (Coordinatore del progetto)	Unità Operativa (UO) (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
HSR (Giorgio Parmiani)	UO1 (HSR: Giorgio Parmiani)	HSR	Giorgio Parmiani
		HSR	Ferruccio Fazio
		HSR	Angelo Corti
		HSR	Paolo Dellabona
		INT	Licia Rivoltini
	UO2 (ISTGE: Paola Queirolo)	Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena	Michele Maio
		ISS	Maria Ferrantini
		Humanitas	Cecilia Garlanda
		ISTGE	Paola Queirolo
		ISTGE	Paolo Bruzzi
	UO3 (IOV: Paola Zanovello)	ISTGE	Silvano Ferrini
		IOV	Paola Zanovello
		IOV	Vanna Chiarion-Sileni
		Università di Padova	Carlo Riccardo Rossi

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Nel contesto della UO1 coordinata da Giorgio Parmiani, sono stati proposti due studi clinici coordinati da HSR (Milano) e comprendenti: a) Studio di fase II randomizzato di IFN- α 2b ad alte dosi per un mese in combinazione con vaccino peptidico in pazienti con melanoma metastatico; b) Studio di fase I/II di combinazione di NGR-hTNF (anti-angiogenico) e vaccino peptidico in pazienti con melanoma.

Per gli studi clinici spontanei si è proceduto alla stesura dei protocolli che hanno incontrato difficoltà e subito ritardi a causa di fattori esterni non scientifici determinati da due elementi. Primo, la interruzione dell'uso dei vaccini peptidici prodotti dalla Merck Biosciences AG e già acquistati da diversi centri europei. Ciò ha richiesto di identificare un'altra fonte di produzione di vaccini peptidici GMP e di negoziare *ex-novo* l'acquisto dei peptidi costringendo anche ad una scelta diversa da quella originale e più ristretta in termini di numero di antigeni da utilizzare per ragioni di costi e di tempi di consegna. Questo problema ha richiesto mesi per essere risolto e oggi, grazie anche alla collaborazione del Ludwig Institute di Bruxelles e New York, abbiamo la disponibilità dei vaccini per iniziare gli studi programmati. La seconda causa di ritardo è da identificare nella rinegoziazione della fornitura di IFN- α 2b o di PegIntron con la Schering Plough che è stata nel frattempo acquistata da Merck con la conseguenza rivalutazione di tutti i programmi di oncologia e cambio dei dirigenti tra cui coloro che avevano manifestato interesse per il nostro protocollo. Intanto abbiamo ottenuto un parere informale della commissione ISS sul protocollo b (vedi sopra) che viene sottoposto entro novembre 2009 al comitato etico di HSR per la parte relativa alla fase II e alla Commissione ISS per la parte riguardante la fase I.

Il protocollo di combinazione IFN e vaccino è in fase di stesura finale e verrà sottoposto alle autorità regolatorie entro dicembre 2009.

Relativamente alla UO2 coordinata da Paola Queirolo, l'Oncologia Medica A e il Laboratorio di Terapia Immunologica dell'IST hanno proseguito l'iter per la sottomissione del protocollo (Studio di fase I-II di vaccinazione con oncolisato cellulare di melanoma autologo associato ad IFN- α 2b in pazienti con melanoma metastatico). Sono state preparate le istruzioni inerenti la preparazione del vaccino e ultimato la stesura del *Technology Transfer Report* (TTR). Parallelamente sono stati allestiti i documenti per la richiesta di autorizzazione dell'Officina Farmaceutica Cell Factory GMP dell'IST all'AIFA al fine della visita di ispezione ministeriale. Il ritardo nella sottomissione è dovuto alla necessità di eseguire adeguamenti della struttura GMP dell'IST e del protocollo sulla base dell'evoluzione della normativa vigente. Inoltre, previa approvazione da parte del Comitato Etico dell'IST, abbiamo eseguito 11 cicli di convalida del processo di preparazione del vaccino. I cicli sono stati condotti in condizione di GMP con monitoraggio microbiologico ambientale e certificazione di sterilità del vaccino prodotto da parte di una ditta esterna autorizzata. Il materiale è stato sufficiente per preparare 5 lotti di vaccino da pazienti diversi. Le maggiori difficoltà incontrate sono state la ridotta quantità del materiale di partenza e/o la ridotta crescita in coltura delle cellule tumorali.

Sono stati messi a punto i test per valutare risposte anticorpali su cellule di melanoma autologo e allogenico; questi test verranno utilizzati per la valutazione della risposta anticorpale al vaccino autologo e nel protocollo di vaccinazione peptidica +IFN α nel melanoma metastatico. Sono stati raccolti sieri di 15 pazienti trattati con IFN presso l'IST e l'IOV a 30, 90 e 180 giorni dalla somministrazione di IFN. Come test di screening è stata usata immunofluorescenza con anti Ig umane totale su cellule integre e su cellule permeabilizzate. I primi risultati indicano una reattività dei sieri dei pazienti contro antigeni intracellulari che viene confermata anche utilizzando cellule di melanoma allogeniche.

Si sta ampliando la casistica e valutando l'uso di microarrays proteici e di tecniche della proteomica per individuare antigeni riconosciuti dagli anticorpi in questione

L'attività della UO3 coordinata da Paola Zanovello, è articolata secondo due linee principali: 1) studio a livello preclinico delle proprietà immunologiche di hTERT (gruppo di ricerca Zanovello); 2-reclutamento e trattamento di pazienti con melanoma per lo studio multicentrico di alte dosi di IFN α associato a vaccino, e raccolta di materiale da pazienti selezionati per gli studi immunologici (gruppi di ricerca - Chiarion-Sileni e Rossi)

La ricerca condotta nel secondo anno di finanziamento ha studiato i bersagli cellulari dei linfociti T citotossici (CTL) specifici per l'antigene telomerasi (TERT) e ristretti per il peptide R865. Infatti, benché i CTL specifici per l'epitopo R865 siano in grado di riconoscere *in vitro* linee tumorali di diverso istotipo e di indurre *in vivo* un incremento della sopravvivenza di topi immunodeficienti inoculati con linee tumorali umane trapiantabili HLA-A2 positive, tali CTL non inducono completa regressione del tumore se non in una bassa percentuale di topi. Abbiamo pertanto ipotizzato che il bersaglio dei CTL TERT-specifici non sia l'intera massa tumorale ma solo la sottopopolazione di cellule ad alta proliferazione definita come *Cancer Stem Cells* (CSC). Le CSC esprimono costitutivamente telomerasi, e quindi rappresentano il bersaglio ideale di immunoterapia adottiva specifica. In collaborazione con il gruppo del prof. De Maria (ISS-Roma), abbiamo verificato prima la presenza e attività di telomerasi e poi l'espressione di HLA-A2. Tale indagine ci ha permesso di caratterizzare una linea CSC HLA-A2 positiva (CSC-13) e una HLA-A2 negativa (CSC-12). Entrambe le due linee cellulari presentavano la medesima attività di telomerasi. Abbiamo pertanto inoculato a gruppi distinti di animali immunodeficienti cellule CSC-13 o cellule CSC-12 come controllo. Dopo poche ore gli animali sono stati inoculati con CTL specifici per l'epitopo R865 o per l'epitopo R30 (utilizzato come controllo) di hTERT. Successivamente gli animali sono stati inoculati con IL-2. Il trasferimento

dei linfociti specifici per l'epitopo R865 ha abrogato la crescita delle cellule CSC-13 in tutti i topi trattati. I nostri dati, quindi, dimostrano che il trasferimento adottivo di CTL specifici per TERT è in grado di eliminare il pool di CSC e suggeriscono che questo approccio possa essere usato in combinazione con trattamenti anti-tumorali tradizionali potenziandone l'efficacia.

La collaborazione dei tre gruppi di ricerca afferenti all'UO prevede una valutazione preliminare sulla presenza di cellule soppressorie di derivazione mieloide nel sangue di pazienti con melanoma in stadio III radicalmente resecati e trattati con IFN adiuvante ad alte dosi. A questo scopo sono state separate cellule mononucleate e granulociti polimorfonucleati dal sangue dei pazienti prima dell'inizio della terapia e ad intervalli mensili. Le cellule così separate vengono analizzate mediante citofluorimetria dopo marcatura con un pannello di anticorpi monoclonali utili per l'identificazione fenotipica delle cellule oppresse nei campioni umani.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Bellone M, Mondino A, Corti A. Vascular targeting, chemotherapy and active immunotherapy: teaming up to attack cancer. *Trends Immunol* 2008;29:235-41.
2. Fratta E, *et al.* Epigenetically-regulated clonal heritability of Cancer Testis Antigens expression profiles in human melanoma. *J Cell Physiol* (in corso di stampa).
3. 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.
4. Sigalotti L, *et al.* Cancer testis antigens and melanoma stem cells: new promises for therapeutic intervention. *Cancer Immunol Immunother* 2009 Oct. 28 (online prima della stampa). prima della stampa).
5. Ugel S, Scarselli E, Iezzi M, *et al.* Autoimmune B cell lymphopenia following successful adoptive therapy with telomerase-specific T lymphocytes. *Blood* 2009 (in corso di stampa).