

## **SVILUPPO DI NUOVE TERAPIE NEI SARCOMI MUSCOLOSCHIELETRICI: IMMUNOTERAPIA E TARGET TERAPIA A CONFRONTO**

Piero Picci

*Dipartimento di Oncologia Muscoloscheletrica, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna*

### **Base di partenza e razionale**

I sarcomi muscoloscheletrici rappresentano un gruppo di tumori relativamente rari per i quali esiste una grandissima esigenza di nuovi schemi di trattamento che associno ad una più elevata probabilità di guarigione anche effetti di tossicità collaterale a lungo termine ridotti rispetto a quelli delle terapie antitumorali usate correntemente.

Al fine di raggiungere questo scopo, si possono prendere in considerazione diversi approcci terapeutici innovativi tra cui l'utilizzazione di anticorpi monoclonali, che sta assumendo in questi ultimi anni un ruolo di primo piano nel trattamento di tumori solidi precedentemente considerati incurabili. Ciò è dovuto ad una serie di fattori che includono elevata efficacia e buona tollerabilità dell'immunoterapia, se comparata con analoghi trattamenti antitumorali. Inoltre, dai dati presenti in letteratura e derivanti da numerose sperimentazioni cliniche, risulta evidente che la buona risposta al trattamento basato sulla sola somministrazione dell'anticorpo monoclonale in pazienti affetti da tumori solidi metastatici (es. Herceptin-Genentech, per il carcinoma mammario metastatico HER-2/neu+; Herbitux- ImClone e Avastin-Genentech, per il carcinoma metastatico coloretale) diventa eccellente se combinata con chemioterapie specifiche. Alla luce di queste osservazioni e considerando la natura estremamente aggressiva dei sarcomi muscoloscheletrici, emerge la necessità di verificare se un'immunoterapia combinata con la somministrazione di chemioterapici specifici sia una strategia di cura efficace e sufficientemente sicura.

Nel corso della prima fase di questo progetto verranno quindi valutate in parallelo le potenzialità di tre diversi approcci immunoterapeutici indirizzati contro le molecole CD99 e Fibronectina, oltre che contro il proteoglicano NG2. Simultaneamente, si analizzerà l'efficacia preclinica di un nuovo agente antitumorale di recente sintesi, il 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)texano (NBDHEX), diretto contro l'enzima glutatione trasferasi, coinvolto nella detossificazione dei principali farmaci utilizzati nei regimi di polichemioterapia dei tumori muscoloscheletrici, che è risultato essere molto attivo in diverse linee cellulari di tumori umani.

Sulla base dei risultati ottenuti nella prima fase (primi 24 mesi) del programma di ricerca, la seconda parte dello studio (25-36 mesi) prevederà lo sviluppo dell'approccio che ha dato i migliori risultati preclinici (con produzione in GMP – *Good Manufacturing Practice* –, se e dove necessario) oltre che il completamento degli studi tossicologici e di farmacocinetica al fine di arrivare, al termine del progetto, ad avere tutti i prerequisiti per avviare uno studio clinico di fase I-II nei sarcomi muscoloscheletrici.

L'articolazione del programma di ricerca in due fasi distinte e successive, delle quali la prima è propedeutica alla seconda, consentirà di finalizzare le risorse dell'ultimo anno del progetto alla strategia terapeutica risultata più promettente e con le migliori caratteristiche di attuazione in uno studio clinico controllato di fase I-II.

Inoltre, un ulteriore valore aggiunto di questo progetto è rappresentato dal fatto che le diverse UO coinvolte sono altamente specializzate nello studio dei sarcomi muscoloscheletrici e/o nei vari campi d'indagine previsti dal programma di ricerca, da cui ne consegue un'elevata complementarità delle rispettive conoscenze e competenze.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi del progetto sono:

- *Generazione di un anticorpo umano specifico per CD99 utilizzabile clinicamente*
  - selezione di anticorpi monoclonali ricombinanti umani in forma di *single chain fragment variable* (scFv) diretti verso epitopi extracellulari del CD99;
  - aumento dell'affinità degli scFv-CD99 specifici per mezzo di processi di maturazione e generazione di minianticorpi divalenti e/o di IgG intere mediante ingegneria genetica;
  - analisi *in vitro* e *in vivo* per valutare l'efficacia antitumorale degli anticorpi isolati e per verificarne la potenziale applicabilità terapeutica e le interazioni con i più comuni chemioterapici.
- *Valutazione pre-clinica dell'efficacia di NBDHEX*
  - analisi dell'efficacia *in vitro* di NBDHEX e delle interazioni con i chemioterapici convenzionali;
  - analisi del meccanismo di morte cellulare indotto dal trattamento con NBDHEX;
  - analisi dell'efficacia *in vivo* (nell'animale da esperimento) di NBDHEX, usato sia come farmaco singolo che in associazione ai chemioterapici convenzionali. Tali analisi saranno anche volte ad identificare il profilo farmacocinetico e gli effetti di tossicità collaterale di NBDHEX per una eventuale pianificazione di studi di fase I-II.
- *Definizione del significato prognostico e terapeutico del proteoglicano NG2*
  - valutazione della capacità di NG2 di predire la presenza di metastasi occulte e/o l'evoluzione metastatica del tumore;
  - delucidazione dei meccanismi cellulari e molecolari tramite i quali NG2 controlla l'interazione cellula tumorale-microambiente ospite;
  - selezione di sequenze peptidiche di NG2 in grado di indurre una risposta immunologica citotossica in topi NOD-SCID "umanizzati", utilizzabili per pianificare sperimentazioni cliniche di fase I-II.
- *Definizione dell'efficacia di anticorpi umani ricombinanti contro il dominio EDB della Fibronectina*
  - studio immunoistochimico dell'espressione di EDB in sarcomi muscoloscheletrici umani e in modelli sperimentali murini;
  - studi preclinici di terapia con TNF-alpha coniugato ad anticorpo anti-EDB in almeno tre diversi modelli murini di sarcomi muscoloscheletrici;
  - sul modello nel quale si saranno ottenuti i risultati migliori, completamento degli studi *in vitro* e *in vivo* per la pianificazione di studi clinici di fase I-II.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del progetto Sviluppo di nuove terapie nei sarcomi muscoloscheletrici: immunoterapia e target terapia a confronto**

Proponente (Coordinatore del progetto)	Unità Operativa (UO) (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
IOR (Piero Picci)	UO1 (IOR: Piero Picci)	IOR	Katia Scotland
		IOR	Massimo Serra
		INT	Mario Colombo
		Centro di Biotecnologie Avanzate (CBA), Genova	Luciano Zardi
		ISTGE	Laura Borsi
		ISS	Maurizio Cianfriglia
		Università "Tor Vergata" (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche)	Anna Maria Caccuri
		UO2	Roberto Perris
		(CRO: Roberto Perris)	Maria Serena Benassi
			UO2
	(CRO: Roberto Perris)	Maria Serena Benassi	

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Il progetto di Ricerca è stato organizzato e strutturato in due Unità Operative (UO), ognuna delle quali composta da diverse sotto-Unità Operative (o Gruppi di Ricerca) (vedi Tabella 1).

Nel secondo anno di progetto sono state proseguite le analisi delle potenzialità di approcci immunoterapeutici indirizzati contro la molecola CD99 e il proteoglicano NG2, assieme alla valutazione dell'efficacia preclinica su cellule di osteosarcoma e sarcoma di Ewing del nuovo agente antitumorale 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX).

Le varie UO/Gruppi di Ricerca del progetto si sono integrate per effettuare e sviluppare gli studi inerenti gli approcci terapeutici sopra menzionati come segue:

- i gruppi di ricerca IOR-Serra e UniRoma-Caccuri hanno cooperato per la parte del programma di ricerca inerente la valutazione pre-clinica e la definizione delle potenzialità terapeutiche di NBDHEX, valutandone gli effetti in trattamenti combinati con doxorubicina e methotrexate in linee cellulari di osteosarcoma, e doxorubicina e vincristina in linee cellulari di sarcoma di Ewing. È stata anche analizzata l'efficacia *in vivo* su topi atimici di NBDHEX, anche se questa parte dello studio dovrà essere implementata e completata nei prossimi anni di attività del progetto. Inoltre, è stata completata, nella linea U-2OS, l'analisi del pathway apoptotico attivato dal trattamento con NBDHEX ed è stato analizzato il meccanismo di morte cellulare indotto nella linea resistente al cisplatino U-2OS/CDDP4 $\mu$ g
- i gruppi di ricerca IOR- Scotlandi, ISS-Cianfriglia<sub>2</sub> e INT-Colombo, si sono integrati per quanto riguarda il targeting immunoterapeutico dell'antigene di membrana CD99. Al fine di rendere utilizzabili a livello clinico le potenzialità curative del mAb 0662 l'immunoglobulina murina è stata geneticamente modificata in una versione umanizzata

mediante costruzione di appropriati vettori di espressione contenenti i geni per le VH e VL murine ed Fc umane di classe IgG1. È stato inoltre completato il clonaggio del gene murino considerato l'omologo del gene umano CD99, e il cDNA del CD99 di topo (cromosoma 4, GeneID: 673094) è stato inserito all'interno del plasmide pcDNA3 sotto il controllo del promotore costitutivo del citomegalovirus (CMV).

- i gruppi di ricerca IST-Borsi e CBA-Zardi hanno analizzato l'efficacia della Gemcitabina usata come agente terapeutico singolo e in combinazione con L19mTNFa/melphalan su topi affetti da sarcoma.
- i gruppi di ricerca UniParma-Perris e IOR-Benassi hanno validato il ruolo predittivo e prognostico di NG2 su un'ampia casistica di sarcomi di differente istotipo con la definizione di un cut-off utile a una stratificazione dei pazienti, in termini di rischio di sviluppo di metastasi, basata principalmente sul tipo istologico del tumore, grado di malignità, sede e risposta alla terapia. Per valutare i meccanismi molecolari alla base del significato clinico di questa molecola, l'espressione di NG2 è stata abrogata in un pannello di linee cellulari di sarcoma causando una riduzione della motilità e adesione cellulare e un rallentamento della crescita *in vivo* del tumore parallelamente alla modificazione del profilo di espressione genica globale. L'acquisizione delle informazioni relative al ruolo prognostico e prometastatico hanno confermato il ruolo di NG2 come target terapeutico consolidando due differenti approcci: l'utilizzo di anticorpi monoclonali contro la porzione extracellulare, efficaci nel ridurre la motilità e crescita cellulare, e l'identificazione di sequenze immunodominanti per la produzione di vaccini peptidici.

## Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Balza E, Carnemolla B, Mortara L, Castellani P, Soncini D, Accolla RS, Borsi L. Therapy-induced antitumor vaccination in neuroblastomas by the combined targeting of IL-2 and TNFalpha. *Int J Cancer* 2009 Oct 29 (online prima della stampa). prima della stampa).
2. Balza E, Sassi F, Ventura E, Parodi A, Fossati S, Blalock W, Carnemolla B, Castellani P, Zardi L, Borsi L. A novel human fibronectin cryptic sequence unmasked by the insertion of the angiogenesis-associated extra type III domain B. *Int J Cancer* 2009;125(4):751-8.
3. Benassi MS, Pazzaglia L, Chiechi A, Alberghini M, Conti A, Cattaruzza S., Wassermann B., Picci P., Perris R. NG2 expression predicts the metastasis formation in soft-tissue sarcoma patients. *J Orthop Res* 2009;27(1):135-40.
4. Cattaruzza S, Nicolosi PA, Perris R. Proteoglycans in the control of tumor growth and metastasis formation. *Connect Tissue Res* 2008;49:225-229.
5. Federici L, Lo Sterzo C, Pezzola S, Di Matteo A, Scaloni F, Federici G, Caccuri AM. Structural basis for the binding of the anticancer compound 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol to human glutathione s-transferases. *Cancer Res* 2009;69(20):8025-34.
6. Pasello M, Michelacci F, Scionti I, Hattinger CM, Zuntini M, Caccuri AM, Scotlandi V, Picci P, Serra M. Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma. *Cancer Res* 2008;68:6661-8.
7. Pazzaglia L, Chiechi A, Conti A, Gamberi G, Magagnoli G, Novello C, Morandi L, Picci P, Mercuri M and Benassi MS. Genetic and molecular alterations in rhabdomyosarcoma: mRNA overexpression of MCL1 and MAP2K4 genes. *Histol Histopathol* 2009;24:61-67.

8. Scotlandi K, Remondini D, Castellani G, Manara MC, Nardi F, Cantiani L, Francesconi M, Mercuri M, Caccuri AM, Serra M, Knuutila S, Picci P. Overcoming Resistance to Conventional Drugs in Ewing Sarcoma and Identification of Molecular Predictors of Outcome. *J Clin Oncol* 2009;27(13):2209-16.
9. Ventura E, Sassi F, Fossati S, Parodi A, Blalock W, Balza E, Castellani P, Borsi L, Carnemolla B, Zardi L. Use of uteroglobin for the engineering of polyvalent, polyspecific fusion proteins. *J Biol Chem* 2009;284(39):26646-54.

## **Brevetti conseguiti nell'ambito del progetto**

Generation of human single-chain fragment variable (scFv) antibody to the extracellular domain of the CD99 cell surface determinant specifically recognizing Ewing's sarcoma tumor cells. Il 50% parte ISS è rappresentata dai seguenti autori: Gellini M, Cianfriglia M, Ascione A, Flego M, Mallano A, Dupuis ML.