

PROGETTO 2. Sviluppo di nuove terapie per i tumori che causano metastasi ossee, sviluppato presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, nelle sedi di Milano e Bergamo.



Stato dell'arte e razionale dello studio.

Il microambiente tumorale (TME), nelle sue componenti cellulari e molecolari, ha un ruolo determinante nella malattia oncologica, e in particolare nello sviluppo delle metastasi. Questa considerazione ha aperto la strada allo sviluppo di diversi strumenti terapeutici per alterare o "rieducare" il microambiente tumorale, con il fine ultimo di ostacolare la crescita dei tumori e delle metastasi.

Nello specifico, l'interazione delle cellule tumorali con cellule e molecole presenti nell'osso guida ogni fase del processo di formazione delle metastasi ossee, regolando la migrazione delle cellule tumorali alla sede ossea, la sopravvivenza delle cellule tumorali stesse che sfuggono al sistema immunitario, la proliferazione della nuova lesione, e infine l'attivazione di cellule deputate al rimodellamento osseo per formare lesioni osteolitiche o osteoblastiche.

È da sottolineare come le metastasi ossee rappresentino un problema medico importante in quanto molti tumori maligni umani, alcuni dei quali molto frequenti come quelli della mammella e della prostata, metastatizzano frequentemente all'osso. La presenza di metastasi ossee riduce fortemente la sopravvivenza e la qualità della vita di questi pazienti anche perché le terapie disponibili per contrastarle sono poco efficaci. È quindi molto importante attuare della ricerca focalizzata allo studio delle metastasi ossee che

ponga le basi per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per le metastasi ossee.

Obiettivi generali del progetto.

Questo progetto si prefigge di studiare il microambiente (TME) della metastasi ossea per sviluppare nuovi approcci farmacologici che, agendo sul TME, possano inibire lo sviluppo e la progressione delle metastasi all'osso.

Lo studio è stato suddiviso in due sottoprogetti:

1. modulazione farmacologica dei macrofagi del microambiente metastatico per l'acquisizione di un fenotipo antitumorale che inibisca l'attecchimento e la progressione tumorale metastatica.
2. analisi del ruolo della TSP-1 nello sviluppo di metastasi ossee osteolitiche e identificazione di specifici domini con potenziale attività antimetastatica come base per nuovi approcci terapeutici.

Sottoprogetto 1. Modulazione farmacologica dei macrofagi del microambiente metastatico per l'acquisizione di un fenotipo anti-tumorale che inibisca la progressione tumorale.

Stato dell'arte e razionale. Il sistema immunitario (SI) è composto da elementi cellulari e fattori che condizionano l'organismo umano sia in stato di salute che in malattia. Il SI si divide in due parti: una "immunità innata" (aspecifica ed immediata) ed un'altra "adattativa" (antigene specifica e di memoria) che, essendo interconnesse, si supportano e regolano a vicenda. Ad oggi, la modulazione del sistema immunitario ad uso terapeutico è sempre più radicata in clinica oncologica con risultati incoraggianti.

In generale, l'immunità anti-tumorale comporta la cattura e l'elaborazione degli antigeni tumorali da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC) e la loro presentazione alle cellule T in modo da innescare la risposta adattativa; in seguito, i linfociti T migrano verso il tumore per esercitare specifici effetti antitumorali. Le APC giocano quindi un ruolo chiave nella risposta immunitaria e

sono di due tipi: i macrofagi (MΦ) che sono residenti tissutali e che possono assumere fenotipo sia M1 (immunostimolante, anti-tumorale) che M2 (immunosoppressivo, tolerogenico), e le cellule dendritiche (DC) che hanno la capacità di migrare e indurre una risposta specifica esercitata dal sistema immunitario adattativo. I MΦ svolgono un ruolo essenziale per l'inizio e la progressione tumorale e metastatica condizionando quindi la prognosi della malattia; quelli associati al tumore sono denominati TAM e possono modificare il microambiente tumorale (TME) che, generalmente, promuove un fenotipo immunosoppressivo attraverso meccanismi molecolari e fattori che inibiscono l'attività delle cellule immunitarie. Ad oggi modulare il TME ed il fenotipo delle APC rappresenta un passo per lo sviluppo di un nuovo approccio per l'immunoterapia contro diverse tipologie tumorali e cancro.

Ipotesi dello studio. La nostra strategia d'azione punta alla rieducazione funzionale dei macrofagi MΦ e M2 del TME verso un profilo M1; tale switch sposterà l'equilibrio del TME che favorisce la crescita della massa metastatica risvegliando una risposta immunitaria antitumorale finalizzata ad una riduzione delle metastasi ossee.

A tal fine, è stata individuata una classe di farmaci agonisti dei recettori Toll-like receptors (TLRs) come possibili candidati. Questi recettori sono espressi dalle cellule target ma per evitare il loro effetto sui macrofagi di altri tessuti verranno generati, in collaborazione con il Politecnico di Milano, sistemi di delivery mirata evitando l'effetto sistemico indesiderato. Inoltre tali farmaci sono già stati approvati dalla Food and Drug Administration agency (FDA), che consentirebbe una più veloce applicabilità in clinica.

Obiettivi generali:

- Sintesi di nanoparticelle biocompatibili (NPs) che consentano la delivery selettiva dei farmaci all'osso per condizionare i macrofagi del TME. Allo stesso tempo, tale strategia verrà messa a confronto con costrutti di farmaci legati ai bifosfonati, i quali verranno sfruttati come agenti carrier dato il loro elevato tropismo osseo.
- Studi *in vitro* su macrofagi generati da materiale murino e umano, per determinare l'efficienza dei trattamenti farmacologici mediante analisi molecolari e fenotipiche.

- Studi *in vivo* su modelli animali di metastasi ossee per analizzare l'attività dei farmaci immunomodulanti e validare la migliore strategia di delivery farmacologica.

Gli obiettivi raggiunti del terzo anno

1. Caratterizzazione del farmaco
2. Messa a punto della metodica di coltura di macrofagi umani e murini, ed analisi dello switch trascrizionale e fenotipico delle cellule a seguito del trattamento, con definizione del range di concentrazione ottimale.
3. Approvazione del progetto al fine sperimentazione animale da parte dell'ISS.
4. Sviluppo di nanotecnologie selettive per l'osso ed in grado di trasportare il farmaco nella sede tumorale, targettando i macrofagi del microambiente tumorale.

In linea con gli obiettivi e lo stato dell'arte, è stato necessario caratterizzare il farmaco per studiarne le caratteristiche chimico-fisiche e successivamente osservarne *in vitro* l'effetto modulante su cellule target primarie, ovvero i macrofagi murini ed umani.

Successivamente, per consentire la delivery mirata alle ossa sono state considerate due possibili strategie nanotecnologiche: la sintesi di nuovi costrutti farmacologici e la sintesi di nanoparticelle (polimeriche ed organiche).

Queste formulazioni sono state caratterizzate e studiate per stabilirne la stabilità e la capacità di rilasciare il principio attivo.

Risultati

I risultati ottenuti nei mesi di lavoro hanno delucidato quale dose del farmaco in esame R848 è in grado di indurre lo switch di fenotipo nei macrofagi indifferenziati M0 e quelli M2 verso un fenotipo immunostimolante M1.

Nel giugno 2021 abbiamo ottenuto l'approvazione dell'ISS dei progetti al fine sperimentazione animale che ci ha consentito di proseguire sia gli esperimenti *in vitro* che *in vivo*.

Al fine di poter limitare l'effetto indesiderato di un'inflammation sistemica e migliorare il targeting alle ossa, aumentando la selettività del trattamento verso l'organo, sono stati sintetizzati sia nuovi costrutti farmacologici che NPs di natura polimerica ed organica.

Fra le nanotecnologie studiate, le NPs sia di natura polimerica (di poli-caprolattone) che organica (liposomi) hanno dato i risultati migliori

rispetto alle molecole di nuova sintesi. Sono però necessarie ottimizzazioni, in termini di carico e stabilità, per garantire il successo nella sperimentazione *in vivo*. Dal 2022 saranno presi in considerazione sia nuovi costrutti farmacologici che nuove tipologie di NPs per ampliare il ventaglio di possibilità del targeting mirato, obiettivo di questo progetto.

Sottoprogetto 2. Ruolo della TSP-1 nello sviluppo di metastasi ossee osteolitiche e identificazione di specifici domini con potenziale attività anti-metastatica come base per nuovi approcci terapeutici

Stato dell'arte e razionale. Lo progetto è basato sulla nota capacità della trombospondina-1 (TSP-1) di organizzare il microambiente tumorale e coordinare la risposta delle cellule a variazioni delle proprietà del microambiente. Grazie alla sua struttura modulare, infatti, la TSP-1 lega un gran numero di molecole, compresi fattori coinvolti nella formazione di metastasi e nel rimodellamento dell'osso. Sulla base di questa evidenza si è ipotizzato che questa proteina possa avere un ruolo nel regolare lo sviluppo di metastasi ossee osteolitiche. Nel corso dei primi due anni del progetto abbiamo identificato un frammento di TSP-1 attivo nell'inibire la formazione di metastasi osteolitiche, e che riteniamo possa servire da modello per il disegno di terapie antimetastatiche.

Obiettivi specifici del terzo anno

Sulla base dei risultati ottenuti nei primi due anni di studio, nel terzo anno la nostra attività si è focalizzata soprattutto sulla caratterizzazione dell'azione osteoprotettiva e antimetastatica della TSP-1 e del suo frammento:

1. analizzandone l'effetto su diverse popolazioni cellulari e indentificando i meccanismi molecolari coinvolti.
2. confrontando l'espressione di TSP-1 nel contesto di metastasi osteolitiche o osteoblastiche, in relazione a altre molecole rilevanti per le metastasi ossee.

Risultati ottenuti nel terzo anno

- 1) Nell'ambito dello studio volto a caratterizzare l'azione osteoprotettiva e antimetastatica della TSP-1, abbiamo analizzato l'azione della TSP-1 nelle diverse fasi del processo di differenziamento delle cellule deputate al controllo del rimodellamento della matrice ossea. I risultati hanno messo in evidenza

un'azione complessa della TSP-1, dovuta alla sua capacità di legare fattori che regolano questo processo, modulandone l'attività sulle cellule.

- 2) La TSP-1 è presente in diversi contesti tumorali dove svolge funzioni diverse, a volte opposte, a seconda del contesto molecolare e dell'esposizione dei suoi siti attivi. Abbiamo utilizzato tecniche di bioinformatica per confrontare l'espressione di TSP-1 e di molecole ad essa associate in metastasi ossee da pazienti con carcinoma della mammella (prevalentemente osteolitiche) e della prostata (prevalentemente osteoblastiche).

Conclusioni per il terzo anno della ricerca

L'attività di ricerca nel 2021 ha confermando l'ipotesi iniziale del progetto, cioè la possibilità di sviluppare composti terapeutici che rieducano il microambiente, e nello specifico cellule immunitarie e cellule deputate al rimodellamento della matrice ossea, per contrastare la crescita delle metastasi e proteggere l'osso dalla degradazione patologica. Inoltre sono stati fatti progressi nella messa a punto di molecole attive e di strategie per indirizzare queste terapie in modo selettivo all'osso, che saranno oggetto dello studio nei prossimi anni.

Pubblicazioni

- Carminati L, Taraboletti G. Thrombospondins in bone remodeling and metastatic bone disease. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020 Dec 1;319(6):C980-C990. doi: 10.1152/ajpcell.00383.2020.
- Nastasi C, Mannarino L, D'Incalci M. – DNA Damage Response and Immune Defense. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020; 21(20):7504, doi: 10.3390/ijms21207504.

Presentazioni e Congressi

- Carminati L, Sangalli F, Borsotti P, Pinessi D, Broggin M, Remuzzi A, Giavazzi R, Taraboletti G. Modeling bone microenvironment changes in breast cancer bone metastasis. 61st Annual Meeting of the Italian Cancer Society (SIC), Naples, Nov 6-8, 2019

- Carminati L, Sangalli F, Borsotti P, Pinessi D, Brogginini M, Taraboletti G. Investigating the role of thrombospondins in bone remodeling and metastasis. European Association for Cancer Research, EACR 2020, Torino (postponed to 09-12 June 2021)
- Carminati L, Sangalli F, Borsotti P, Pinessi D, Brogginini M, Taraboletti G. Modeling osteolytic bone metastasis to investigate the role of thrombospondins. Matrix Biology Europe 2020, Florence (postponed to 2022)
- Carminati L., Borsotti P., Sangalli F., Taraboletti G. Targeting bone microenvironment in osteolytic metastases. 2021 OU-ARC Research Symposium “Cancer: From Concepts to Cures”, 15 - 17 November 2021

