

PROGETTO 4. Metastasi ossee: studio delle basi biologiche e sviluppo di nuove strategie terapeutiche, sviluppato presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, nelle sedi di Milano e Bergamo.



Razionale e ipotesi dello studio

Le metastasi ossee, derivanti da diversi tipi di tumori primari – particolarmente carcinoma della mammella e della prostata – rappresentano un problema clinico importante. Lo sviluppo di metastasi ossee riduce fortemente la qualità della vita dei pazienti e la loro sopravvivenza. Attualmente sono poche le terapie disponibili in clinica, e il trattamento spesso è palliativo, mirato a ridurre o migliorare i sintomi causati dalla presenza di lesioni ossee. Pertanto, è di fondamentale importanza focalizzare la ricerca sullo studio dei

meccanismi che guidano lo sviluppo di metastasi all'osso, al fine di individuare bersagli per nuove strategie terapeutiche.

Il microambiente tumorale (TME) ricopre un ruolo fondamentale nel sostenere la progressione del tumore e lo sviluppo di metastasi.

L'obiettivo finale di questo progetto è "rieducare" il microambiente tumorale dell'osso, al fine di renderlo meno favorevole alla crescita di metastasi. Nello specifico, ci occupiamo di due componenti chiave del microambiente tumorale: (i) i macrofagi, cellule dell'immunità innata che regolano la progressione tumorale con esiti opposti in base al loro grado di polarizzazione; (ii) la trombospondina-1, una molecola extracellulare nota per la sua attività pleiotropica nel regolare l'interazione tra il microambiente e le cellule tumorali.

Obiettivi del progetto

Lo scopo di questo progetto è studiare il microambiente (TME) delle metastasi ossee al fine di sviluppare nuovi approcci farmacologici che, agendo su sue componenti cellulari e/o molecolari, possano contrastare lo sviluppo di metastasi all'osso.

Lo studio è suddiviso in due sottoprogetti:

- 1) Sviluppo di formulazioni nanotecnologiche per la modulazione farmacologica dei macrofagi specificamente nell'osso, per l'acquisizione di un fenotipo immunostimolante che induca la risposta immunitaria adattativa specifica inibendo la progressione tumorale;
- 2) Analisi del ruolo della TSP-1 e dei suoi domini nello sviluppo di metastasi ossee osteolitiche, al fine di identificare specifici domini con potenziale attività antimetastatica come base per nuovi approcci terapeutici.

Sottoprogetto 1. modulazione farmacologica dei macrofagi nel microambiente metastatico dell'osso.

Stato dell'arte e razionale

I macrofagi sono cellule dell'immunità innata che giocano ruoli importanti nel mantenimento dell'omeostasi tissutale, proteggendo il nostro organismo tramite diversi meccanismi, quali fagocitosi e digestione di particelle estranee, patogeni e detriti cellulari. I macrofagi sono cellule "plastiche", in quanto responsive all'influenza del microambiente circostante, che ne può alterare l'espressione genica e le funzioni, orientandoli verso uno specifico fenotipo contesto-specifico.

Nel microambiente tumorale, i macrofagi associati al tumore (TAMs) promuovono la progressione tumorale, stimolando i processi di angiogenesi, riparo tissutale, migrazione di cellule tumorali metastatiche, e tramite un'azione soppressiva dei linfociti T citotossici. Ad oggi, modulare il TME e il fenotipo dei macrofagi rappresenta una strategia per lo sviluppo di nuovi approcci immunoterapici contro diverse tipologie tumorali e metastasi.

Sulla base dei risultati ottenuti nei tre anni precedenti, questo sottoprogetto ha lo scopo di studiare e sviluppare nuove strategie per veicolare farmaci in modo mirato verso il microambiente dell'osso, al fine di riprogrammare il fenotipo dei TAMs nelle metastasi ossee.

Risultati

Sono state prese in considerazione diverse nanotecnologie: le nanoparticelle (polimeriche, organiche e inorganiche) e un costrutto di nuova sintesi a cui poter legare il farmaco d'interesse.

Risultati molto interessanti sono stati ottenuti grazie all'ottimizzazione del protocollo di sintesi dei liposomi impiegando una metodologia di caricamento attiva, che ha consentito di incrementare l'efficienza di incapsulamento del farmaco, mantenendo riproducibilità, omogeneità della preparazione e stabilità nel tempo. Esperimenti preliminari in un modello preclinico di carcinoma della mammella hanno dimostrato che la formulazione liposomiale non solo mantiene l'attività antitumorale del farmaco, ma aumenta il tempo di esposizione dei tessuti ad esso. L'obiettivo nei prossimi mesi sarà quello di sviluppare liposomi affini all'osso, per veicarli in modo più specifico verso il microambiente di metastasi ossee.

Inoltre, si stanno sviluppando anche dei coniugati del farmaco con una molecola appartenente alla classe dei bifosfonati utilizzata per il trattamento dell'osteoporosi che ha un'elevata affinità per il tessuto osseo in collaborazione con il Dipartimento di Chimica dell'Università di Milano.

Infine, tra le altre formulazioni nanotecnologiche, sono state sviluppate nanoparticelle di organosilica di varia grandezza insieme alla prof. De Cola del MN e nanoparticelle polimeriche auto-assemblanti con il Politecnico di Milano, le cui sintesi sono in via di ottimizzazione per migliorarne la resa di caricamento del farmaco.

Sottoprogetto 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.

Stato dell'arte e razionale

Il progetto è basato sulla nota capacità della trombospodina-1 (TSP-1) di organizzare il microambiente tumorale e coordinare l'interazione tra le cellule tumorali e le altre componenti del microambiente. La TSP-1 è caratterizzata da una struttura modulare, costituita da diversi domini, ognuno in grado di interagire con ligandi specifici, influenzando quindi diverse attività biologiche.

Grazie a questa sua struttura, la TSP-1 gioca un ruolo importante nel regolare il microambiente tumorale agendo non solo sulle cellule tumorali, ma anche su cellule normali dell'osso, fra cui cellule deputate al rimodellamento osseo: osteoblasti (deposizione di matrice ossea) e osteoclasti (degradazione della matrice ossea).

Nei tre anni precedenti abbiamo identificato un frammento della TSP-1 in grado di rallentare la comparsa delle metastasi ossee in un modello preclinico di carcinoma della mammella, proteggendo la matrice ossea dalla degradazione. Abbiamo inoltre dimostrato che tale frammento riduce significativamente il processo di differenziamento degli osteoclasti (osteoclastogenesi) in un modello in vitro di differenziamento da precursori isolati dal midollo osseo.

Sulla base dei risultati già ottenuti, lo scopo di questo progetto è studiare il ruolo della TSP-1 nello sviluppo delle metastasi ossee osteolitiche, per identificare specifici suoi domini con potenziale attività antimetastatica.

Risultati

Per avere a disposizione uno strumento più pratico e versatile per studiare l'osteoclastogenesi, abbiamo messo a punto un secondo modello, in cui gli osteoclasti derivano dalla linea cellulare RAW264.7. Anche in questo secondo modello è stata confermata l'attività inibitoria del frammento di TSP-1 sull'osteoclastogenesi, risultato che conferma sia la rilevanza del dato che l'attendibilità del modello. Attualmente, utilizzando queste cellule, sono in corso studi per chiarire il meccanismo molecolare alla base di tale inibizione.

Abbiamo poi prodotto, per via ricombinante, i singoli domini della proteina TSP-1, soprattutto quelli presenti nel frammento già studiato, e abbiamo analizzato la loro attività in questo modello di osteoclastogenesi. Dai primi risultati è emerso che nessun singolo dominio è in grado di inibire il differenziamento degli osteoclasti in misura significativa come il frammento intero. Studi di legame dei domini di TSP-1 al recettore RANK, indispensabile per indurre il differenziamento degli osteoclasti, hanno confermato la ridotta attività dei singoli domini isolati, risultati che riflettono l'elevata complessità strutturale e funzionale della TSP-1.

Per approfondire il meccanismo con cui il legame del dominio a RANK interferisce con il differenziamento degli osteoclasti, sono in corso esperimenti per studiare se, e come, il frammento di TSP-1 compete per il legame del ligando fisiologico RANKL.

Per identificare i meccanismi fisiologici che portano al rilascio del frammento attivo della TSP-1, stiamo

analizzando se, e quali frammenti della TSP-1 vengono prodotti dalle diverse componenti cellulari del microambiente delle metastasi ossee. La TSP-1 viene infatti processata in sede extracellulare da diverse proteasi che liberano i suoi frammenti con funzioni biologiche specifiche.

Infine, per capire se l'espressione di TSP-1 è correlata a determinati geni e programmi funzionali nelle metastasi ossee, è stata condotta un'analisi bioinformatica su banche dati pubbliche riportanti i profili di espressione genica di campioni di metastasi ossee da pazienti con metastasi osteolitiche (cancro alla mammella) e osteoblastiche (cancro alla prostata). L'analisi dei geni associati all'espressione di TSP-1 ha evidenziato differenti profili nei due tipi di metastasi, indicando che la TSP-1 fa parte di diversi programmi funzionali nei due tipi di tumore.

Conclusioni dei due Sottoprogetti

In questo primo anno sono stati portati a termine diversi obiettivi, in entrambi i sottoprogetti.

Per quanto riguarda il sottoprogetto 1, relativo allo studio della modulazione farmacologica dei macrofagi nelle metastasi ossee, i risultati ottenuti con la formulazione liposomiale sono promettenti, in quanto mantengono inalterato il farmaco in termini di emivita e efficacia, e ciò consente di poter studiare i liposomi per renderli ora in grado di veicolare il farmaco in modo specifico verso l'osso. Altre formulazioni nanotecnologiche sono in corso di studio, al fine di trovare la migliore strategia per procedere con gli studi in modelli preclinici di metastasi ossee.

Nel sottoprogetto 2, relativo allo studio della TSP-1 e dei suoi domini nelle metastasi ossee osteolitiche, i nuovi studi hanno permesso di confermare i precedenti risultati, dimostrando che il frammento di TSP-1 già identificato inibisce in modo significativo l'osteoclastogenesi, presumibilmente attraverso il suo legame al recettore RANK. Gli esperimenti in corso potranno chiarire il meccanismo molecolare alla base dell'attività di tale frammento sull'osteoclastogenesi.

Per studiare come la TSP-1 viene degradata proteoliticamente da diversi tipi cellulari potranno chiarire se e quali componenti del microambiente osseo producono frammenti attivi della proteina.

Infine, gli studi di bioinformatica hanno permesso di analizzare la correlazione della TSP-1 con diversi programmi di espressione genica nelle metastasi ossee, il che può essere utile al fine di studiare la sua attività non solo in termini di inibizione dell'osteoclastogenesi, ma anche legata ad altri processi pro-tumorali e pro-metastatici.

Pubblicazioni finanziate

Granata V, Crisafulli L, Nastasi C, Ficara F, Sobacchi C. Bone marrow niches and tumour cells: lights and shadows of a mutual relationship. *Front. Immunol.*, 06 May 2022, Sec. Cancer Immunity and Immunotherapy, Vol. 13-2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.884024

Russo M, Nastasi C. Targeting the tumor microenvironment: a close up of tumor-associated-macrophages and neutrophils. *Front. Oncol.*, 19 May 2022, Sec. Molecular and Cellular Oncology, Vol. 12-2022, doi: 10.3389/fonc.2022.871513

Carminati L, Carlessi E, Longhi E, Taraboletti G. Control of thrombospondin activity by limited proteolytic processing. *Submitted manuscript*.

Presentazioni a congressi

Taraboletti G. Thrombospondin-1 and tumor-host interaction on bone metastasis. FASEB 2022 (Lisbona, Lug 17-21 2022). *Oral presentation*.

Carminati L, Longhi E, Urbinati C, Scarpetta D, Cabri E, Carlessi E, Borsotti P, Sangalli F, Fratelli M, Rusnati M, Taraboletti G. Role of Thrombospondin-1 in the microenvironment of osteolytic bone metastasis. *Matrix Biology Europe 2022 (Firenze, Set 28-30 2022)*. *Poster presentation*.

Becchetti R, Matteo C, Ceruti T, Frapolli R, Zucchetti M, Nastasi C. Development of drug-loaded liposomes to target the tumor microenvironment. *PhD Students Meeting (Milano, Giu 9-10 2022)*. *Poster presentation*.

Becchetti R, Matteo C, Ceruti T, Frapolli R, Zucchetti M, Nastasi C. Development of drug-loaded liposomes to target the tumor microenvironment. SIC (Venezia, Nov 16-18 2022). *Poster presentation.*

