

**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 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'interazione delle cellule tumorali con le cellule residenti e le molecole presenti nel midollo osseo regola diversi aspetti dello sviluppo metastatico, quali la migrazione, la

sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali stesse, l'evasione del sistema immunitario e l'attivazione anomala delle cellule deputate al rimodellamento della matrice ossea, portando alla formazione di metastasi ossee osteolitiche o osteoblastiche. 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 trombospodina-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 dell'attività dei macrofagi presenti nel microambiente tumorale osseo, 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 suoi domini per sviluppo di metastasi ossee osteolitiche al fine di identificare specifici domini con potenziale attività anti-metastatica 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 con fenotipo M1 promuovono una risposta immunitaria anti-tumorale, mentre i macrofagi M2 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. In questo contesto, il nostro scopo è quello di studiare e sviluppare nuove strategie per veicolare farmaci immunomodulanti verso il microambiente dell'osso, al fine di riprogrammare il fenotipo dei TAMs delle metastasi ossee.

#### **Risultati e conclusioni**

Nel corso dell'anno sono state sviluppate e studiate varie strategie di targeting mirato alle ossa per

veicolare un farmaco immunomodulante. Nel corso dello scorso anno erano state sviluppate e migliorate le tecniche di sintesi ed incapsulamento dei liposomi, nanoparticelle di natura organica, per cui si è proseguito a funzionalizzare la loro superficie con molecole che potessero conferire affinità alle ossa. In collaborazione con il Dip. Di Chimica dell'Università di Milano, sono state percorse diverse strade che ci hanno poi condotto ad un colesterolo modificato per legarsi alle ossa. Infatti i liposomi classici (NBL) e quelli modificati (BBL) presentano parametri paragonabili in termini di: dimensione (144,1 vs 136,9 nm), z potenziale (-11,26 vs -19,75) e indice di polidispersione (0,074 vs 0,091), efficienza di carico (62,96 vs 45,30%) in n=10 esperimenti di sintesi indipendenti. La cinetica di rilascio *in vitro* ha inoltre dimostrato la similarità delle due formulazioni con la ritenzione del 70% del farmaco nelle prime 2h, seguito da un lento rilascio che continua fino le 24h per gli NBL e che invece si interrompe prima per i BBL. Successivamente si è proceduto ad esporre cellule primarie macrofagiche ai liposomi funzionalizzati per caratterizzare la cinetica di internalizzazione, che ha un incremento esponenziale ed un picco massimo alle 48h; in parallelo, la caratterizzazione dei marcatori di superficie ha evidenziato come i macrofagi M0, esposti ai i BBL carichi di farmaco, subiscano uno shift del fenotipo e conseguente aumento di CD86, MHC-II (tipici degli M1) e riduzione del CD206 (tipico degli M2). L'analisi dell'espressione genica ha confermato l'attivazione trascrizionale dei macrofagi M0 e M2 ed incremento della trascrizione di geni M1 come *Nos2*, *Il12b* e *Il6*. Per dimostrare che l'effetto di switch fosse anche a livello proteico sono state analizzate e quantificate le citochine e chemochine secrete nel mezzo di coltura. Sia gli NBL che i BBL inducono la secrezione citochine pro-infiammatorie e di chemochine che sono responsabili del reclutamento di altre cellule del sistema immunitario, principalmente neutrofili e cell T.

Questo risultato è in linea con l'obiettivo della delivery dell'immunostimolante in prossimità del TME metastatico osseo.

Successivamente, sia gli NBL che i BBL sono stati usati per un esperimento di farmacocinetica *in vivo*, somministrando endovena una dose equivalente di farmaco libero; gli animali sono stati sacrificati a diversi tempi e gli organi prelevati per la quantificazione del farmaco mediante spettrometria di massa. I dati hanno evidenziato che gli NBL sono migliori dei BBL aumentando la biodisponibilità del farmaco nei vari tessuti analizzati. A confronto con la somministrazione del farmaco libero, gli NBL aumentano il  $t^{1/2}$  (il tempo al quale la concentrazione del farmaco si dimezza) per cui il farmaco resta per più tempo in circolazione. In particolare, il farmaco si

distribuisce in tutti i tessuti, arriva alle ossa ed in questa sede permane fino le 6h post trattamento; di contro, il raggiungimento al midollo osseo è limitato evitando una stimolazione non necessaria della sorgente di cellule immunitarie e quindi reazioni sistemiche.

Di questa formulazione verranno settate le condizioni per uno scale-up delle sintesi per ottenere le dosi necessarie per condurre gli studi *in vivo* di attività antitumorale su modelli di tumore primario e metastatico.

Verrà inoltre implementato un sistema di organ-on-chip, chiamata MIVO, per eseguire delle farmacocinetiche *in vitro* in grado di aiutarci nei prossimi screening di selezione dei pro-drug.

Infatti, sempre in collaborazione con UniMi è in corso di sviluppo la sintesi di coniugati bifosfonato-drug ed in parallelo verranno ingegnerizzati anticorpi coniugati al farmaco da indirizzare alle ossa.

In parallelo, in collaborazione con la prof.ssa De Cola, oltre a continuare a testare nanoparticelle inorganiche che possano essere utili al nostro scopo, cercheremo di ricoprire i liposomi con una corona di silice per aumentare ulteriormente la loro emivita e la disponibilità del farmaco in circolo.

**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 rationale**

La trombospodina-1 (TSP-1) è una proteina della matrice extracellulare che svolge una funzione chiave nell'organizzare il microambiente tumorale e coordina 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, in cellule tumorali e non. Nel microambiente, l'attività della TSP dipende dalla disponibilità dei suoi domini e dei rispettivi ligandi, e questo è in parte regolato da una proteolisi controllata della TSP-1 da parte di proteasi (contesto-specifiche) che liberano frammenti attivi della proteina.

Quando cellule tumorali migrano dal tumore primario e invadono altri tessuti (nel nostro caso l'osso) interagiscono con il microambiente, dando vita a fenomeni di regolazione reciproca delle diverse tipologie cellulari coinvolte. Le cellule tumorali possono proliferare e formare una massa metastatica, oppure rimanere dormienti anche per diversi anni e poi essere "risvegliate" da stimoli di molteplice natura. Nel microambiente osseo, cellule

metastatiche "attive" interagiscono con le cellule residenti, fra cui quelle responsabili del processo fisiologico di rimodellamento osseo. Nelle metastasi ossee osteolitiche, focus del nostro progetto di ricerca, la presenza di cellule metastatiche porta a una iper-stimolazione della produzione e attività degli osteoclasti, con conseguente eccessiva degradazione della matrice ossea. Evidenze in letteratura dimostrano il coinvolgimento della TSP-1 nella regolazione sia della dormienza cellulare di cellule tumorali, sia del rimodellamento osseo. Questo progetto ha quindi lo scopo di studiare il ruolo della TSP-1 nelle metastasi ossee osteolitiche in termini di: (i) effetto sull'osteoclastogenesi e degradazione della matrice ossea; (ii) rilascio di frammenti attivi della TSP-1 e (iii) regolazione della dormienza di cellule tumorali disseminate all'osso.

### **Risultati e conclusioni**

i) Negli anni precedenti avevamo 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. Avevamo inoltre dimostrato che tale frammento riduce significativamente il processo di differenziamento degli osteoclasti (osteoclastogenesi) in vitro. Proseguendo su questa linea di ricerca, abbiamo approfondito l'analisi del meccanismo dell'azione di TSP-1 e del suo frammento attivo, analizzando le conseguenze funzionali del legame di TSP-1 e suo frammento a due molecole fondamentali per il differenziamento degli osteoclasti, RANKL e OPG, che svolgono un'azione opposta su questo processo.

Nello specifico, abbiamo studiato la capacità di TSP-1 e del suo frammento di interferire con il legame di RANKL (il ligando fisiologico di RANK, che attiva il processo di differenziamento) al recettore RANK in sistemi cellulari e non. Inoltre abbiamo valutato come TSP-1 e il frammento interferiscono sulla cascata di segnali che, a seguito dell'attivazione del recettore RANK, portano al differenziamento e alla maturazione degli osteoclasti.

Abbiamo proseguito nello studio dell'interazione del frammento di TSP-1 con l'osteoprotegerina (OPG), inibitore fisiologico del legame RANK/RANKL e dell'osteoclastogenesi, per analizzare se il frammento alterasse l'azione inibitoria di OPG, e valutare l'impatto finale del frammento sul sistema

complesso RANK/RANKL/OPG.

Infine, abbiamo prodotto, per via ricombinante, i singoli domini della proteina TSP-1 presenti nel frammento già studiato, e abbiamo analizzato la loro capacità sia di legare RANK che di inibire l'osteoclastogenesi. È emerso che nessun singolo dominio è in grado di inibire il differenziamento degli osteoclasti in misura significativa come il frammento intero. Questo dato, che riflette l'elevata complessità strutturale e funzionale della TSP-1, suggerisce l'esistenza di meccanismi intramolecolari/intermolecolari complessi nella regolazione del processo di osteoclastogenesi da parte della TSP-1.

ii) Un meccanismo fisiologico di regolazione dell'azione della TSP-1 è il rilascio di frammenti e domini attivi a seguito di tagli proteolitici della molecola. La TSP-1 infatti viene fisiologicamente processata in sede extracellulare da diverse proteasi che liberano frammenti con funzioni biologiche specifiche. Per identificare i meccanismi che portano al rilascio del frammento attivo della TSP-1 nel microambiente osseo, è stata analizzata la capacità di diverse componenti cellulari presenti nel microambiente tumorale (sia cellule tumorali che cellule normali) di tagliare proteoliticamente la TSP-1 liberando frammenti attivi. I primi risultati indicano che mentre le cellule tumorali non sono in grado di degradare la TSP-1, cellule normali del midollo inducono il rilascio di un frammento con le stesse dimensioni del frammento attivo della TSP-1. Sono in corso studi per identificare gli enzimi proteolitici coinvolti.

iii) Infine abbiamo studiato se la TSP-1 fosse in grado di regolare la dormienza delle cellule tumorali nel microambiente osseo. In quest'ultimo anno abbiamo messo a punto un modello cellulare per studi in vitro e in vivo sulla dormienza delle cellule tumorali nel microambiente dell'osso. Le cellule tumorali sono state ingegnerizzate per esprimere una molecola fluorescente fusa a un marcatore della dormienza in modo che le cellule quiescenti possono essere visualizzate tramite il rilevamento di un segnale fluorescente. Questo modello, di cui abbiamo verificato la validità in vitro e vivo, è quindi uno strumento utile per lo studio dei processi cellulari e molecolari e del ruolo della TSP-1 nel controllo della dormienza tumorale nel microambiente osseo.

