

## **Resoconto delle principali attività svolte nell'ambito del progetto: Sviluppo preclinico e clinico di nuove terapie cellulari in oncologia L2P1287 (WFn109L2)**

L'introduzione in clinica di una nuova classe di farmaci, gli anticorpi immunomodulanti (anti-CTLA4 ed anti-PD1/PDL1), ha certamente rivoluzionato la pratica e la ricerca in oncologia dimostrando in maniera ancora più marcata rispetto a prima il ruolo del sistema immunitario nella battaglia contro i tumori. Oltre agli anticorpi immunomodulanti, rientrano nell'armamentario terapeutico numerose immunoterapie avanzate quali: vaccini anti-tumorali, terapie cellulari a base di linfociti (es. TILs, CAR-T) e virus oncolitici. In questo contesto la sfida dell'immunoterapia è oggi principalmente rappresentata dallo studio di combinazioni fra questi strumenti terapeutici al fine di migliorare l'efficacia e ridurre la tossicità.

Principali obiettivi del progetto volti ad espandere le potenzialità dell'immunoterapia nei tumori solidi:

1. Lo sviluppo di studi di combinazione che prevedano il trattamento con vaccino a cellule dendritiche ed anticorpi immunomodulanti (es. anti-PD1/PDL1) nel melanoma e in altri tumori solidi.
2. Il miglioramento del vaccino antitumorale a base di cellule dendritiche attualmente prodotto presso il nostro Istituto per renderlo fruibile ad un maggior numero di pazienti e aumentare la sua efficacia nel corso della neoplasia..
3. Lo sviluppo di prodotti di terapia cellulare alternativi al vaccino a cellule dendritiche quali linfociti infiltranti il tumore (TILs) o cellule natural killer che opportunamente selezionati ed espansi saranno poi rinfusi nel paziente e così utilizzati come effettori dell'attività antitumorale.

Uno degli obiettivi raggiunti dal progetto ha riguardato lo studio del **microambiente tumorale** nei pazienti affetti da **melanoma** che sono stati trattati con il **vaccino a cellule dendritiche** nel corso degli ultimi anni presso il nostro Istituto. A questo scopo, in laboratorio è stata implementata una tecnica di **immunoistochimica sequenziale** che consente di valutare, attraverso cicli di colorazione e decolorazione, l'espressione di diverse popolazioni immunitarie. Attraverso questa metodica è stato possibile studiare i **cambiamenti immunologici e le modifiche del fenotipo delle cellule di melanoma indotti dal trattamento**. Lo studio dell'eterogeneità della risposta immunologica è cruciale anche per identificare i meccanismi di resistenza non solo alle terapie immunologiche, ma anche a modalità terapeutiche basate sul targeting di bersagli molecolari (es. BRAF e MEK inibitori nei pazienti BRAF-mutati). Questo ci ha permesso di ottenere importanti risultati, pubblicati nell'Ottobre del 2019 sulla rivista *Frontiers in Immunology* (*Dendritic Cell Vaccination in Metastatic Melanoma Turns "Non-T Cell Inflamed" Into "T-Cell Inflamed" Tumors*. Bulgarelli J, Tazzari M, Granato AM, Ridolfi L, Maiocchi S, de Rosa F, Petrini M, Pancisi E, Gentili G, Vergani B, Piccinini F, Carbonaro A, Leone BE, Foschi G, Ancarani V,

Framarini M, Guidoboni M. *Front Immunol.* 2019 Oct 9;10:2353. doi: 10.3389/fimmu.2019.02353). In particolare, abbiamo osservato una forte modulazione indotta dal vaccino a livello del microambiente e una associata **iperespressione a seguito della vaccinazione del marcatore PDL1 sulle cellule tumorali stesse.**

I risultati di questo studio hanno fatto così da apripista all'introduzione nella clinica della combinazione del vaccino a cellule dendritiche con l'anticorpo anti-PDL1. E' stato infatti aperto un nuovo protocollo clinico (MesoVax) che prevede, per i pazienti affetti da mesotelioma maligno negativi a PDL1, un trattamento di combinazione con vaccino antitumorale a base di cellule dendritiche e anticorpo anti-PDL1. Questo protocollo ha ricevuto l'approvazione di AIFA e ad inizio 2020 ha permesso di trattare i primi due pazienti con il nuovo approccio di combinazione.

Un importante obiettivo che stiamo realizzando grazie a questo progetto rappresenta l'innovazione del vaccino con la tecnologia delle nanoparticelle caricate con RNA tumorale autologo. S. In laboratorio stiamo testando la possibilità di isolare l'RNA tumorale da una biopsia, amplificarlo e caricarlo all'interno di particelle liposomiali che saranno poi messe a contatto con le cellule dendritiche del paziente e utilizzate quindi per "educare" le stesse a riconoscere il tumore. Attualmente per la preparazione del vaccino si rende necessario partire da grandi quantità di tessuto tumorale prelevate tramite chirurgia, limitando a volte l'utilizzo di questo approccio.

Grazie alla quantità ridotta di tessuto tumorale fresco, questa nuova tecnologia consentirà di ampliare la quota di pazienti che potranno beneficiare di questo trattamento e permetterà di "aggiornare" il vaccino durante il corso della terapia, permettendo anche di superare i meccanismi di resistenza alla stessa. Questo consentirà anche di combinare più facilmente il vaccino con altre terapie attualmente disponibili (es. altri tipi di immunoterapia e terapia con inibitori di BRAF e MEK).

Inoltre, all'interno della nostra officina farmaceutica di terapie immunologiche avanzate, stiamo lavorando all'ottimizzazione di protocolli per l'espansione di linfociti infiltranti il tumore e cellule natural killer. In particolare, stiamo definendo quali sono le condizioni migliori per la loro produzione in larga scala secondo pratiche di produzione adatte alla somministrazione nel paziente. Inoltre, stiamo collaborando con il Prof. Paganelli (responsabile IRST della medicina radiometabolica) per la generazione di una terapia cellulare avanzata basata sull'utilizzo del sistema avidina-biotina, che possa permettere di uccidere le cellule tumorali non direttamente riconosciute da effettori immunologici creati in laboratorio permettendo di superare la resistenza ai diversi tipi di terapia disponibili attualmente per il melanoma metastatico.