

# ISTITUTO GIUSEPPE TONIOLO

## DI STUDI SUPERIORI

ENTE FONDATORE DELL'UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE

**BANDO DI CONCORSO “CELESTINA LOSA”**  
per l'assegnazione di 3 BORSE DI RICERCA sul tema:  
**«Nuove opzioni terapeutiche per i pazienti con medulloblastoma:  
l'immunoterapia adottiva diretta verso l'antigene tumorale prame»**

### ALLEGATO 2

#### DESCRIZIONE SCIENTIFICA DEL PROGETTO E OBIETTIVI

##### **ABSTRACT DEL PROGETTO**

Nel tentativo di offrire maggiori possibilità di guarigione ai pazienti affetti da medulloblastoma, si è ipotizzato di sviluppare un approccio di immunoterapia come nuova ed efficace strategia per curare i tumori cerebrali in virtù dei notevoli successi raggiunti in alcuni *trial* clinici nei quali si è ampiamente dimostrato il chiaro potenziale di tale terapia. In particolare, tale approccio terapeutico mira a *insegnare al sistema immunitario come combattere il cancro*. Infatti, questa strategia tende a rafforzare il sistema immunitario dei malati attraverso anticorpi o vaccini (per lo più creati in laboratorio sulla base delle caratteristiche delle cellule cancerose) che «insegnano» così all'organismo come aggredire le cellule malate. Tale approccio è basato sulla caratterizzazione fenotipica e/o genotipica della cellula neoplastica al fine di evidenziare le peculiarità che la differenziano in maniera sostanziale dalla cellula nervosa non neoplastica. Tali caratteri distintivi vengono considerati dei potenziali *target* per un approccio di immunoterapia, poiché si cercherà di attivare il sistema immunitario del paziente proprio a riconoscere questi ultimi. Tra i diversi *target* oggi noti che caratterizzano i tumori cerebrali, nel progetto ci si riferisce alla proteina PRAME (Proteina Preferenzialmente Espressa nel Melanoma). Tale proteina è stata scoperta per la prima volta nei pazienti affetti da melanoma, ma oggi la sua presenza è stata dimostrata in tumori del sistema ematologico (leucemie e linfomi), nonché nei tumori solidi, come carcinomi della mammella e del polmone, osteosarcomi, medulloblastomi, neuroblastomi. Inoltre, è stato provato che la presenza di tale proteina correla strettamente con una cattiva prognosi per il paziente.

Come attivare, quindi, il sistema immunitario a riconoscere ed eliminare quelle cellule neoplastiche che presentano PRAME? Nel presente progetto ci si servirà di cellule del sistema immunitario definite cellule T citotossiche, che verranno selettivamente e specificamente attivate in laboratorio verso porzioni ben definite della proteina PRAME. Una volta ottenuti linfociti citotossici specifici per PRAME, verranno selezionati dei cloni T che abbiano la più elevata attività antitumorale, al fine di caratterizzarne il recettore TCR, da cui deriva direttamente la specificità del linfocita T. Tale caratterizzazione permetterà di ridirigere verso il tumore i linfociti T derivanti dal paziente stesso in un approccio di immunoterapia cellulare adottiva, nel quale la cellula T modificata viene re-infusa al paziente per ottenere il "rigetto" del tumore.

## **DESCRIZIONE DEL PROGETTO**

### **Contesto e motivazioni**

Il medulloblastoma è il tumore del Sistema Nervoso Centrale più frequente dei bambini ed è altamente aggressivo. Nonostante approcci terapeutici multidisciplinari, rappresentati da neurochirurgia, radioterapia e chemioterapia, la mortalità per questa neoplasia si aggira ancora attorno al 30-40% e frequentemente i bambini guariti presentano deficit neurologici, cognitivi, endocrinologici legati ai trattamenti. In caso di fallimento dei trattamenti di prima linea, il medulloblastoma in recidiva rimane ad oggi una malattia poco curabile. Questi pazienti, quindi, potrebbero beneficiare di trattamenti immunoterapeutici, con lo scopo di eliminare le cellule neoplastiche residue e di controllare l'espansione del tumore.

A tale scopo, si verificherà la fattibilità di un protocollo di immunoterapia adottiva per pazienti affetti da medulloblastoma incentrata sul bersaglio molecolare PRAME. L'antigene PRAME, o antigene preferenzialmente espresso nel melanoma, è stato originariamente identificato come un gene codificante per peptidi antigenici presentati mediante HLA-A24 e capaci di stimolare linfociti citotossici (CTL) tumore specifici derivanti da un paziente affetto da melanoma. Il profilo di espressione di PRAME permette di classificarlo come appartenente alla categoria degli antigeni tumorali del testicolo (CTA). Gli antigeni CTA sono codificati da geni non-mutati espressi ad alti livelli nei tessuti germinali, ma assenti o presenti a livelli molto bassi negli altri tessuti di soggetti adulti. Il laboratorio di Immunoterapia dei tumori ha dimostrato in diversi lavori scientifici pubblicati che è possibile generare in vitro CTL specifici per PRAME a partire da donatori sani o pazienti con leucemia caratterizzati dall'aplotipo HLA-A\*002. In particolare, la Dott.ssa Quintarelli (ricercatore senior del laboratorio di Immunoterapia) ha dimostrato che l'espansione ex-vivo di linfociti T PRAME-specifici è possibile anche mediante l'utilizzo di un mix di 125 penta-decapeptidi derivanti dall'antigene bersaglio, senza una loro restrizione HLA. Tale approccio, consentirebbe di generare un protocollo di immunoterapia basato sul bersaglio antigenico PRAME, senza una particolare restrizione HLA del paziente.

## **OBIETTIVI DEL PROGETTO**

- 1) Studiare la frequenza di espressione dell'antigene PRAME in tessuti primari di medulloblastoma;
- 2) Studiare la fattibilità di espandere linfociti T specifici per PRAME a partire da raccolte aferetiche di pazienti pediatrici affetti da medulloblastoma ed arruolati presso le unità coinvolte nel progetto;
- 3) Generare vettori retrovirali clinicamente applicabili, per indurre l'espressione di molecole TCR specifiche per PRAME in popolazioni T policlonali derivanti da pazienti affetti da medulloblastoma.

## **DISEGNO SPERIMENTALE E METODOLOGIE DEL PROGETTO**

### **Aspetti Bio-Etici**

Per la realizzazione degli studi sperimentali associati al progetto proposto, verrà effettuato un prelievo di sangue periferico (PB) di circa 20 ml (o di una quantità compatibile al peso del paziente) al momento della diagnosi o dell'ospedalizzazione del paziente, prima dell'inizio della terapia convenzionale. In particolare, il sangue verrà collezionato allo stesso tempo di quello necessario per la routine clinica e diagnostica. I tessuti patologici del paziente eccedenti rispetto alla pratica clinica, verranno impiegati nel progetto per la tipizzazione dell'espressione dell'antigene bersaglio.

### **OBIETTIVO 1: Studiare la frequenza di espressione dell'antigene PRAME in tessuti primari di medulloblastoma**

#### **Razionale e Disegno sperimentale**

La prima fase del progetto sarà dedicata alla valutazione della percentuale di casi di pazienti affetti da medulloblastoma che potrebbero beneficiare di un intervento immunoterapeutico basato sul bersaglio antigenico PRAME. In particolare, il laboratorio di immunoterapia dei tumori valuterà l'espressione dell'antigene PRAME sia a livello di mRNA che di proteina, utilizzando saggi di PCR in real-time su campioni di acido nucleico crio-preservati alla diagnosi, sia mediante immunistochimica su preparati fissati in paraffina. Tale studio ci consentirà di definire le caratteristiche cliniche e prognostiche dei pazienti affetti da medulloblastoma che potrebbero essere trattati con una terapia a cellule T adottiva specifica per PRAME. Requisito fondamentale infatti per l'ottenimento di una risposta clinica nel paziente è avere un bersaglio antigenico con una elevata espressione nel tessuto tumorale.

## **Metodologie**

L'mRNA verrà purificato da tessuti di medulloblastoma di pazienti arruolati presso le unità cliniche coinvolte mediante l'utilizzo di RNeasy Micro Kit. Un microgramma di RNA totale sarà retrotrascritto utilizzando l'enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase. PCR quantitativa sarà eseguita utilizzando saggio TaqMan specifico per amplificare mRNA di PRAME e di un gene di controllo, come l'actina. Il saggio di PCR quantitativa sarà eseguito utilizzando lo strumento ABI PRISM 7900. Inoltre, procederemo a valutare in tutti i pazienti arruolati l'espressione della proteina PRAME mediante test immunocistochemico eseguito su tessuti alla diagnosi del paziente affetto da medulloblastoma, utilizzando una metodica indiretta e un anticorpo primario di coniglio diretto contro l'antigene umano PRAME. Tale metodica è stata già testata e validata dal nostro gruppo su sezioni tumorali di pazienti affetti da neuroblastoma.

### ***Distribuzione Temporale degli Obiettivi della fase 1 e loro verifica in tempo reale:***

- 1) *0-24 mesi:* raccolta di tessuti tumorali dopo asportazione chirurgica e loro crio-preservazione;
- 2) *0-24 mesi:* raccolta di materiale biologico paraffinato derivante da pazienti affetti da medulloblastoma;
- 3) *12-24 mesi:* estrazione degli acidi nucleici e valutazione molecolare dell'espressione di PRAME;
- 4) *0-24 mesi:* analisi immunocistochemica dell'espressione dell'antigene PRAME.

**OBIETTIVO 2: Studiare la fattibilità di espandere linfociti T specifici per PRAME a partire da raccolte aferetiche di pazienti pediatrici affetti da medulloblastoma e arruolati presso le unità coinvolte nel progetto.**

### ***Razionale e Disegno sperimentale***

Per isolare linfociti T citotossici ad elevata affinità per l'antigene PRAME in pazienti affetti da medulloblastoma, ci proponiamo di espandere progenitori T specifici per PRAME da campioni di sangue periferico di pazienti arruolati dalle Unità coinvolte nel progetto.

### ***Metodologie***

In lavori scientifici, si è dimostrata la fattibilità di espansione in vitro di linfociti T CD8+ con elevata specificità per PRAME a partire da donatori sani o pazienti con leucemia utilizzando peptidi restretti per HLA\*A002 o una libreria peptidica di 125 peptidi specifici per l'antigene PRAME. Il Laboratorio di Immunoterapia dei tumori adatterà tale approccio per espandere in vitro linfociti citotossici CD8+ o CD4+ a partire da pazienti affetti da medulloblastoma. A tale fine, verranno messe a punto le condizioni sperimentali utilizzando sangue periferico derivante da donatori sani caratterizzati dai più comuni alleli di HLA di classe I e classe II. In particolare, verranno eseguite delle colture differenziate selezionando le cellule CD14+, CD8+ e CD4+ mediante tecnologia biglia magnetica (Miltenyi): dalla frazione CD14+ verranno generate cellule dendritiche (DC) mediante

l'utilizzo di un cocktail di citochine (GM-CSF, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL12), per essere utilizzate come cellule presentanti l'antigene (APC). La seguente strategia verrà usata per l'espansione e il priming delle cellule T: prima/seconda stimolazione utilizzando DC come APC, caricate con la libreria dell'antigene PRAME, in combinazione con la stimolazione mediata da un cocktail di citochine pleiotropiche (IL2, IL7, IL15); a questo punto verrà eseguita un'ulteriore stimolazione in vitro utilizzando OKT-3 T cellule (ovvero linfociti T attivati policlonalmente mediante stimolazione del loro CD3 di membrana) come APC. Alla fine della terza stimolazione, le cellule T verranno caratterizzate per la loro specificità verso l'antigene tumorale utilizzando test funzionali quali il saggio di citotossicità per rilascio di Cromo radioattivo, saggio ELISPOT per la produzione di Interferone gamma. Per identificare il peptide di 15 aminoacidi che nella coltura sia risultato immunogenico per un determinato paziente, le linee T generate saranno testate contro i peptidi della libreria suddivisi in differenti pool. Quando si sarà individuato un singolo pool positivo, sarà caratterizzata la specificità di ciascun peptide del pool, al fine di individuare il singolo peptide di 15mer derivante dall'intera proteina di PRAME capace di stimolare in vitro linfociti T antigene specifici. Per individuare la sequenza immunogenica minimizzata del peptide, peptidi di 8-10 aminoacidi saranno sintetizzati e utilizzati come target.

#### **Distribuzione Temporale degli Obiettivi della fase 2 e loro verifica in tempo reale:**

- 1) *0-6 mesi*: ottimizzazione delle condizioni di coltura per espandere cellule T CD8+ o CD4+ PRAME-specifiche dal sangue periferico di donatori sani;
- 2) *6-24 mesi*: generazione di linfociti T PRAME-specifici a partire da sangue periferico di pazienti affetti da medulloblastoma;
- 3) *12-24 mesi*: identificazione di nuovi peptidi antigenici derivanti dalla proteina PRAME capaci di stimolare linfociti T ad elevata attività antitumorale verso cellule di medulloblastoma.

**OBIETTIVO 3: Generare vettori retrovirali clinicamente applicabili, per indurre l'espressione di molecole TCR specifiche per PRAME in popolazioni T policlonali derivanti da pazienti affetti da medulloblastoma.**

#### **Razionale e Disegno sperimentale**

È possibile modificare la specificità di una popolazione policlonale di cellule T mediante la loro modifica genetica con geni codificanti per la catena alfa e beta del recettore della cellula T (TCR) umana. Tale approccio consente di superare la difficoltà di dover isolare ex-vivo linfociti T ad elevata affinità per il target tumorale per ciascun paziente da trattare. In particolare, nel nostro progetto ci prefiggiamo di clonare molecole TCR ad alta avidità/affinità per l'antigene PRAME, derivanti da linfociti T espansi ex-vivo da pazienti affetti da medulloblastoma e caratterizzati da un HLA di classe I più comunemente riscontrato nella popolazione caucasica (HLA-A\*0201, -A\*0101, -B\*3501 and -B\*0702).

## **Metodologie**

Cellule T clonali saranno generate a partire da linee CD8+ citotossiche ottenute dopo la stimolazione ex-vivo delle cellule del sangue periferico derivanti da pazienti affetti da medulloblastoma. In particolare, considereremo in questa fase del progetto solo le linee T specifiche per PRAME che abbiamo mostrato una elevata reattività quando esposte a cellule di medulloblastoma HLA ristrette. Cellule T clonali saranno ottenute mediante diluizione seriale delle cellule in piastre da 96 pozzetti e stimolando queste ultime mediante cellule allogene, anticorpi anti-CD3 e anti-CD28 e citochine come IL2. La specificità dei cloni espansi sarà testata in saggi funzionali come Elispot per Interferone gamma dopo stimolazione con peptidi derivanti dalla proteina PRAME. Dopo aver selezionato i cloni con la più elevata reattività verso cellule HLA-ristrette di medulloblastoma, si procederà a clonare la catena alfa e beta del TCR mediante PCR 5'-RACE per frammenti di DNA con estremità 5' non nota. Una volta ottenuta la sequenza delle catene alfa e beta, si procederà alla ottimizzazione dei codoni e all'inserzione di una cisteina al C-terminale delle catene al fine di ridurre quanto più possibile l'associazione tra TCR nativo e transgenico. La cassetta genica del TCR sarà clonata in frame all'interno di un vettore retrovirale e sovrantante virale sarà prodotto utilizzando la cellula packaging 293T. Cellule T policlonali derivanti da pazienti affetti da medulloblastoma con un HLA ristretto a quello del paziente da cui il TCR è stato generato, saranno geneticamente modificate utilizzando trasduzione virale, e testate per la loro attività antitumorale verso cellule tumorali autologhe criopreservate alla diagnosi.

## **Distribuzione Temporale degli Obiettivi della fase 3 e loro verifica in tempo reale:**

- 1) *12-18 mesi*: selezione di cloni T PRAME-specifici dalle linee T citotossiche ottenute da pazienti affetti da medulloblastoma;
- 2) *18-20 mesi*: RACE-PCR per ottenere le sequenze delle catene alfa e beta del TCR specifico per PRAME;
- 3) *20-24 mesi*: studio funzionale dei linfociti T geneticamente modificati con un TCR specifico per PRAME;

## **Rilevanza del progetto nel contesto dei pazienti affetti da medulloblastoma**

I tumori cerebrali rappresentano la causa più frequente di morte associata a cancro nei bambini. Nonostante le terapie multi-modali aggressive e altamente tossiche comprendenti approcci chirurgici, radioterapici, chemioterapici e trapianto delle cellule staminali emopoietiche autologhe periferiche, circa il 30-40% dei bambini affetti da medulloblastoma presentano una recidiva di patologia. Inoltre, pazienti che sopravvivono ai trattamenti spesso presentano deficit neurologici, cognitivi ed endocrinologici invalidanti. Lo sviluppo di terapie efficaci e tumore-specifiche che non aggiungano altra tossicità ai trattamenti già attuati è un bersaglio da perseguire per il miglioramento clinico del paziente affetto da medulloblastoma. Approcci di

immunoterapia adottiva con bersagli antigenici tumore-specifici espressi ad elevati livelli all'interno dei tessuti neoplastici sono interventi terapeutici estremamente interessanti da dover perseguire. Nonostante i considerevoli vantaggi e risultati clinici promettenti osservati con studi di immunoterapia in adulti affetti da tumori cerebrali, i tentativi in ambito pediatrico sono estremamente limitati. Ciò è principalmente dovuto alla rarità della patologia neoplastica in età pediatrica, alla scarsità di tessuto tumorale disponibile e alla mancanza di un valido bersaglio antigenico.

Nel nostro progetto, grazie alla stretta collaborazione tra i centri arruolanti e i laboratori per il processamento dei campioni, ci prefiggiamo di superare la limitazione relativa al campione biologico (numerosità dei pazienti e disponibilità di tessuto per le valutazioni preliminari). Al termine di tale progetto, sarà possibile verificare la fattibilità di una terapia immunitaria per pazienti affetti da medulloblastoma, e saranno raccolti i dati preclinici necessari per sottoporre lo studio a valutazione da parte degli organi competenti per la registrazione di uno studio clinico.

**Milano, 13 maggio 2015**