

MODELLI PRE-CLINICI IN ONCOLOGIA: DALLO SVILUPPO DI NUOVI FARMACI ANTI TUMORALI VERSO UNA MEDICINA DI PRECISIONE EFFICACE CONTRO IL CANCRO

Tatangelo L.¹, De Angelis L.¹, De Angelis F.¹, Stefani M.¹, Virnicchi G.¹, Sandri A.¹, Roscelli G.², Muzi A.², Ferrara F.², Cappelletti M.², Bucci F.², Arriga R.², Serrao S. M.², Pavoni E.², Principato E.², Baldari S.³, Balzano V.³, Campo G.³, D'Ambrosio L.⁴, Toietta G.³, Nisticò P.³, De Angelis B.⁵, Quintarelli C.⁵, Pezzella M.⁵, Guercio M.⁵, Quadraccia M. C.⁵, Moroni N.⁵, Locatelli F.⁵

¹Plaisant Animal Facility Outsourcing & Experimental Research Support, Tecnopolo Castel Romano, 00128 Rome, Italy
²Takis Biotech, Tecnopolo Castel Romano, 00128 Rome, Italy
³Tumor Immunology and Immunotherapy Unit and ⁴Biostatistics, Bioinformatics and Clinical Trial Center, IRCCS - Regina Elena National Cancer Institute, 00144 Rome, Italy
⁵Department of Pediatric Onco-Hematology and Transfusion Medicine, Bambino Gesù Ospedale Pediatrico, Rome Italy
⁶Process Development Menarini Biotech, Rome Italy

L'Avviso Pubblico "Progetti Strategici 2019" - POR FESR Lazio 2014-2020 ha agevolato la costituzione del partenariato in effettiva collaborazione per l'attuazione del progetto comune denominato IMMUNO centrato per lo sviluppo, innovazione e disseminazione di tre diverse linee di ricerca descritte di seguito. L'idea progettuale ed il relativo programma di investimento nascono dalla fattiva collaborazione tra Organismi di Ricerca quali Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (OPBG), l'Istituto Nazionale Tumori Regina Elena (IFO) e aziende Biotech come Plaisant, Takis e Menarini. Plaisant partecipa alla realizzazione dei tre studi sperimentali, attraverso l'esecuzione di diverse tipologie terapeutiche che differiscono per modello sperimentale ma prevedono l'utilizzo dello stesso ceppo di topi immunodeficienti i NOD/SCID/IL2rnull (NSG). Il dato sperimentale concorrerà all'implementazione di una piattaforma per lo sviluppo di nuove terapie in ambito oncologico, sfruttando l'applicazione di cellule CAR-T e anticorpi monoclonali e alla possibilità di ottenere un eventuale brevetto su un modello murino umanizzato e fenotipicamente caratterizzato. Plaisant fornisce il supporto sperimentale adeguato allo studio *in vivo*, occupandosi delle procedure sperimentali per la generazione dei diversi modelli murini al fine di mimare le patologie in studio e l'elaborazione del dato sperimentale ottenuto *in vivo*. La messa in pratica della specializzazione acquisita negli anni da Plaisant, permetterà lo sviluppo e l'opportunità di pubblicare un modello animale con evoluzioni sperimentali di notevole interesse che possono rilevarsi per Plaisant una forma di rilancio verso un'attività di ricerca e sviluppo efficace per incrementare future collaborazioni con enti di Ricerca Nazionali e Internazionali.



CARSA

Progetto di RSI denominato "Sviluppo di una piattaforma di immunoterapia per il trattamento dei pazienti affetti da sarcoma" - Acronimo: CARSA
 Aggregazione in Effettiva Collaborazione tra OPBG, IFO, TAKIS, PLAISANT
 Codice CUP: E82F20000240002 ; Domanda n. A0320-2019-28114 del 26/07/2019

Sviluppo e ottimizzazione di un modello murino di sarcoma umano, con il fine di sviluppare una terapia genica basata sulla generazione di anticorpi e/o cellule T geneticamente modificate con un recettore chimerico antigenico (CART) selettivi verso l'antigene tumorale HER3.

L'obiettivo generale del progetto CARSA è sviluppare prototipi di terapia genica basati sulla generazione di cellule geneticamente modificate per esprimere recettori chimerici per l'antigene HER-3 "HE3-CAR" per il trattamento dei pazienti affetti da sarcoma. In questo contesto Plaisant ha testato la crescita di tre linee di sarcoma esprimenti l'antigene HER3: ES-4 (linea di sarcoma di Ewing), RD (linea di rhabdomyosarcoma) e SAOS-2 (linea cellulare di osteosarcoma primario). L'analisi delle curve di crescita avrà come fine la definizione delle condizioni sperimentali ottimali da eseguire sul modello *in vivo* (ceppo NSG) per procedere alla somministrazione dell'anticorpo e del CAR-T in sviluppo da Takis e OPBG.

Sono stati presi in considerazione diversi tipi di inoculo: sottocute per tutte e tre le linee cellulari testate (via eterotopica) [FIG.1], intramuscolo quadrupite per le cellule RD e intraperitoneo tibiale per le cellule SAOS-2 (vie ortotopiche) [FIG.2].

Tutte le linee tumorali prese in esame sono modificate geneticamente per l'espressione del gene Fire Fly Luciferase, ciò ha permesso il monitoraggio delle dinamiche di crescita mediante l'analisi della bioluminescenza che prevede l'uso della luciferina e un sistema di imaging *in vivo* (IVIS) [FIG.1 e 2]. I tumori sottocutanei sono stati anche calibrati con cadenza bisettimanale [FIG.1].

Fig.1

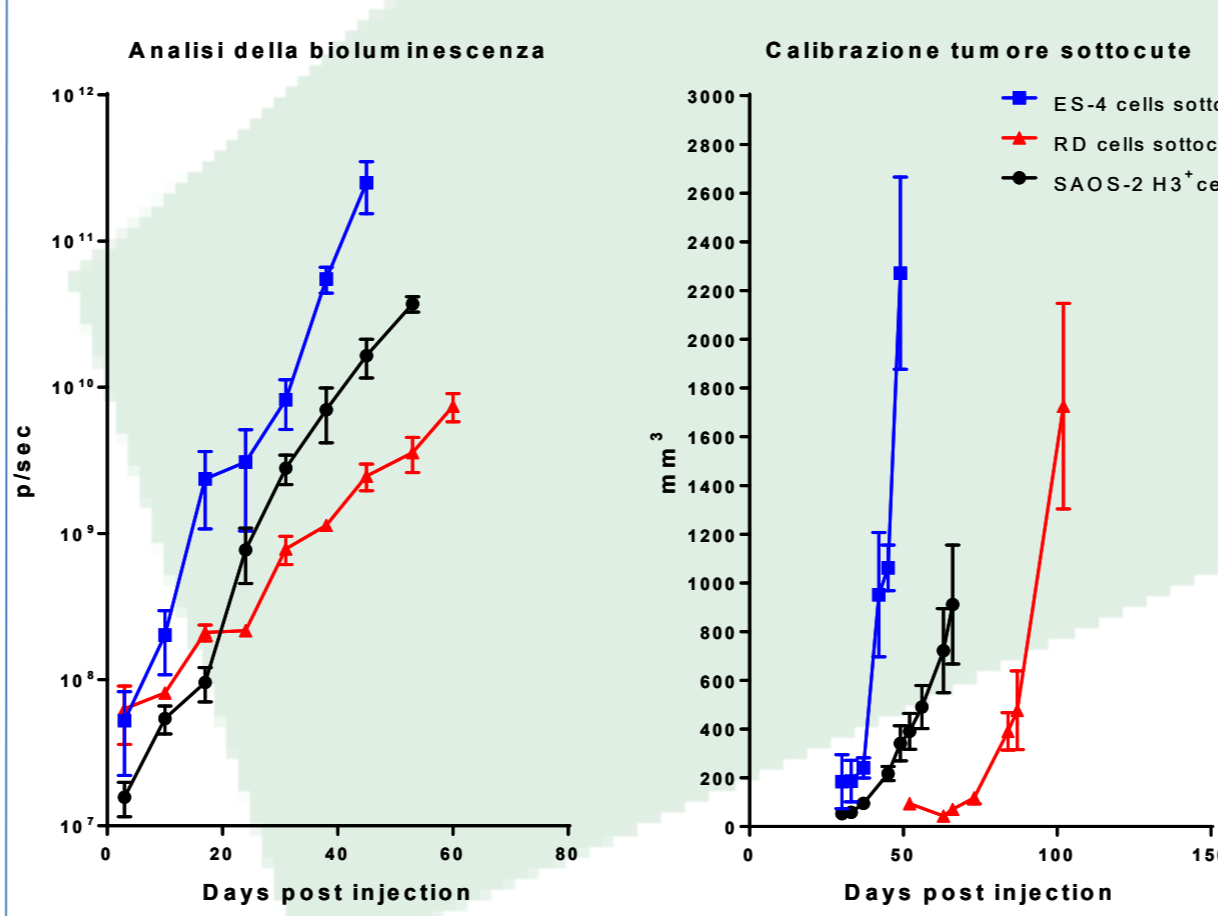
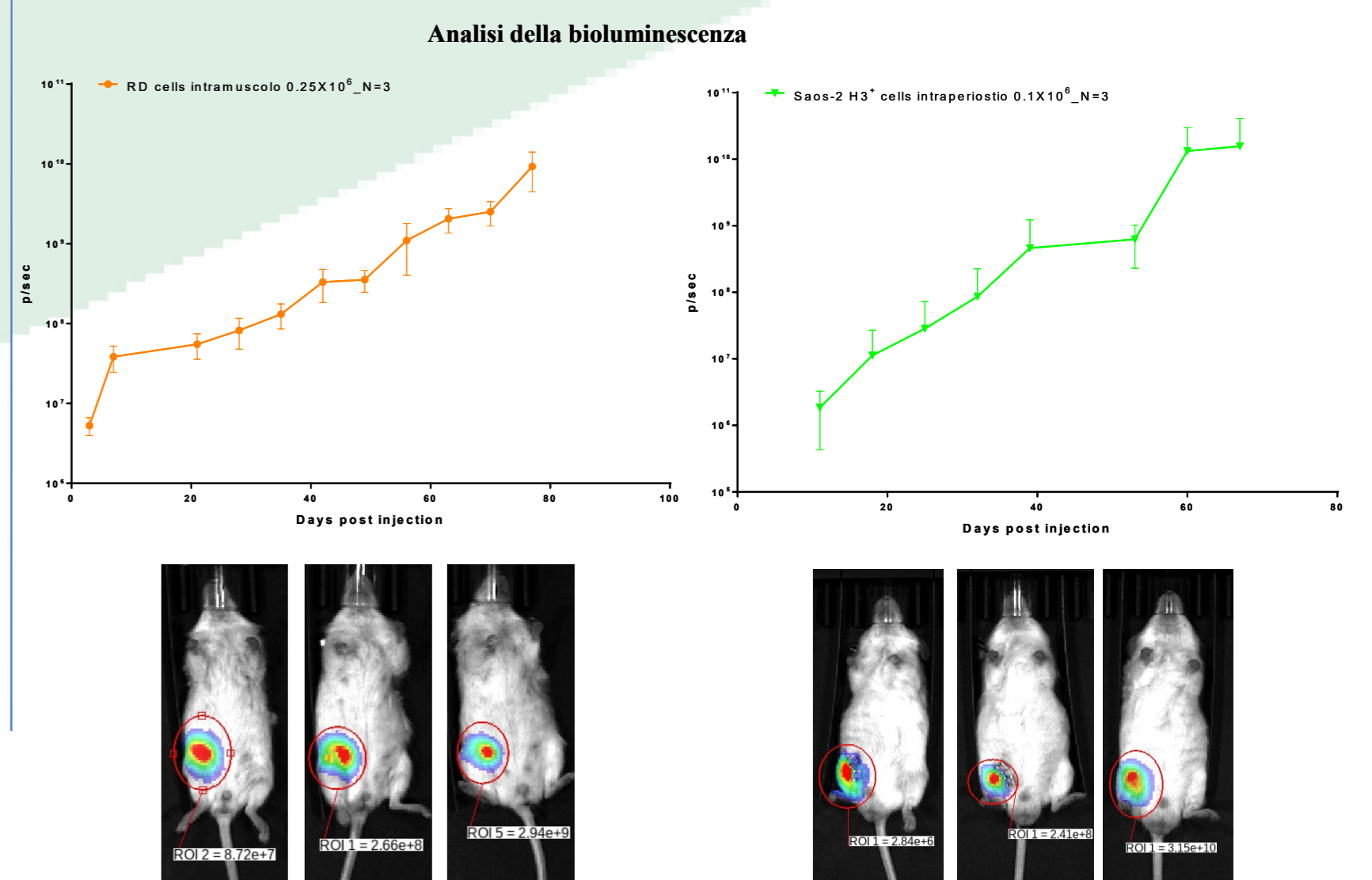


Fig.2



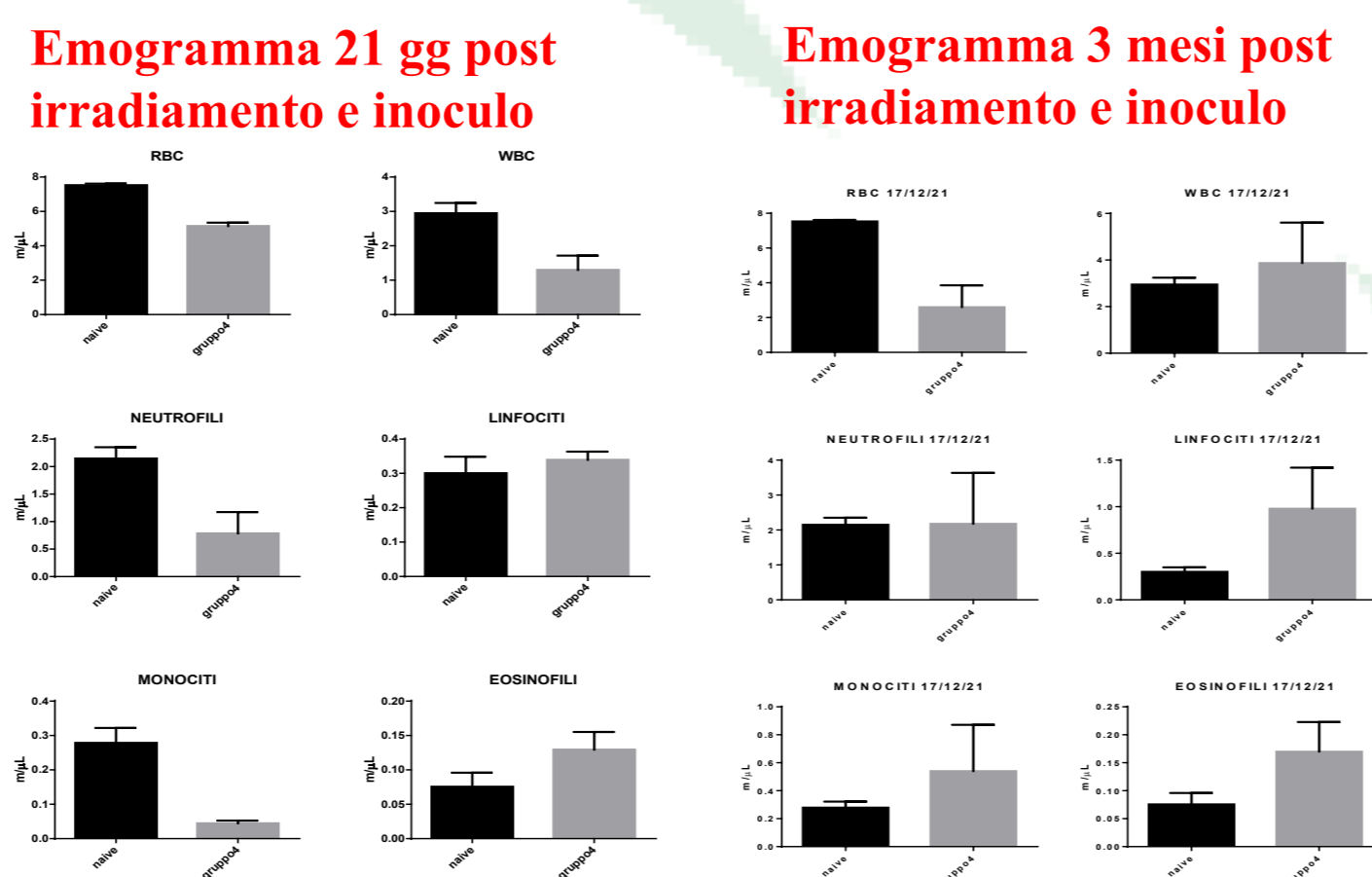
HuMAD

Progetto di RSI denominato "Humanized Mouse for Antibody Discovery" - Acronimo: HuMAD Aggregazione in Effettiva Collaborazione tra OPBG, TAKIS, IFO e PLAISANT. Codice CUP: E82F20000230002
 Domanda n. A0320-2019-28102 del 26/07/2019

Generazione di un modello murino umanizzato per la produzione di anticorpi monoclonali diretti contro l'antigene CEA (antigene carcino embrionale). Lo studio ha la finalità di sviluppare un nuovo modello animale per la generazione di anticorpi monoclonali completamente umani per il trattamento di pazienti oncologici, come ad esempio quelli che mostrano una sovraespressione di CEA.



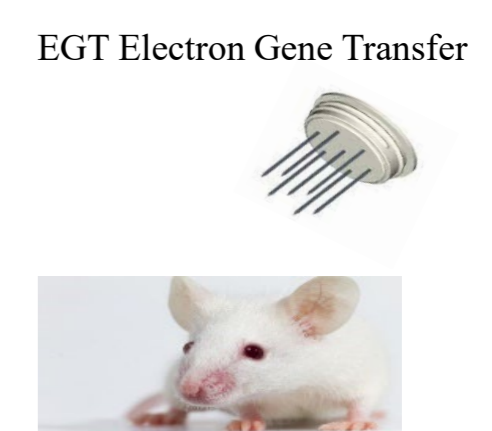
Irradiamento con raggi x per la deplezione del midollo del ceppo NSG di 4-5 settimane di età e ripopolamento del midollo con hCD34 fornite da Takis. Adozione di una profilassi antibiotica per l'eventuale insorgenza d'infezioni microbiche secondarie.



Controllo quantitativo della componente ematica in animali irradiati e trapiantati (conta globuli con 20 ul di sangue in toto gestito da automatico URIT mod.5160 vet).

Si riscontra uno stadio di leucopenia e leggera anemia causata dall'esposizione di radiazioni X a ridosso di 3 settimane post irradiamento. La tendenza a risolvere lo stato di anemia, si evidenzia dopo circa 40 giorni, mentre, valori in linea con il controllo naive con un incremento della componente leucocitaria è evidenziato a tre mesi dall'irradiamento e trapianto. L'aumentata percentuale di engraftment è confermata dal controllo al FACS per la tipizzazione di hCD45.

Immunizzazione



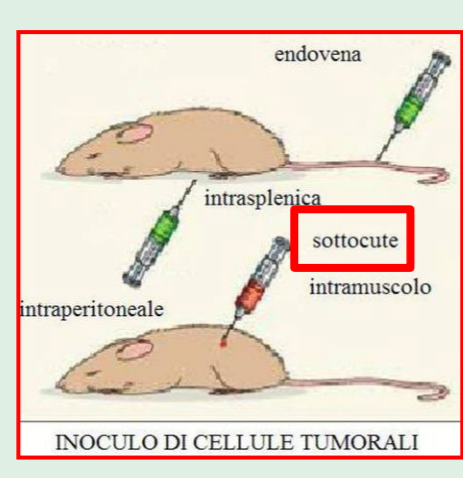
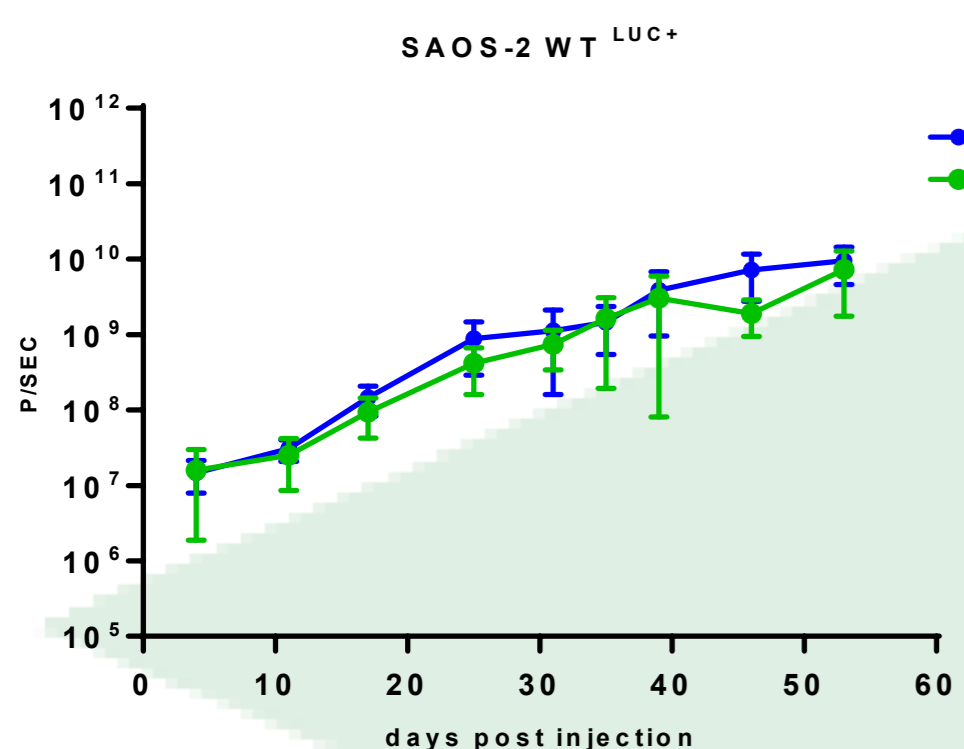
Sviluppo di isotipi anticorpali umani di deriva staminale umana. Si procede con l'immunizzazione previa stimolazione citochinica, alterando per via IP Ovoalbumina di pollo e elettroporando con Eletto Gene Transfer un mix di proteine umane ricombinanti CEA e EGFRvIII

GEMMA

Progetto di RSI denominato "Generazione di nuovi CAR T e BiTE per convertire il Microambiente tuMorAle" - Acronimo: GEMMA
 Aggregazione in Effettiva Collaborazione tra OPBG, IFO, TAKIS, PLAISANT e Menarini Biotech
 Codice CUP: E82F20000220002; Domanda n. A0320-2019-28097 del 26/07/2019

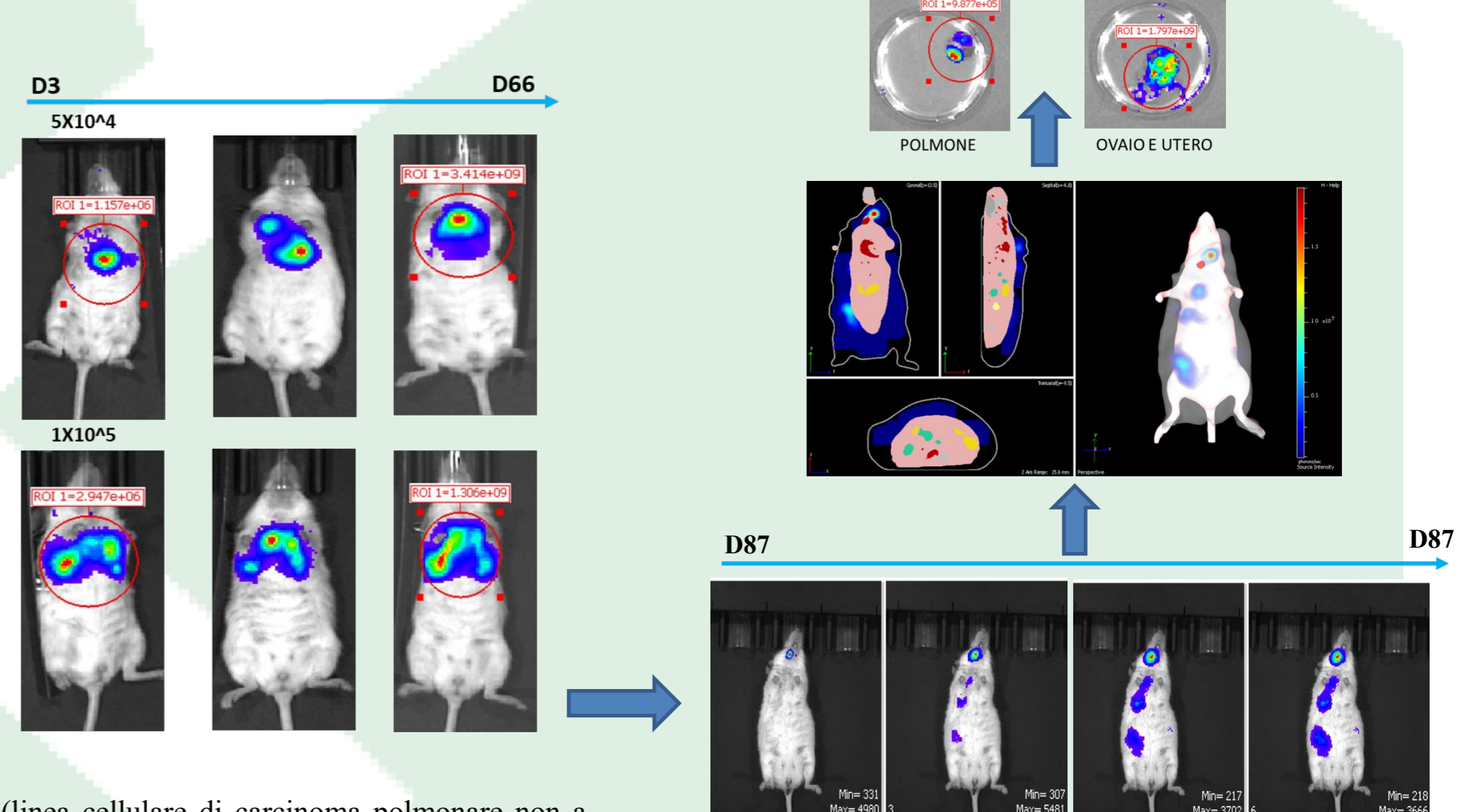
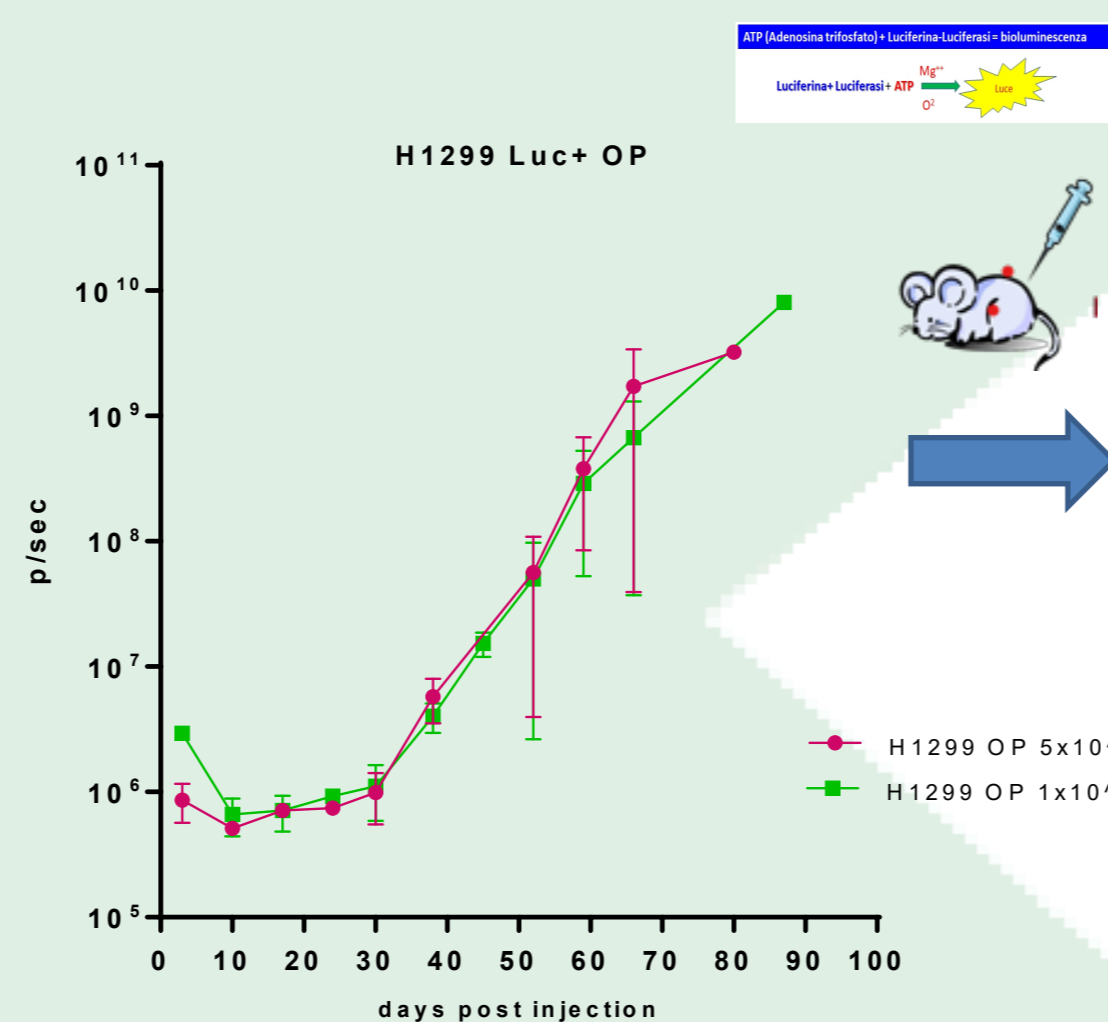
Generazione e applicazione *in vivo* di CAR-T e BiTEs (bi-specific T-cell engagers) rivolti contro componenti immunosoppressori del microambiente tumorale in tumori solidi polmonari (NSCLC, non-small-cell-lung-carcinoma).

CURVE DI CRESCITA TUMORE SOTTOCUTANEO SAOS-2 WT LUC+



Curve di crescita tumorale relative all'inoculo sottocutaneo di cellule SAOS-2 WT (human primary osteogenic sarcoma). Nel grafico viene illustrato l'andamento del segnale bioluminescente (p/sec) relativamente al tempo (giorni) che segue all'inoculo delle cellule. Le due curve sono relative ai due gruppi sperimentali analizzati uno di controllo con il solo tumore e l'altro con il tumore + il trattamento.

CURVE DI CRESCITA ORTOTOPICO POLMONARE H1299^{LUC+} ED ANALISI IN BIOLUMINESCENZA 2D/3D CON IVIS SPECTRUM



Curve di crescita relative all'inoculo di cellule H1299 (linea cellulare di carcinoma polmonare non a piccole cellule umana) in sede polmonare. Nel grafico viene illustrato l'andamento del segnale bioluminescente (p/sec) relativamente al tempo (giorni) che segue all'inoculo delle cellule. A destra sono illustrate le immagini che evidenziano la sede del tumore e la quantificazione della bioluminescenza e in particolare anche l'analisi 3D di uno degli animali inoculati che aveva sviluppato metastasi, che ha permesso la ricostruzione delle sedi metastatiche. Inoltre sono mostrate le acquisizioni *EX VIVO* degli espianti di alcuni degli organi che presentavano metastasi con un segnale quantificabile di bioluminescenza.

SEQUENZA DEL SEGNALE SU DIVERSI PIANI DI ACQUISIZIONE