

Generazione di un nuovo anticorpo monoclonale anti-VEGFR-1 con potenziale attività anti-metastatica mediante un triplice meccanismo d'azione: inibizione dell'invasività tumorale e dell'angiogenesi patologica e modifica del microambiente tumorale

Graziani G¹, Ruffini F², Tentori L¹, Scimeca M³, Dorio AS¹, Atzori MG¹, Failla CM⁴, Morea V⁵, Bonanno E³, D'Atri S², Lacial PM²

¹Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università di Roma Tor Vergata, Roma, Italia; ²Laboratorio di Oncologia Molecolare, "Istituto Dermatologico dell'Immacolata"-IRCCS, Roma, Italia; ³Dipartimento di Biomedicina e Prevenzione, Università di Roma Tor Vergata, Roma, Italia; ⁴Laboratorio di Immunologia Sperimentale, "Istituto Dermatologico dell'Immacolata"-IRCCS, Roma, Italia; ⁵Istituto di Biologia Molecolare e Patologia, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Roma, Italia

RAZIONALE E OBIETTIVI

Il *Vascular endothelial growth factor receptor-1* (VEGFR-1) è un recettore con attività tirosin chinasi (RTC) che lega alcuni fattori di crescita appartenenti alla famiglia del VEGF, quali il VEGF-A e il *placenta growth factor* (PlGF) [1,2]. VEGF-A interagisce anche con VEGFR-2, un RTC responsabile dell'attivazione di vie di trasduzione del segnale che mediano la maggior parte degli effetti biologici del VEGF-A, mentre PlGF si lega esclusivamente a VEGFR-1. Il VEGFR-1 è espresso in cellule endoteliali, durante la formazione e rimodellamento dei vasi, macrofagi e cellule mioepiteliali, favorendone la migrazione e la sopravvivenza [3-5]. Il VEGFR-1 è anche coinvolto nella mobilitazione di cellule mieloidi dal midollo osseo che generano macrofagi associati al tumore [1] ed è espresso in una varietà di tumori umani, influenzandone la prognosi e ricorrenza [1,3]. Nel melanoma, per esempio, PlGF e VEGFR-1 sono co-espressi in numerose linee cellulari umane [6] e modulano processi cellulari che favoriscono la proliferazione delle cellule di melanoma, l'apoptosi e l'invasività [6-10]. È perciò ipotizzabile che l'inibizione di VEGFR-1 possa esercitare un'attività antitumorale mediante tre diversi meccanismi: a) inibizione dell'angiogenesi associata al tumore, ostacolando l'attivazione endoteliale in risposta a VEGF-A e PlGF; b) riduzione della mobilitazione dei precursori ematopoietici dal midollo osseo e dell'infiltrazione tumorale da parte di cellule mielocitiche, che contribuiscono all'aggressività tumorale e alla resistenza nei confronti di terapie anti-VEGF-A; c) inibizione dell'invasività e sopravvivenza delle cellule tumorali che esprimono VEGFR-1.

Le terapie anti-angiogeniche finora utilizzate per il trattamento di tumori solidi si basano sull'inibizione del *pathway* VEGF-A/VEGFR-2. Purtroppo, le molecole che interferiscono con questo *pathway* causano gravi effetti indesiderati (ad esempio, sanguinamento, ritardo della guarigione delle ferite, perforazioni gastrointestinali, ipertensione, complicanze tromboemboliche, proteinuria) per inibizione dell'angiogenesi fisiologica [11-12]. Farmaci che inibiscono selettivamente VEGFR-1 dovrebbero causare una minore tossicità rispetto a quelli che bloccano VEGFR-2 o VEGF-A, poiché VEGFR-1 non svolge un ruolo rilevante nell'angiogenesi fisiologica nell'adulto.

Oltre alla forma transmembrana, esiste anche una forma solubile del recettore VEGFR-1 (sVEGFR-1) che deriva da *splicing* alternativo dello stesso trascritto genico [13] e comprende i primi sei domini *Ig-like* della forma di membrana (compresa la regione di legame dei fattori di crescita). sVEGFR-1 impedisce l'interazione di VEGF-A e PlGF con i loro RTC [14]. Infatti, un ridotto rapporto sVEGFR-1/VEGF-A sembra essere un indicatore di prognosi sfavorevole in alcuni tumori. Inoltre, sVEGFR-1 come componente della matrice extracellulare, interagisce direttamente con l'integrina $\alpha 5 \beta 1$, promuovendo l'adesione cellulare e la migrazione [15]. Gli approcci sperimentali adottati finora per inibire selettivamente il VEGFR-1 hanno incluso peptidi antagonisti o peptidomimetici e mAb che bloccano il legame del VEGF-A al recettore [3,16-18]. Tuttavia, questi inibitori di VEGFR-1 potrebbero compromettere la fisiologica attività antiangiogenica del sVEGFR-1 mediata dal sequestro di VEGF-A e PlGF.

In questo contesto, abbiamo identificato sequenze peptidiche derivanti da VEGFR-1 rilevanti per l'attività di tale recettore [19] ed abbiamo prodotto un mAb (D16F7) contro una delle sequenze peptidiche da noi previamente identificate come parti del recettore coinvolte nella trasmissione del segnale, al fine di esplorare il potenziale terapeutico dell'inibizione di VEGFR-1 nel melanoma.

RISULTATI

Fig.1. CARATTERISTICHE E MECCANISMO D'AZIONE DEL mAb ANTI-VEGFR-1 D16F7

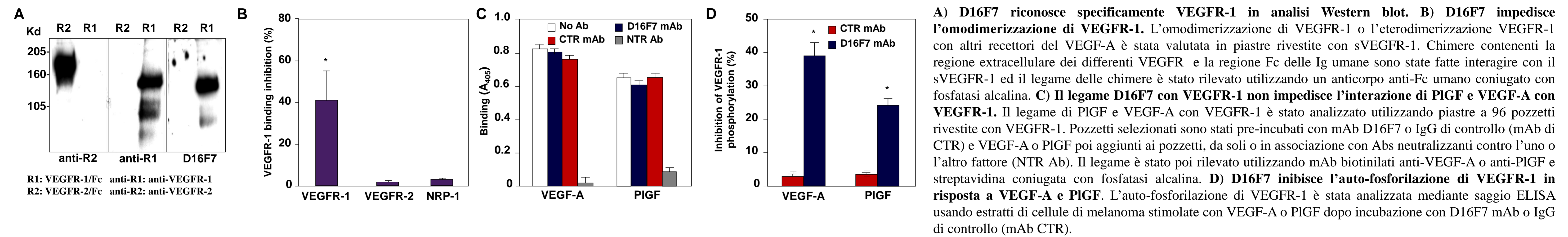


Fig.2. EFFETTI DEL mAb D16F7 IN CELLULE ENDOTELIALI

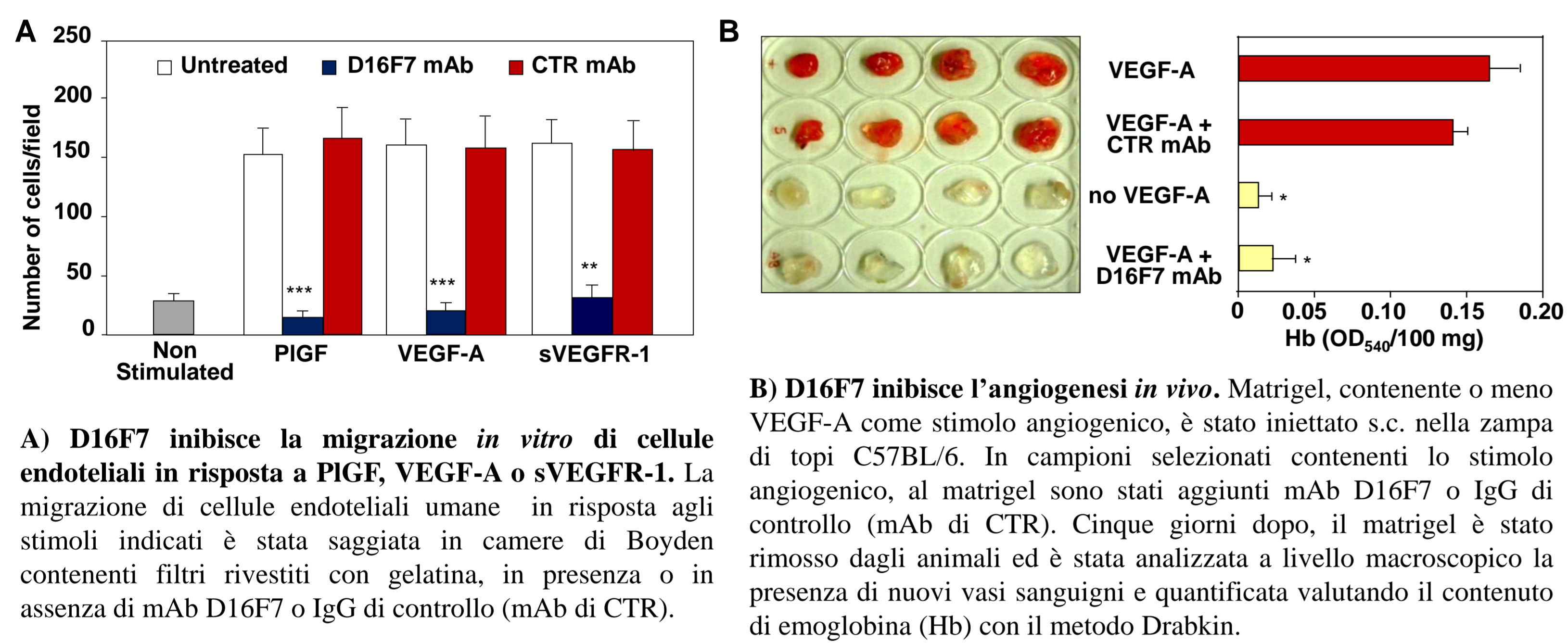


Fig.3. EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON mAb D16F7 SULLA CRESCITA TUMORALE IN VIVO IN UN MODELLO MURINO DI MELANOMA

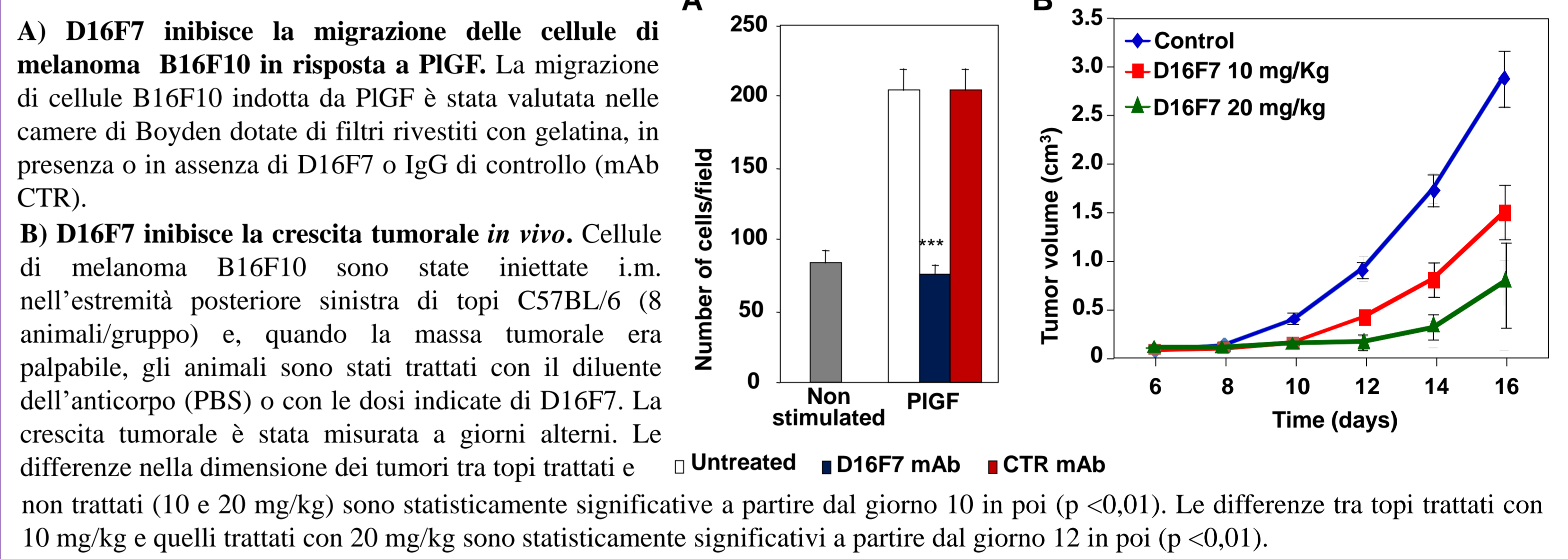


Fig.4. D16F7 INDUCE L'APOPTOSI IN VIVO IN CELLULE DI MELANOMA B16F10

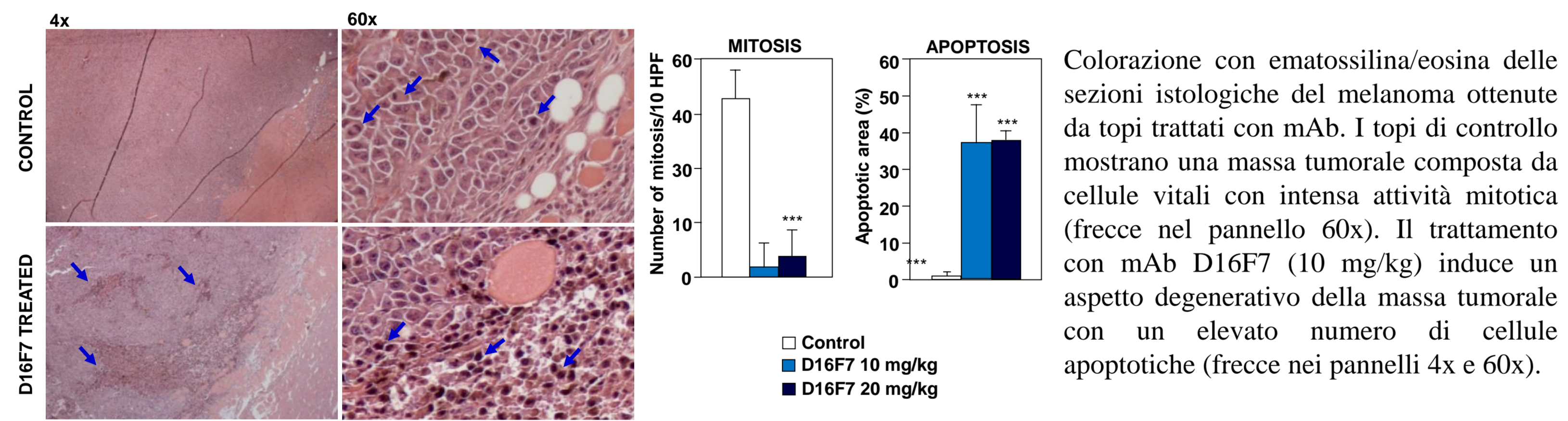


Fig.5. IL TRATTAMENTO CON D16F7 INIBISCE L'INFILTRATO OSSEO DA CELLULE TUMORALI, L'INFILTRAZIONE DEL TUMORE DA PARTE DEI MONOCITI E LA MOBILIZZAZIONE DI PROGENITORI DI CELLULE MIELOIDI

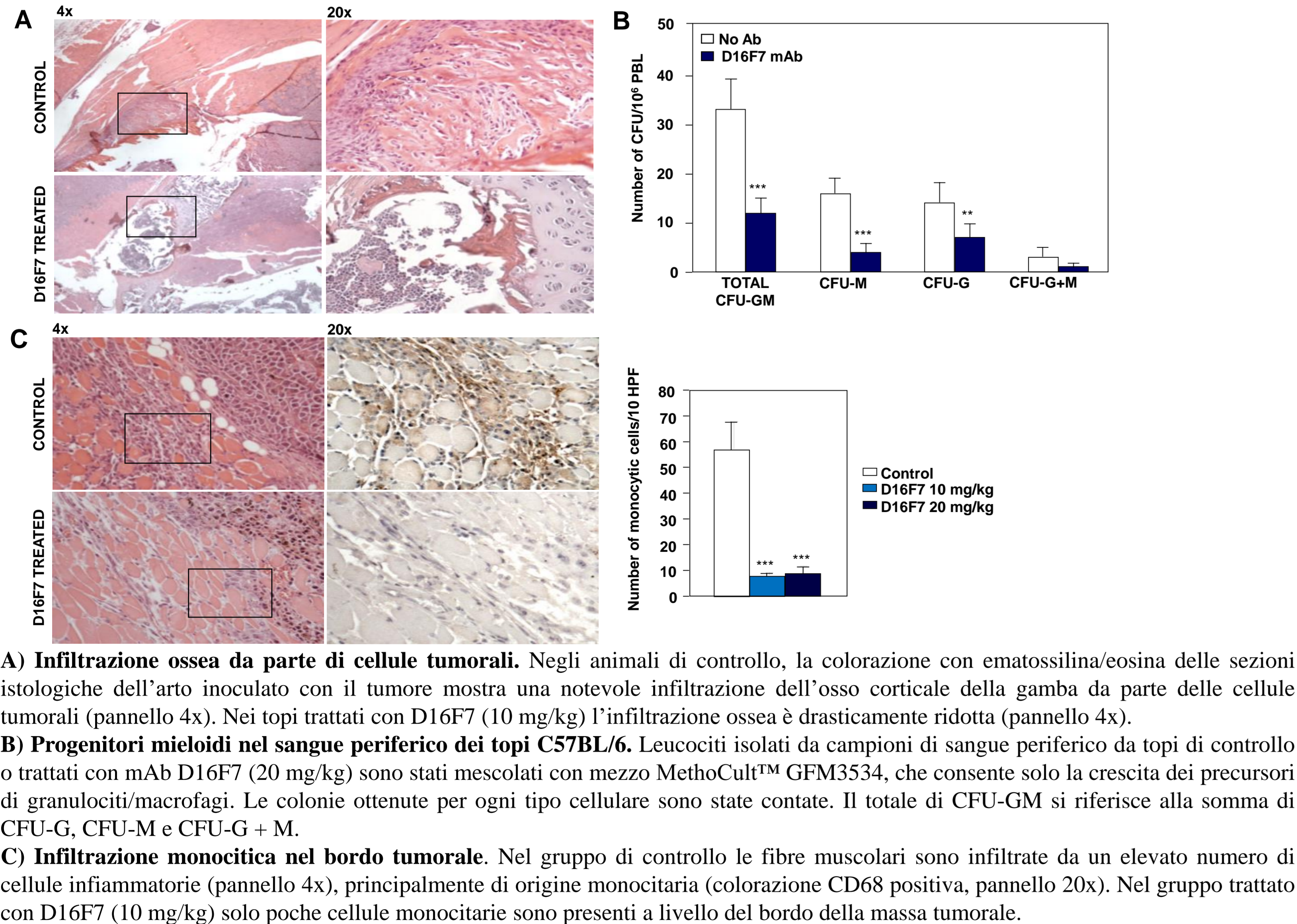


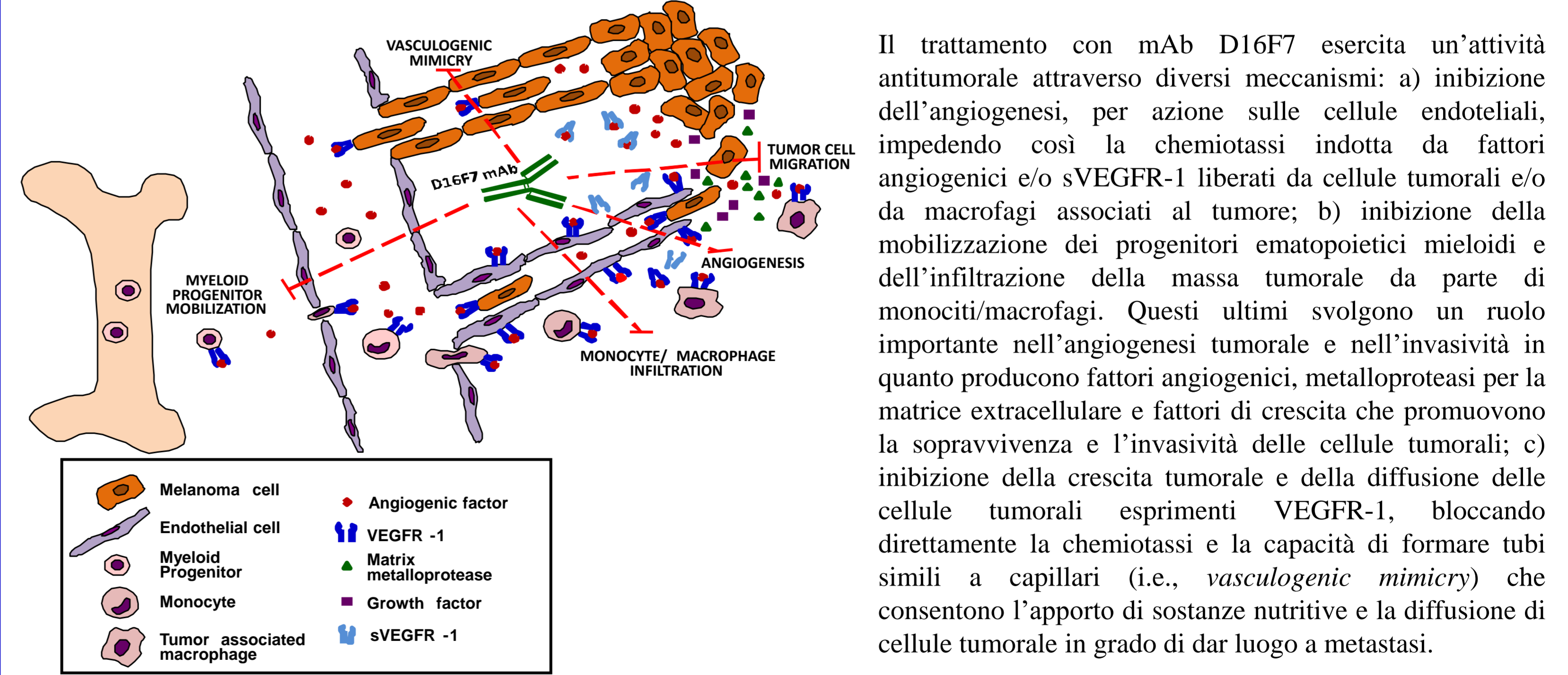
Tabella 1. Effetto del trattamento con il mAb D16F7 sulla crescita del tumore *in vivo*

Gruppo sperimentale ^a	Inibizione del volume del tumore (%) ^{b,d}	Tempo per quadruplicare (giorni) ^{c,d}	Indice di ritardo della crescita ^d
Animali di controllo	-	3,37 ± 0,16	-
10 mg/kg D16F7	48,6 ± 9,7	5,18 ± 0,27	1,54 ± 0,08
20 mg/kg D16F7	74,4 ± 15,0	7,63 ± 1,11	2,26 ± 0,33

Tabella 2. Comparazione dell'efficacia antitumorale *in vivo* di D16F7 mAb con quella del chemioterapico Temozolomide (TMZ)

Gruppo sperimentale ^a	Inibizione del volume del tumore (%) ^{b,d}	Tempo per quadruplicare (giorni) ^{c,d}	Indice di ritardo della crescita ^d
Animali di controllo	-	3,21 ± 0,68	-
10 mg/kg D16F7	49,7 ± 11,6	5,12 ± 1,40	1,59 ± 0,44
68 mg/kg TMZ	62,8 ± 9,8	5,36 ± 0,28	1,67 ± 0,09

Fig.6. SCHEMA RIASSUNTIVO DEGLI EFFETTI ANTITUMORALI DELL'ANTICORPO ANTI-VEGFR-1 D16F7



METODI I dettagli tecnici si possono trovare nell'articolo: Graziani *et al.* *Oncotarget*, 7 (45): 72868-72885.

REFERENZE

- Fischer *et al.* *Nat Rev Cancer*. 2008; 8: 942-956.
- Roskoski R Jr. 2008; 375: 287-291.
- Schwartz *et al.* 2010; 116: 1027-1032.
- Adini *et al.* *Cancer Res*. 2002; 62: 2749-2752.
- Zhou *et al.* *Dev Biol*. 2003; 263: 114-125.
- Lacial *et al.* *J Invest Dermatol*. 2000; 115: 1000-1007.
- Levati *et al.* *Int J Oncol*. 2011; 38: 241-247.
- Marcellini *et al.* *Am J Pathol*. 2006; 169: 643-654.
- Graeven *et al.* *J Cancer Res Clin Oncol*. 1999; 125: 621-629.
- Graells *et al.* *J Invest Dermatol*. 2004; 123: 1151-1161.
- Higa *et al.* *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009; 9: 999-1007.
- Chen *et al.* *Nat Rev Clin Oncol*. 2009; 6: 465-77.
- Bible *et al.* *Nat Rev Clin Oncol*. 2016; 13: 403-416.
- Kendall *et al.* 1996; 226: 324-328.
- Orecchia *et al.* *J Cell Sci*. 2003; 116: 3479-3489.
- Fragoso *et al.* *Blood*. 2006; 107: 1608-1616.
- Zhou *et al.* *Am J Cancer Res*. 2015; 5: 3149-3161.
- Sidman *et al.* *Sci Transl Med*. 2015; 7: 309ra165.
- Lacial *et al.* *Eur J Cancer*. 2008; 44: 1914-1921.

CONCLUSIONI

- Il mAb anti-VEGFR-1 (D16F7) impedisce l'omodimerizzazione del recettore e l'attivazione da parte di VEGF-A o PlGF
- D16F7 inibisce la risposta cellulare mediante un meccanismo non competitivo: non impedisce, infatti, l'interazione di VEGFR-1 con VEGF-A o PlGF e perciò non aumenta la quantità di VEGF-A disponibile a legare e attivare VEGFR-2; non impedisce la funzione di sVEGFR-1 come regolatore negativo dell'attività del VEGF-A e del PlGF, ma inibisce la migrazione di cellule endoteliali indotta da sVEGFR-1.
- D16F7 inibisce la migrazione di cellule endoteliali indotte da ligandi di VEGFR-1 e l'angiogenesi *in vivo* nonché la *vasculogenic mimicry* del melanoma *in vitro*
- D16F7 esercita un'attività antitumorale *in vivo* e l'efficacia di 5 dosi di 10 mg/kg di D16F7 è paragonabile a quella di 5 dosi dell'agente chemioterapico temozolomide in un modello murino di melanoma
- D16F7 riconosce sia il VEGFR-1 umano che quello murino. Ciò consente di analizzare l'efficacia dell'anticorpo anche in modelli murini di xenotrapianti di tumori umani sia come risultato dell'effetto diretto dell'anticorpo sul tumore stesso che indiretto sul microambiente dell'ospite.
- L'inibizione selettiva del VEGFR-1 da parte di D16F7 potrebbe anche potenziare gli effetti di agenti anti-angiogenici anti-VEGF-A e contrastare lo sviluppo della resistenza a queste terapie.
- VEGFR-1 non svolge un ruolo rilevante nell'angiogenesi fisiologica nell'adulto. Pertanto, le terapie anti-angiogeniche che inibiscono selettivamente questo recettore potrebbero essere associate a una tossicità sistemica inferiore rispetto a farmaci che inibiscono VEGF-A/VEGFR-2.
- I risultati da noi ottenuti indicano che D16F7 potrebbe avere un potenziale terapeutico nel melanoma metastatico, nonché in altri tumori o condizioni patologiche in cui sono coinvolti fattori di crescita che legano il VEGFR-1, quali VEGF-A e PlGF.