

## S.C. Oncologia Medica B

**Profili di espressione proteica e cancerogenesi mammaria. Correlazione con il rischio di carcinoma mammario in donne affette da mastopatia fibrocistica a grosse cisti e con il rischio di ricaduta e di morte in donne operate per carcinoma mammario**

*Linea di ricerca:* 1 - Oncologia predittiva

*Programma:* d - Biomarcatori biologici e molecolari di esposizione, di danno al DNA e di rischio di cancro

*Responsabile:* Francesco Boccardo

*Partecipanti:* Alessandra Rubagotti, Pamela Gugliemini, Rosa Mangerini

*Durata:* 2007-2008

*Parole chiave:* carcinoma mammario; mastopatia fibrocistica; profilo proteico

*Altre strutture IST:* S.S. Biopolimeri e Proteomica

*Altri Enti coinvolti:* Università di Genova: Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES) Dipartimento di Oncologia, Biologia e Genetica (DOBIG); Università di Catanzaro: Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica osservazionale

*Area di interesse:* prevenzione primaria/secondaria

*Soggetti cofinanziatori:* MIUR PRIN

### *Background*

La mastopatia fibrocistica a grosse cisti (MFCGC) è una condizione clinico-patologica molto comune della mammella, che è riscontrabile in circa il 7% della popolazione femminile dei Paesi Occidentali e che è associata ad un incrementato rischio (da 2 a 4 volte) di sviluppare il carcinoma mammario. In realtà la più stretta associazione con il cancro mammario è stata osservata per le cisti di tipo I, che di solito sono rivestite da un epitelio stratificato di tipo apocrino e che contengono più elevate concentrazioni intracistiche di ormoni steroidei, in forma libera e coniugata, e di potassio. Alcuni gruppi di ricercatori, tra cui anche il nostro, hanno evidenziato che le cisti di tipo I contengono inoltre livelli più elevati di fattori di crescita come EGF e IGF-1, che sono coinvolti nella promozione della cancerogenesi mammaria, e livelli più bassi di fattori di crescita come TGF-beta, che viceversa sono in grado di modulare negativamente la proliferazione del carcinoma mammario, evidenziando una stretta correlazione tra livelli intracistici di fattori di crescita e rischio di carcinoma mammario.

Per quanto riguarda le donne operate di carcinoma mammario, sono ormai sempre maggiori le conoscenze su genotipo, fenotipo e rischio di ricaduta e di morte. Minori sono invece le conoscenze sul peptidoma, cioè sulle proteine circolanti secrete dal tumore o dall'ospite in risposta alla presenza del tumore, e sulla possibile associazione con il decorso clinico della malattia e la risposta ai trattamenti adiuvanti.

*Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari:*  
Il programma di ricerca si prefiggeva due obiettivi principali.

1. Studio della possibile associazione tra profili di espressione proteica e cancerogenesi mammaria. A tale scopo è stato selezionato materiale biologico di una bio-banca allestita tra il 1985 ed il 1993 con i liquidi cistici, prelevati al momento della prima aspirazione, ed i sieri prelevati nello stesso momento, di circa 600 donne con MFCGC. I liquidi cistici ed i sieri sono stati forniti ad altri gruppi di ricerca per la determinazione dei profili proteici mediante metodiche (elettroforesi bidimensionale, spettrometria di massa) in grado di identificare proteine a basso peso molecolare che possono essere riunite in classi, con l'ausilio di approcci di tipo bioinformatico.

Dopo una fase preliminare di messa a punto e taratura delle metodiche era prevista l'implementazione di studi retrospettivi di coorte per valutare il possibile significato predittivo di specifiche classi di escrezione proteica del liquido cistico e/o del siero nei confronti del rischio di sviluppare il cancro mammario, confrontando i tassi di incidenza in base alle classi di escrezione proteica con i tassi di incidenza aggiustati per età registrati nella popolazione generale residente nella provincia di Genova nel periodo 1988-1992.

2. Studio del valore prognostico/predittivo del peptidoma di sieri di donne operate per tumore mammario. Anche per tale studio era prevista l'utilizzazione di materiale biologico (siero) raccolto nello stesso periodo (1985-1993) da circa 300 donne operate per ca. mammario e successivamente trattate e seguite secondo i protocolli in uso presso il nostro Istituto. Per meglio contribuire ad evidenziare classi di proteine associate al processo di cancerogenesi mammaria era prevista inoltre l'utilizzazione dei sieri pre-operatori di donne operate nello stesso periodo di tempo per lesioni benigne della mammella (mastopatia fibrocistica; fibroadenomi). Infine il progetto prevedeva l'utilizzo dei sieri di circa 70 pazienti prelevati a distanza di tempo dalla mastectomia. Lo studio di questo materiale doveva consentire di implementare studi caso-controllo per evidenziare l'effetto del trattamento chirurgico (ed in alcuni casi anche del trattamento medico post-operatorio adiuvante) sui profili proteici pre-operatori ed eventualmente di identificare classi di proteine correlate alla recidività precoce e/o alla resistenza ai trattamenti adiuvanti.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

### *Beneficiari*

Centri di ricerca coinvolti in studi analoghi e più in generale in studi di nanoproteomica. Utenti in grado di avere a disposizione ulteriori test per definire l'eventuale rischio di sviluppare il cancro della mammella al fine di modificare le attuali strategie di sorveglianza e di prevenzione farmacologica (individualizzazione degli screening; utilizzo di tecniche di screening più sofisticate). Pazienti in grado di disporre di ulteriori discriminanti, rispetto ai parametri clinico-morfo biologici già utilizzati e alle firme geniche, per identificare il rischio di ricaduta dopo la mastectomia e personalizzare sempre più il trattamento adiuvante, nonché di nuovi "marker" per potere monitorare la efficacia (risposta) alle terapie, allo scopo di individuare precocemente i non responders.

### *Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008*

L'attività di ricerca è stata condotta identificando un training-set costituito dai sieri e dai liquidi cistici di 20 soggetti, di cui 10, avendo sviluppato successivamente al campionamento una neoplasia mammaria, sono stati utilizzati come casi e 10 come controlli. I soggetti sono stati scelti dopo appaiamento per età, stato menopausale e tempo di osservazione. Lo stesso materiale è stato in parte processato presso unità di ricerca associate (Genova DIMES-DOBIG-IST) e Catanzaro (Dip Medicina Sperimentale e Clinica), anche allo scopo di screenare le metodiche più efficienti. E' stato infatti necessario valutare preliminarmente gli effetti legati al lungo periodo (15-23 anni) di criopreservazione dei sieri. Presso l'Università di Catanzaro si è proceduto ad una analisi preliminare a pool in elettroforesi bidimensionale. L'analisi è stata limitata ai sieri e ha dimostrato che il pattern di espressione proteica differisce significativamente tra le due popolazioni in studio. Alcune proteine infatti sono iperespresse, altre sottoesprese, altre ancora presentano un diverso pattern di glicosilazione. Le analisi sono state ripetute in spettroscopia di massa, dopo allontanamento delle proteine a PM più elevato, come albumina e Ig, e focalizzando l'attenzione sui seguenti peptidi: SAP (Serum amiloid protein); PEDF (Pigment epithelium derived factor), Clusterina e alfa 2-Macroglobulina, peraltro senza rilevare sostanziali differenze nella distribuzione di queste proteine nelle donne che hanno sviluppato il cancro (casi) e nei controlli.

Il gruppo di ricerca che coinvolge l'IST e l'Università di Genova ha seguito un approccio diverso, valutando direttamente i sieri con la spettrometria di massa AP-MALDI/TOF dopo "stripping" con microsferiche funzionalizzate C18 (MWCO <5000) per l'estrazione di proteine a basso peso molecolare.

In questo caso il training set era rappresentato da 8 sieri di donatrici sane, 7 sieri di pazienti affette da MFCGC che non avevano sviluppato alcuna neoplasia mammaria (A) e 7 sieri di pazienti affette da MFCGC che risultavano avere sviluppato una neoplasia mammaria nel corso degli anni successivi (B:A e B=sieri patologici).

Dopo l'acquisizione di un certo numero di profili proteici, sono stati evidenziati dei picchi che si ripetevano in ogni spettro. Molti di questi picchi, riportati in letteratura da gruppi di ricerca che hanno studiato il peptidoma del siero umano, appartengono a fibrinogeno, complemento, apolipoproteine e bradichinina.

I nostri esperimenti hanno confermato l'esistenza di una maggiore attività esopeptidasi nei campioni di siero provenienti da pazienti affette da MFCGC che abbiano in seguito sviluppato un cancro, rispetto al siero di donatrici sane. Tuttavia, in contrasto con quanto affermato da numerosi lavori pubblicati recentemente, la nostra ricerca ha messo in evidenza come tale attività non possa essere considerata caratterizzante del fenotipo tumorale in quanto presente, a livelli sovrapponibili, anche nel siero di pazienti affette da sola MFCGC. In un certo numero di sieri delle pazienti affette da MFCGC che nel corso del tempo hanno sviluppato un carcinoma mammario è stata osservata una maggiore presenza di alcuni picchi (1771, 2010, 2267) non parimenti riscontrabile nel siero delle altre pazienti affette da MFCGC. E' necessario che tale dato venga verificato su un numero significativo di campioni anche attraverso prove di clusterizzazione. Inoltre è necessario, mediante esperimenti MS/MS, identificare la natura di tali segnali.

In conclusione, in entrambi i training set utilizzati, per altro con approcci diversi, è stato possibile mettere in evidenza profili di espressione proteica differenti la cui associazione con l'insorgenza del carcinoma mammario andrà opportunamente studiata, implementando la casistica e soprattutto mettendo a punto protocolli di analisi bioinformatica più appropriati.

Tali ricerche verranno possibilmente implementate nel prossimo triennio.

### *Elenco pubblicazioni:*

Boccardo F.-Puntoni M.-Guglielmini P.-Rubagotti A.

Enterolactone as a risk factor for breast cancer: a review of the published evidence.

Clin. Chim. Acta 365:58/67, 2006

## **Nuove strategie di chemioprevenzione e di trattamento del carcinoma prostatico ormonosensibile**

*Linea di ricerca:* 1 - Oncologia predittiva

*Programma:* e - Valutazione e gestione del rischio individuale di cancro e prevenzione secondaria

*Responsabile:* Francesco Boccardo

*Partecipanti:* Alessandra Rubagotti, Laura Tomasello, Rosa Mangerini, Davide Bedognetti

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* carcinoma della prostata; chemioprevenzione; ormonoterapia

*Altre strutture IST:* S.C. Oncologia Urologica; S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica; S.C. Oncologia Radioterapica; S.S. Genomica Funzionale

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

*Altri Enti coinvolti:* Università di Genova: DISCAT, DOBiG; Centri universitari ed ospedalieri partecipanti ai precedenti studi di ormonoterapia nel carcinoma prostatico nell'ambito del progetto PONCAP

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica sperimentale

*Area di interesse:* prevenzione primaria/secondaria

*Soggetti cofinanziatori:* Ministero della Salute; Compagnia San Paolo

### *Background*

Il carcinoma della prostata rappresenta la seconda neoplasia più frequente nel sesso maschile ed una delle principali cause di morte per neoplasia. Nell'ultimo decennio, anche nel nostro Paese si è verificato un aumento quasi di tipo "epidemico" di questa malattia, per l'uso ormai indiscriminato dello screening autoreferenziale con il PSA. In conseguenza di ciò si è assistito da un lato ad un aumento considerevole delle diagnosi di PIN di alto grado, una lesione preneoplastica o, forse meglio definibile, neoplastica in situ, che si associa con elevata frequenza al carcinoma infiltrante e che comunque rappresenta un fattore di rischio importante per questa neoplasia (il 30-70% degli individui cui viene diagnosticata una PIN di alto grado è destinato ad avere una diagnosi di ca infiltrante entro 12-24 mesi dalla diagnosi biptica di PIN); dall'altro lato l'aumento della diagnosi di neoplasie in fase relativamente precoce, che comunque sono destinate a recidivare ed a sviluppare metastasi in una proporzione non irrilevante dei pazienti, identifica candidati a trattamenti di tipo multimodale includenti l'ormonoterapia, già in fase precoce. Recentemente abbiamo studiato la combinazione di un antiandrogeno puro e di un antiestrogeno, inizialmente nel tentativo di evitare che i pazienti trattati con l'antiandrogeno puro sviluppassero ginecomastia e mastalgia, due sintomi disturbanti che si manifestano nella maggioranza dei casi e che sono ragione per sospendere il trattamento in circa un quinto di essi. Gli studi di farmacocinetica, farmacodinamica e in vitro, su linee cellulari, hanno evidenziato l'assenza di interazione tra i due farmaci in vitro e a livello farmacocinetico e un effetto di Tamoxifene anche su IGF-1 e sulle binding-proteins. Quest'ultimo effetto potrebbe rivestire notevole interesse sia nella chemio-prevenzione che nel trattamento del carcinoma della prostata ormonosensibile, considerando il ruolo centrale attribuito al sistema IGF-binding proteins nella promozione e nella progressione del carcinoma prostatico e nello sviluppo della ormonorefrattarietà.

*Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari:*

- 1) Proseguire gli studi pre-clinici, clinici ed osservazionali per studiare meglio le possibili interazioni tra antiandrogeni e antiestrogeni a livello del processo di cancerogenesi prostatica.
- 2) Mettere a punto nuove schedule di associazione Bicalutamide/Tamoxifene, in grado di ridurre l'esposizione al trattamento antiestrogenico, soprattutto nei trattamenti a più lungo termine.
- 3) Valutare la fattibilità di un regime di trattamento con Bicalutamide e Tamoxifene per periodi prolungati di tempo (24-36 mesi).
- 4) Implementare studi di chemioprevenzione nei pazienti affetti da PIN di alto grado con la combinazione Bicalutamide-Tamoxifene.
- 5) Implementare trials basati sulla somministrazione della combinazione Bicalutamide/Tamoxifene nel trattamento multimodale dei ca. prostatici a rischio o recidivi dopo terapia definitiva.

### *Beneficiari*

Centri di ricerca impegnati negli stessi campi di interesse. Industria farmaceutica. Pazienti affetti da PIN di alto grado, per i quali non esiste al momento nessun tipo standardizzato di trattamento; pazienti candidati a terapie multimodali che desiderano evitare gli effetti collaterali ed i rischi legati alle terapie androgeno-soppressive.

### *Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008*

1) Gli studi in vitro hanno riguardato lo studio della risposta in senso proliferativo in relazione alla espressione di un panel di 30 geni, selezionati in base al ruolo nella progressione del ca prostatico in diverse condizioni di coltura. In particolare, sono state studiate le modificazioni indotte dall'esposizione a concentrazioni variabili di Bicalutamide (BIC) e di Tamoxifene (TAM), in presenza di DHT (Deidrotestosterone). L'interesse per questo tipo di modulazione farmacologia, deriva da precedenti studi con la combinazione di BIC e TAM in pazienti affetti da neoplasia prostatica che per diversi motivi non erano idonei o avevano rifiutato di sottoporsi a trattamenti androgeno-soppressivi.

E' emerso che l'espressione dei geni presi in considerazione nel presente studio è diversificata nelle due linee cellulari, LNCaP e PC3. Le LNCaP rappresentano il modello più simile al carcinoma prostatico: sono androgeno-dipendenti ed esprimono alti livelli di recettore degli androgeni (AR) che è risultato essere modulato negativamente sia da BIC che da TAM. In presenza di DHT si è osservato nelle LNCaP un aumento dell'espressione delle metalloproteinasi della matrice extracellulare (MMP) mentre la successiva somministrazione di BIC è risultata invece determinare una riduzione od inibizione dell'espressione delle MMP (2, 9 e 13) suggerendo un'azione anti-proliferativa ed anti-angiogenetica del farmaco.

L'epidermal growth factor (EGF) e l'insulin growth factor 1 (IGF1) sono potenti agenti mitogeni che regolano la proliferazione cellulare e la metastasi e la cui espressione è solitamente osservata in molti tumori solidi tra cui la prostata. L'IGF1 circola nel sangue legato alla sua proteina IGFBP3 ed il taglio del legame da parte di proteasi, tra cui anche la MMP9, lo rende disponibile per il legame con i recettori. Quindi, l'effetto inibitore di BIC nei confronti di MMP9 determina una ridotta disponibilità di IGF1 e di conseguenza una diminuzione della stimolazione proliferativa delle cellule prostatiche. Un altro dato interessante è che il trattamento con BIC riporta l'espressione della telomerasi (hTERT) alle condizioni basali, influenzando quindi anche in questo caso sul ciclo cellulare ed indirizzando la cellula verso l'arresto della sua crescita. Questo effetto inibitore si ha anche con TAM, mentre la combinazione dei due farmaci fa aumentare di nuovo la telomerasi. Probabilmente, in questo caso, le azioni dei due farmaci si annullano riportando l'enzima sotto il controllo degli androgeni.

L'analisi dell'espressione dei geni nelle LNCaP ha mostrato che il TAM non contrasta l'effetto inibitorio di BIC, ma anzi in alcune situazioni lo amplifica come nel caso di EGF e IGF1.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

Le PC3 sono una linea di cellule prostatiche androgeno-indipendenti e le differenti caratteristiche biologiche, rispetto alle LNCaP, sono confermate anche dal diverso grado di espressione dei geni considerati in questo studio. Infatti, a differenza delle LNCaP, nella maggior parte dei casi, il DHT non ha un effetto importante sull'espressione dei geni studiati. Ciò fa supporre la risposta a fattori di crescita diversi dagli androgeni. Le PC3 sono cellule che derivano da metastasi ossee e secernono fattori che possono alterare l'omeostasi dell'osso come il platelet derived growth factor (PDGF), l'IGF1 e la sua proteina IGFBP3, ed il TGF $\beta$ . Nei pazienti con metastasi ossee sono stati osservati alti livelli di TGF $\beta$  rispetto a quelli senza metastasi. Questo dato è in sintonia con quanto osservato nel nostro studio in quanto solo le PC3 esprimono TGF $\beta$  mentre questo gene è silenziato nelle LNCaP. Per quanto riguarda IGF1 e IGFBP3 è interessante rilevare come la somministrazione di BIC nelle PC3 determini un aumento dell'espressione di IGFBP3, a conferma che anche nel ca ormono-refrattario alcune vie di segnale siano ancora guidate dal recettore androgenico.

La rimozione degli androgeni solitamente provoca l'apoptosi delle cellule, ma i tumori androgeno-indipendenti hanno sviluppato meccanismi che permettono loro la crescita anche in assenza di androgeni. I principali mediatori della morte cellulare sono le caspasi. Esistono due classi di caspasi: gli iniziatori della cascata (p.e. CASP 8, 9 e 10) e gli effettori (p.e. CASP 6). Nel complesso l'espressione di queste caspasi sia nelle LNCaP che nelle PC3 ha mostrato un comportamento eterogeneo. La cascata di attivazione delle caspasi può essere innescata da vari fattori tra cui i recettori per il tumor necrosis factor che possono attivare le CASP8 e 10 e che sono state ritrovate nelle PC3. La CASP 8 ha un ruolo importante nel turnover delle cellule epiteliali normali della prostata.

Nelle cellule sono presenti dei sistemi di controllo contro la crescita e la proliferazione incontrollata delle cellule. I geni che si occupano di questa funzione sono chiamati oncosoppressori e PTEN è uno di questi. In questo studio, l'espressione di PTEN è limitata alle cellule androgeno-dipendenti ed aumenta in presenza di BIC, mentre questo fattore viene modulato negativamente dal TAM o dalla combinazione dei due farmaci. Ricerche recenti hanno mostrato che l'inibizione di PTEN provoca una proliferazione incontrollata delle cellule e lo sviluppo del tumore.

I dati preliminari delle nostre osservazioni dimostrano che sia gli antiandrogeni che gli antiestrogeni sono in grado di indurre un'alterazione del profilo dell'espressione genica che si differenzia nelle due linee cellulari in base alla loro capacità di rispondere o meno alla stimolazione androgenica con DHT. Le nostre osservazioni forniscono il razionale molecolare per l'impiego di combinazioni di antiandrogeni ed antiestrogeni sia nella chemio-prevenzione che nel trattamento del ca prostatico nelle diverse fasi della sua storia naturale.

2-3) Questi obiettivi del progetto sono stati conseguiti attraverso uno studio di fase III, che ha coinvolto centri esterni all'IST, che aveva lo scopo principale di valutare l'efficacia di una schedula settimanale di Tamoxifene, dopo un periodo di "carico" con la più comune schedula giornaliera. Il razionale era basato sui dati di studi effettuati in precedenza nel ca mammario femminile che avevano evidenziato che dosi anche molto basse di antiestrogeno mantenevano inalterata l'attività su end-point intermedi di efficacia, come per esempio il sistema IGF/IGF Binding proteins, sui dati di studi dose-risposta nel ca prostatico (nei confronti dell'effetto profilattico sulla ginecomastia e sulla mastalgia indotte da antiandrogeni puri) e sulla lunga emivita del farmaco che rendeva particolarmente interessante la prosecuzione con una schedula di somministrazione settimanale, dopo un iniziale periodo di carico con la schedula giornaliera. I risultati di questo studio, ad un follow-up mediano di oltre 24 mesi, dimostrano che in realtà i pazienti randomizzati a proseguire con tamoxifene su base settimanale sviluppano ginecomastia e mastalgia in una percentuale significativamente superiore rispetto a quelli che proseguono con il trattamento giornaliero. Lo studio del comportamento dei livelli di PSA, degli eventi avversi e dei parametri prescelti per monitorare la qualità della vita (ed in particolare la libido e la potenza sessuale) non hanno per altro evidenziato nessun apparente vantaggio a favore dei pazienti passati al regime settimanale, confermando la buona tolleranza e la sicurezza del trattamento giornaliero anche per lunghi periodi di tempo.

Questo studio conferma pertanto che il regime ottimale da testare negli studi di cui agli obiettivi 4 e 5 del progetto, che rappresenteranno gli obiettivi di questo filone di ricerca per il prossimo triennio, è quello basato sulla somministrazione giornaliera della combinazione.

### *Elenco pubblicazioni:*

Boccardo F.-Rubagotti A.-Battaglia M.-Zattoni F.-Bertaccini A.-Romagnoli A.-Conti G.

Influence of bicalutamide with or without tamoxifen or anastrozole on insulin like growth factor 1 and binding proteins in prostate cancer patients.

Int. J. Biol. Markers 21:123/126, 2006

Bedognetti D.-Rubagotti A.-Conti G.-Francesca F.-De Corbelli O.-Canalini L.-Gallucci M.-Aragona F.-Garofano L.-Cortellini P.-Martorana G.-Lapini A.-Boccardo F.

An open, randomized, multicenter, phase III trial comparing the efficacy of two Tamoxifen schedules in preventing gynaecomastia induced by Bicalutamide monotherapy in prostate cancer patients.

Eur. Urol., submitted

### **Caratterizzazione morfo-biologica del ca vescicale muscolo-invasivo e valutazione di approcci terapeutici di tipo multimodale**

*Linea di ricerca:* 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

*Programma:* b - Valutazione dell'efficacia di nuovi approcci terapeutici: studio di nuovi farmaci, di nuove associazioni, di nuove tecniche, tecnologie o strategie terapeutiche

*Responsabile:* Alessandra Rubagotti

*Partecipanti:* Francesco Boccardo, Laura Tomasello

# Consuntivo progetti RC 2006-2008

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* carcinoma della vescica; chemioterapia adiuvante; prognosi

*Altre strutture IST:* S.C. Oncologia Urologica; S.C. Anatomia ed Citoistologia Patologica; S.S. Tumori Urologici

*Altri Enti coinvolti:* Istituto Regina Elena-IFO, Roma; Università di Genova (DISCAT-Clinica Urologia); Centri Universitari ed Ospedalieri che avevano già partecipato a sperimentazioni nel carcinoma vescicale

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica sperimentale

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* Ministero della Salute; CNR-MIUR

## *Background*

Il trattamento dei pazienti affetti da carcinoma muscolo-invasivo della vescica è fonte di controversie. Infatti se la cistectomia radicale è il trattamento locale standard nella maggioranza dei Centri urologici, non esiste ancora un consenso sulla utilità e, quindi, sulla indicazione di approcci di tipo multimodale basati sull'impiego della chemioterapia in fase neoadiuvante ed adiuvante. Mancano ad oggi studi su larga scala in grado di evidenziare la reale utilità della chemioterapia adiuvante e quali pazienti potrebbero maggiormente beneficiare di questo tipo di terapia, in quanto a maggior rischio di ricaduta. Anche le metanalisi eseguite ad oggi sono poco attendibili, avendo incluso studi dal disegno sostanzialmente diverso. Infatti solo alcuni tra gli studi prevedevano l'impiego sistematico a progressione dello stesso regime di chemioterapia nel braccio di non trattamento.

## *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari:*

Questo progetto di ricerca aveva due obiettivi principali: 1) Identificare nuovi fattori bio-molecolari di progressione per il ca muscolo-invasivo della vescica; 2) valutare l'impatto sulla mortalità della chemioterapia adiuvante a base di cisplatino e in particolare valutare l'eventuale superiorità del trattamento immediato in fase adiuvante, su quello differito a progressione.

1) Il primo obiettivo ha implicato lo studio retrospettivo, mediante metodiche di immunocistochemica, di materiale di archivio relativo ad una coorte di pazienti sottoposti a cistectomia radicale per ca muscolo-invasivo della vescica (CMIV) presso la Clinica Urologia dell'Università di Genova ed indirizzati al nostro Istituto per il successivo follow-up. L'outcome di questi pazienti è stato correlato con l'espressione di proteine coinvolte nei meccanismi di chemiosensibilità ai farmaci utilizzati nel trattamento adiuvante del CMIV e che esercitano funzioni importanti per la replicazione cellulare come l'apoptosi e il riparo del danno al DNA (p53, ciclica D1, rafp21, bcl2).

In una seconda fase lo studio è stato esteso all'analisi dei profili di espressione delle proteine della matrice nucleare (NMP) utilizzando materiale criopreservato. Questa struttura svolge infatti un ruolo cardine nel coordinamento spaziale e temporale della trascrizione genica e va incontro ad alterazioni quali-quantitative molto significative nelle diverse fasi dei processi di cancerogenesi, che possono rivestire un potenziale significato prognostico.

2) Il secondo obiettivo ha comportato il disegno di uno studio multicentrico, nell'ambito del quale dopo la cistectomia i pazienti sono stati randomizzati a ricevere 4 cicli di chemioterapia con cisplatino e gemcitabina o ad essere trattati con questo regime terapeutico solo a eventuale progressione di malattia. Lo studio è stato promosso sotto l'egida del Ministero della Sanità e del CNR e coordinato dall'IST di Genova e dall'IRE di Roma ed ha coinvolto circa 50 centri di urologia e oncologia medica.

## *Beneficiari*

Centri di ricerca interessati alle stesse problematiche. Industria farmaceutica. Pazienti affetti da ca muscolo-invasivo della vescica.

## *Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008*

1) Nell'ambito del primo obiettivo, abbiamo valutato retrospettivamente il significato prognostico di un panel di proteine implicate nel controllo del ciclo cellulare (p53, p21, ciclica D) e di un indice di proliferazione come Ki67 in una coorte di 82 pazienti sottoposti a cistectomia radicale per CMIV, evidenziando importanti alterazioni nella espressione di queste proteine e la possibilità di costruire delle costellazioni di variabili in grado di correlare in maniera indipendente con la sopravvivenza dei pazienti. La seconda fase dello studio ha incluso invece 22 pazienti cistectomizzati e 12 pazienti che hanno subito procedure chirurgiche per patologie non oncologiche e che hanno fornito materiale tissutale non neoplastico, fungendo da controlli. I campioni tissutali sono stati esaminati mediante gel elettroforesi bidimensionale per l'analisi preliminare del proteoma che ha consentito di identificare spots di interesse successivamente analizzati mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa e Western blot. Questa indagine ha consentito di identificare 43 spots di cui 30 espressi in maniera differente nelle cellule uroteliali neoplastiche. 19 di queste proteine sono risultate espresse elusivamente nei tessuti neoplastici, 7 sono risultate correlare con i lo stadio e 1 (p54nrb) anche con la sopravvivenza. Entrambe queste ricerche confermano pertanto la possibilità di potere identificare variabili e costellazioni di variabili prognostiche con significato indipendente rispetto ai classici parametri clinico-patologici (stadio, grado), che possono consentire di identificare i sottogruppi di pazienti più esposti al rischio di recidivare e di morire, candidabili pertanto a trattamenti multimodali.

2) Nell'ambito del secondo filone, abbiamo completato la valutazione dello studio multicentrico italiano nel quale sono stati inclusi 194 pazienti randomizzati a ricevere 4 cicli di chemioterapia con Gemcitabina e Cisplatino (n=102) subito dopo la cistectomia, o lo stesso trattamento ma solo in caso di progressione (n=92). I pazienti del primo gruppo sono stati inoltre randomizzati a due diverse schedule di somministrazione del Cisplatino. I due gruppi di pazienti sono

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

risultati ben bilanciati per età, stadio di malattia, grado di differenziazione del tumore primario. I risultati preliminari, ad un follow-up mediano di 32.5 mesi, dimostrano tuttavia che il trattamento adiuvante con Gemcitabina e Cisplatino non è risultato in grado di ridurre il rischio di ricaduta e la mortalità, sottolineando il ruolo ancora controverso della chemioterapia adiuvante nel CMIV e la necessità di implementare nuovi studi, probabilmente mirati a pazienti meglio selezionati, sia in relazione al rischio di ricaduta ma anche alla possibilità di beneficiare dei trattamenti chemioterapici attualmente disponibili.

### *Elenco pubblicazioni:*

Boccardo F.-Palmeri L.  
Adjuvant chemotherapy of bladder cancer.  
Ann. Oncol. 17(suppl):v129/v132, 2006

Galmozzi F.-Rubagotti A.-Romagnoli A.-Carmignani G.-Perdelli L.-Gatteschi B.-Boccardo F.  
Prognostic value of cell cycle regulatory proteins in muscle infiltrating bladder cancer.  
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 132:757/764, 2006

Barboro P.-Rubagotti A.-Orecchia P.-Spina B.-Truini M.-Repaci E.-Carmignani G.-Romagnoli A.-Introini C.-Boccardo F.-Carnemolla B.-Balbi C.  
Differential proteomic analysis of nuclear matrix in muscle invasive bladder cancer: potential to improve diagnosis and prognosis.  
Cell. Oncol. 30:13/26, 2008

### *Presentazione a convegni:*

Barboro P.-Rubagotti A.-Orecchia P.-Repaci E.-Carpena D.-Spina B.-Truini M.-Carmignani G.-Romagnoli A.-Introini C.-Boccardo F.-Carnemolla B.-Balbi C.  
Differential proteomic analysis of nuclear matrix in muscle-invasive bladder cancer: potential to improve diagnosis and prognosis  
XVII Congresso Nazionale Società Italiana di Urologia Oncologica (S.I.Ur.O.) 79, 3, Supplemento 2 Abs 95, 2007

Cognetti F.-Ruggeri EM.-Felici A.-Gallucci M.-Muto G.-Pollera CF.-Massidda B.-Rubagotti A.-Giannarelli D.-Boccardo F.-on behalf of the Study Group.  
Adjuvant chemotherapy (AC) with cisplatin+gemcitabine (CG) versus chemotherapy (CT) at relapse (CR) in patients (pts) with muscle-invasive bladder cancer (MIBC) submitted to radical cystectomy (RC). An Italian multicenter randomised phase III trial.  
ASCO Annual Meeting Proceedings J. Clin. Oncol. 26:5023, 2008

## **Nuove strategie di trattamento ormonale del carcinoma mammario in fase adiuvante**

*Linea di ricerca:* 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

*Programma:* b - Valutazione dell'efficacia di nuovi approcci terapeutici: studio di nuovi farmaci, di nuove associazioni, di nuove tecniche, tecnologie o strategie terapeutiche

*Responsabile:* Francesco Boccardo

*Partecipanti:* Pamela Guglielmini, Alessandra Rubagotti, Mario Roberto Sertoli

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* carcinoma mammario; terapia adiuvante; ormonoterapia

*Altre strutture IST:* S.C. Oncologia Medica A; S.C. Oncologia Medica C; S.C. Oncologia Chirurgica

*Altri Enti coinvolti:* Centri universitari ed ospedalieri coinvolti nei precedenti studi collaborativi sul carcinoma mammario in fase adiuvante

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica sperimentale

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* Aziende farmaceutiche

### *Background*

Il carcinoma mammario rappresenta tuttora la neoplasia più frequente nel sesso femminile e la prima causa di morte per tumore. La terapia ormonale rappresenta una importante risorsa per la stragrande maggioranza delle pazienti affette da neoplasie endocrino-responsive. Mentre il Tamoxifene (TAM) ha rappresentato il trattamento di scelta per queste pazienti, studi più recenti hanno dimostrato la superiorità anche in fase adiuvante degli inibitori dell'aromatasi, sia quando utilizzati come terapia "up-front", al posto del TAM, sia quando utilizzati in maniera sequenziale dopo TAM. I benefici ottenuti dall'impiego di questi farmaci hanno generato raccomandazioni per il loro impiego non solo

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

limitatamente alle pazienti che non tollerano il TAM , che sono a rischio per questa terapia o che sono "poor metabolizers" in quanto portatori di polimorfismi del gene che codifica per CYP2D6. I risultati degli studi attuali lasciano tuttavia insoluti alcuni problemi: 1) quale tipo di strategia (up-front versus sequenziale) sia preferibile 2) quale sequenza sia preferibile 3) quali siano le possibilità di superamento della resistenza agli antiaromatasi.

*Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari:*

Il progetto di ricerca si proponeva innanzi tutto di completare l'analisi dei precedenti studi di "switching" e di partecipare a progetti collaborativi basati su metanalisi di studi con antiaromatasi.

Attraverso lo sviluppo di collaborazioni e sinergie con altri Centri e con l'Industria Farmaceutica, era nostro obiettivo inoltre implementare sperimentazioni cliniche in grado di rispondere correttamente ai quesiti ancora irrisolti.

In particolare intendevamo attivare nuovi studi di "switching" basati sull'impiego sequenziale di antiaromatasi non steroidei e steroidei che, oltre a possedere un diverso profilo di tipo farmacocinetico e farmacodinamico, possiedono un meccanismo di azione diverso alla base della loro non cross-resistenza. In particolare abbiamo disegnato uno studio con questi farmaci in sequenza nell'ambito del progetto "DOUBLE", il cui obiettivo primario è dimostrare la superiorità del trattamento col doppio inibitore su end-point primari come la DFS e la sopravvivenza globale. Questo progetto include inoltre studi ancillari, su un campione più limitato di pazienti, per studiare l'effetto dello switching con doppio inibitore su end-points secondari, come per esempio gli effetti osteopenizzanti. Inizialmente avevamo previsto di valutare anche le potenzialità derivanti dal sequenziamento di un inibitore delle aromatasi con un antiestrogeno puro come Fulvestrant. Purtroppo questo farmaco non è stato ancora reso disponibile per la sperimentazione in fase adiuvante.

*Beneficiari*

Centri di ricerca impegnati negli stessi campi di interesse. Industria farmaceutica. Pazienti affette da neoplasie mammarie operate e candidate ad essere trattate in fase adiuvante con terapie endocrine ed in particolare al trattamento con inibitori dell'aromatasi.

*Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008*

Nel corso del triennio sono state completate alcune analisi ulteriori dei precedenti studi di switching che hanno dimostrato che questo approccio può fornire un vantaggio anche in termini di mortalità.

Per meglio evidenziare l'effetto dell'early switching sulla mortalità, abbiamo condotto una metanalisi dei due studi di switching da noi precedentemente condotti, rispettivamente con aminoglutetimide e anastrozolo. I risultati ottenuti esaminando una coorte di oltre 800 pazienti hanno confermato come lo switching a un inibitore dell'aromatasi di pazienti non ancora progredite al trattamento iniziale con TAM ha effetto sia sulla mortalità cancro-specifica che sulla mortalità globale.

I risultati da noi ottenuti sono stati confermati da due metanalisi, alle quali abbiamo contribuito oltre che con i nostri dati, anche in fase di implementazione, analisi e discussione dei risultati. La prima metanalisi, alla quale abbiamo contribuito con i dati dello studio ITA, ha valutato l'effetto dello switching nell'ambito dei tre studi con anastrozolo. Questa analisi ha incluso oltre 4.000 pazienti ed ha confermato il vantaggio dell'early switching anche in termini di riduzione di mortalità. Abbiamo inoltre contribuito al progetto AGOI che ha analizzato i dati di recidività e di mortalità di oltre 18.000 pazienti arruolate sia negli studi di trattamento con inibitore up-front, in confronto con TAM, sia negli studi di early-switching. I risultati di questa metanalisi hanno confermato la potenziale superiorità del trattamento con inibitore rispetto al trattamento up-front con TAM, soprattutto nelle pazienti a rischio più elevato, e la potenziale utilità dello switching. Questi risultati, unitamente ai risultati preliminari degli studi di sequenziamento, ci hanno fornito il razionale per disegnare una nuova strategia di trattamento basata sul sequenziamento di diverse classi di inibitori di aromatasi.

Il progetto "DOUBLE" (doppio inibitore), studio multicentrico, randomizzato di fase III di confronto tra cinque anni di trattamento con inibitore dell'aromatasi non steroideo (anastrozolo o letrozolo) versus switching all'inibitore non steroideo, esamestane, dopo i primi 2-3 anni di terapia con inibitore non steroideo, in donne in postmenopausa con carcinoma mammario ormonoresponsivo in stadio iniziale, rappresenta il frutto di questa nuova strategia e l'obiettivo di questo filone di ricerca per il prossimo triennio.

*Elenco pubblicazioni:*

Boccardo F.-Rubagotti A.-Guglielmini P.-Fini A.-Paladini G.-Mesiti M.-Rinaldini M.-Scali S.-Porpiglia M.-Benedetto C.-Restuccia N.-Buzzi F.-Franchi R.-Massidda B.-Distante V.-Amadori D.-Sismondi P.

Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer. Updated results of the italian tamoxifen anastrozole (ITA) trial.

Ann. Oncol. 17(suppl):vii10/vii14, 2006

Jonat W.-Gnant M.-Boccardo F.-Kaufmann M.-Rubagotti A.-Zuna I.-Greenwood M.-Jakesz R.

Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone sensitive early stage breast cancer: a meta analysis.

Lancet Oncol. 7:991/996, 2006

Boccardo F.-Rubagotti A.

Switching to aromatase inhibitors in early breast cancer.

Lancet 369:533/535, 2007

Boccardo F.-Rubagotti A.-Aldrighetti D.-Buzzi F.-Cruciani G.-Farris A.-Mustacchi G.-Porpiglia M.-Schieppati G.-Sismondi P.

Switching to an aromatase inhibitor provides mortality benefit in early breast carcinoma. Pooled analysis of 2 consecutive trials.

Cancer 109:1060/1067, 2007

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

Boccardo F.

Switching to anastrozole after tamoxifen improves survival in postmenopausal women with breast cancer.

Nat. Clin. Pract. Oncol. 5:76/77, 2008

### Sviluppo di nuove strategie di trattamento del carcinoma prostatico in fase di ormonorefrattarietà

*Linea di ricerca:* 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

*Programma:* b - Valutazione dell'efficacia di nuovi approcci terapeutici: studio di nuovi farmaci, di nuove associazioni, di nuove tecniche, tecnologie o strategie terapeutiche

*Responsabile:* Francesco Boccardo

*Partecipanti:* Alessandra Rubagotti, Laura Tomasello

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* carcinoma prostatico ormonorefrattario; terapie bersaglio-mirate; angiogenesi; inibitori di tirosin-chinasi; gefitinib; chemioterapia metronomica

*Altre strutture IST:* S.C. Oncologia Urologica

*Altri Enti coinvolti:* Istituto Regina Elena, Roma; Gruppo Uro-oncologico, IOR, Istituto Oncologico Romagnolo; Centri universitari ed ospedalieri già coinvolti negli studi PONCAP

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica sperimentale

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* Aziende farmaceutiche; Ministero della Salute

#### *Background*

L'ormonorefrattarietà rappresenta una tappa obbligata della storia naturale del carcinoma prostatico, purché questa sia sufficientemente lunga. Diversi sono i meccanismi genetici ed epigenetici che portano allo sviluppo di cloni cellulari che sono in grado di sopravvivere e proliferare anche in assenza di stimoli androgenici. In realtà si ritiene attualmente che i fenomeni adattativi, legati per esempio alla metilazione del recettore androgenico, coesistono con i fenomeni di tipo genetico, legati ad una o più mutazioni del recettore androgenico, che favoriscono l'emergenza di cloni in grado di proliferare attraverso l'attivazione di vie di segnale non guidate dall'attivazione del recettore androgenico e che pertanto possono rappresentare nuovi bersagli terapeutici. Qualunque siano infatti i meccanismi implicati nella perdita della ormono-sensibilità, non vi è dubbio che ancor oggi il carcinoma prostatico in fase di ormonorefrattarietà rappresenti una condizione di malattia sempre più frequente, nell'ambito della quale i trattamenti attualmente disponibili hanno una efficacia limitata, anche se i risultati ottenuti più recentemente con la chemioterapia, ed in particolare con i taxanidi, sembrerebbero dimostrare un possibile effetto delle terapie anche sulla sopravvivenza. Da qui la necessità di sviluppare approcci innovativi, identificando nuovi bersagli molecolari e nuove strategie di impiego dei trattamenti già disponibili come la chemioterapia.

#### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

Il progetto si prefiggeva di mettere a punto e valutare approcci terapeutici mirati a nuovi targets come l'EGFR o l'angiogenesi che sono implicati nella progressione neoplastica.

#### *Beneficiari*

Centri di ricerca impegnati negli stessi campi di interesse. Industria farmaceutica. Pazienti affetti da neoplasie prostatiche non più responsive ai trattamenti endocrini di prima e seconda linea.

#### *Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008*

Si sono identificati due target preferenziali.

1) Il recettore per l'EGF è risultato, da studi preclinici in vitro, su linee cellulari ed in vivo, fortemente implicato nel guidare la progressione neoplastica del ca. prostatico ormonorefrattario. Questo recettore è iperespresso fino nel 60-70% dei carcinomi prostatici, soprattutto in quelli meno differenziati, anche se raramente mutato a livello degli esoni 18-20. Queste mutazioni sono di rilievo più frequente nei ca polmonari non small cell e predispongono alla risposta al trattamento con inibitori di tirosino-chinasi come gefitinib.

Sulla base di questo rationale pre-clinico, abbiamo disegnato e condotto uno studio randomizzato di fase II con gefitinib in combinazione con prednisone (versus prednisone e placebo) in un gruppo di pazienti (n=82) con ca. prostatico in fase di ormonorefrattarietà. I risultati, ad un follow-up mediano di 29 mesi (range 26-32), dimostrano che l'aggiunta di gefitinib a prednisone ha un impatto moderato sui risultati ottenibili con prednisone da solo, confermando i risultati degli studi precedentemente condotti con questo inibitore di tirosino-chinasi nei pazienti affetti da ca prostatico ormonorefrattario. Tuttavia un'analisi post hoc dimostra la superiorità della combinazione con gefitinib nei pazienti con malattia più indolente, producendo un beneficio statisticamente significativo sia sul tempo a progressione che sulla mortalità. Questi risultati inducono a riconsiderare sia l'importanza di fattori molecolari di tipo predittivo, al fine di potere identificare a priori i pazienti che possono trarre maggior beneficio da terapie a bersaglio come questa o

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

con altri inibitori di tirosino-kinasi, sia la necessità di selezionare end-point intermedi più appropriati di quelli comunemente impiegati (PSA) e di sperimentare nuovi disegni sperimentali.

2) L'angiogenesi è l'altro target identificato per la sua possibile rilevanza nella progressione neoplastica. La terapia antiangiogenetica prevede l'impiego di sostanze in grado di interferire con l'angiogenesi a differenti livelli: alcune agiscono inibendo la produzione di peptidi pro-angiogenetici, come VEGF, da parte delle cellule tumorali, inattivando queste proteine; altre interferendo con il loro legame ai propri recettori, oppure ancora agendo direttamente sulle cellule endoteliali del microcircolo tumorale, impedendone la migrazione e la proliferazione. Le cellule endoteliali possono per altro rappresentare un bersaglio diretto dei farmaci chemioterapici. Questi farmaci sono stati inizialmente disegnati per eliminare le cellule tumorali danneggiando in maniera irreversibile il loro DNA o l'apparato microtubulare. Per sfruttare a pieno l'azione citocida, questi farmaci sono in genere impiegati alla massima dose tollerabile (MTD), frammezzando la somministrazione con periodi di riposo più o meno lunghi, per consentire di riparare i danni inflitti anche alle cellule normali che proliferano rapidamente, come le cellule ematopoietiche. Questa strategia terapeutica comporta comunque effetti collaterali importanti e offre il fianco allo sviluppo della farmaco resistenza, vista l'elevata instabilità genetica delle cellule tumorali. L'instabilità genetica è causa potenziale della resistenza anche ai farmaci antiangiogenetici più comunemente impiegati, in particolare modo a quelli che sono indirizzati a neutralizzare i fattori pro-angiogenetici prodotti dalla cellula tumorale, che possono subire modificazioni di tipo quantitativo o qualitativo in seguito alla mutazione o al silenziamento dei rispettivi geni. Folkman fu il primo ad intuire che i farmaci citotossici potevano essere in grado di interferire con la proliferazione tumorale non solo danneggiando direttamente le cellule tumorali ma interferendo con la neovascolarizzazione tumorale, danneggiando direttamente le cellule endoteliali ed in particolar modo le cellule staminali e le cellule in fase proliferante. In particolare questo gruppo di ricerca mise a punto una metodologia di somministrazione protratta a basse dosi di farmaci chemioterapici, che fu in seguito denominata metronomica, che si è dimostrata particolarmente efficace a questo riguardo. Studi successivi, condotti anche da altri gruppi, in particolare il gruppo di Kerbel in modelli sperimentali murini, hanno dimostrato che molti farmaci, compresa la ciclofosfamide, alcuni antimetaboliti, le antracicline e alcuni inibitori dei microtubuli, come la vinblastina o i taxanidi, sono più efficaci quando utilizzati secondo questa schedula e, soprattutto, mantengono la loro efficacia anche quando i modelli divengono resistenti agli stessi farmaci dopo l'impiego in maniera intermittente della MTD.

Sulla base di queste premesse, abbiamo disegnato, insieme ai colleghi dell'IRE-IFO di Roma, uno studio di fase I-II con ciclofosfamide, prednisone e docetaxel somministrati con schedula "metronomica" a pazienti affetti da ca. prostatico in fase di ormonorefrattarietà. Per identificare la MTD di docetaxel, secondo la schedula settimanale, quando impiegato in combinazione con ciclofosfamide e prednisone a basse dosi giornaliere, abbiamo completato una prima fase di studio, prevedendo l'impiego di dosi scalari di questo tassano. In questa fase abbiamo arruolato 13 pazienti, dimostrando la possibilità di incrementare fino a 30/mg m<sup>2</sup> la dose settimanale del tassano, senza tossicità di grado 3-4. Questa dose è stata scelta per il completamento del secondo step, arruolando ulteriori 20 pazienti. Poiché l'arruolamento è ancora in corso, non sono disponibili risultati. Una prima valutazione sembra confermare comunque la fattibilità e la discreta maneggevolezza di questo regime terapeutico e risultati preliminari di attività interessanti.

Nel prossimo triennio pensiamo di portare avanti questo filone, valutando l'effetto dei regimi metronomici sulle CEC e sulle CEP, oltre che sulle cellule tumorali circolanti, sia per comprendere meglio i potenziali meccanismi di azione, anche nella prospettiva di combinazione con differenti farmaci antiangiogenetici, sia per valutare nuovi end-point intermedi di attività terapeutica, vista la relativa inaffidabilità del PSA a questo riguardo.

### *Elenco pubblicazioni:*

Boccardo F.-Rubagotti A.-Conti G.-Battaglia M.-Cruciani G.-Manganelli A.-Ricci S.-Lapini A.  
Prednisone plus gefitinib versus prednisone plus placebo in the treatment of hormone refractory prostate cancer: a randomized phase II trial.  
Oncology 74:223/228, 2008

### *Presentazione a convegni:*

Boccardo F.-Rubagotti A.-Tacchini L.-Lapini A.-Cruciani G.-De Rubertis G.-Battaglia M.-Conti G.  
Gefitinib (GE) plus prednisone (P) versus placebo (pl) plus prednisone in the treatment of hormone-refractory prostate cancer (HRPC): A randomized phase II trial.  
ASCO Annual Meeting Proceedings Part I, J. Clin. Oncol. 25(18S):5070, 2007

## **Tattamento con farmaci a bersaglio mirato del carcinoma renale**

*Linea di ricerca:* 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

*Programma:* b - Valutazione dell'efficacia di nuovi approcci terapeutici: studio di nuovi farmaci, di nuove associazioni, di nuove tecniche, tecnologie o strategie terapeutiche

*Responsabile:* Francesco Boccardo

*Partecipanti:* Alessandra Rubagotti, Antonino Cassata, Mario Roberto Sertoli, Laura Tomasello, Pamela Guglielmini

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* carcinoma renale; terapia antiangiogenetica; chemioterapia metronomica

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

*Altre strutture IST:* S.S. Oncologia Molecolare e Angiogenesi, S.C. Oncologia Urologica, S.C. Patologia Clinica

*Altri Enti coinvolti:* Istituto Regina Elena-IFO, Roma

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica sperimentale

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* Ministero della Salute; Novartis SpA; Bayer SpA

### *Background*

L'angiogenesi è il processo che porta alla formazione e allo sviluppo di nuovi vasi sanguigni che insorgono da una rete vascolare preesistente. È noto che i tumori solidi possono crescere senza il supporto di vasi neoformati solo nelle fasi molto iniziali. Il processo di angiogenesi non è normalmente attivo nei tessuti di un individuo adulto sano, tranne che a livello endometriale. Questa situazione di omeostasi è il risultato di un bilanciamento tra i peptidi che stimolano l'angiogenesi (come VEGF, FGF e IL-12) e i fattori endogeni che la inibiscono (come Trombospondina). Nell'angiogenesi tumore associata tale bilanciamento viene meno o per una eccessiva produzione o liberazione di peptidi pro-angiogenetici da parte delle cellule tumorali, dei macrofagi e dello stroma, o per una ridotta produzione di fattori inibitori. In molti casi queste due situazioni coesistono. Nel carcinoma renale è stata documentata una elevata produzione di VEGF e altri fattori pro-angiogenici, in seguito all'aumentata produzione dei fattori di risposta all'ipossia, HIF1alfa e HIF2alfa, in conseguenza della mutazione o delezione del gene VHL contenuto sul braccio corto del cromosoma 3, che codifica per la trombospondina. Queste alterazioni molecolari hanno fornito il razionale per l'impiego di farmaci biologici in grado di interferire con VEGF ed il suo recettore ovvero con bersagli molecolari più a valle della cascata, come m-TOR, che pure sono implicati nell'attivazione dell'angiogenesi e nella loro combinazione con altri trattamenti in grado comunque di interferire con l'angiogenesi.

### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari:*

Il progetto di ricerca aveva come obiettivo lo studio di regimi terapeutici basati sull'impiego della chemioterapia metronomica in associazione ad inibitori di tirosino-kinasi e di RAF, come sorafenib, nei pazienti affetti da carcinoma renale metastatico non più responsivo al trattamento con citochine o comunque non candidati al trattamento tradizionale con citochine, in quanto "poor" risk.

Il progetto prevedeva inoltre di valutare, attraverso analisi di tipo retrospettivo, la possibilità di predire la risposta alle terapie antiangiogenetiche mediante il dosaggio e la conta iniziale (e il successivo monitoraggio) dei livelli circolanti di VEGF e delle CEP e CEC.

### *Beneficiari*

Centri di ricerca interessati allo stesso tipo di problematiche. Industria farmaceutica. Pazienti affetti da carcinoma renale.

### *Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008*

Abbiamo disegnato uno studio di fase II basato sulla combinazione di sorafenib, un inibitore di RAF e VEGF, e Gemcitabina somministrata con schedula metronomica (Studio TAGUS06). Lo studio prevedeva due fasi di arruolamento secondo il classico disegno a due stadi di Simon. Nel corso della prima fase, abbiamo arruolato complessivamente 16 pazienti affetti da carcinoma renale e non eleggibili per altri protocolli con farmaci biologici, la maggioranza dei quali, al momento dell'arruolamento, presentava più di 3 siti di malattia. Tre dei 16 pazienti valutabili risultavano classificabili nella categoria prognostica UISS 1 (18.8%), 7 nella categoria UISS 2 (43.8%) e 6 nella categoria UISS 3 (37.4%). Quattordici pazienti (87.5%) erano stati sottoposti in precedenza a nefrectomia. Undici pazienti (68.8%) avevano ricevuto un precedente trattamento con citochine, in fase di reclutamento. Ad un follow-up mediano di circa 20 mesi, 12 pazienti sono progrediti e 11 sono deceduti. Analizzando tutti i pazienti, il tempo mediano alla progressione è di 6.1 mesi (range 3.1-9.2) e il tempo mediano al decesso è di 10.5 mesi (range 9.9-11.2). Nelle due analisi per sottogruppi, effettuate, la prima raggruppando i pazienti in base alla categoria prognostica UISS e la seconda in base al pregresso trattamento con citochine o meno, si è confermato un tempo mediano a progressione di 6.1 mesi (range 2.0-10.2). È stata eseguita la valutazione della risposta terapeutica in tutti e 16 i pazienti arruolati nello studio: 3 pazienti (18.8%) hanno ottenuto una risposta parziale (documentata secondo la classificazione radiologica RECIST) e 6 (37.5%) una stabilità di malattia, con un "clinical benefit" complessivo del 56.3%, ove, però quest'ultimo parametro è stato calcolato in assenza di una stabilità di malattia di durata uguale o superiore alle 24 settimane. La rivalutazione strumentale ha invece documentato una progressione di malattia in 4 pazienti (25%). Un paziente non è valutabile per la comparsa di una tossicità severa dopo soltanto un mese di trattamento.

Per quanto riguarda la tossicità, 8 pazienti (50%) hanno manifestato una sindrome mano-piede (di grado 3 in 3 pazienti), 4 pazienti (25%) hanno sviluppato stomatite/mucosite e 5 (31.2%) hanno lamentato la comparsa di febbre. Nove pazienti (56.2%) hanno presentato sintomi gastrointestinali e 6 (37.4%) hanno manifestato astenia. In un paziente, dopo due settimane di trattamento, si è verificata la comparsa di fibrillazione atriale (tossicità cardiaca di grado 3), trattata con cardioversione elettrica; un altro paziente, con infiltrazione neoplasmica del bronco principale destro, ha avuto emoftoe (grado 3), trattata con embolizzazione endoscopica endobronchiale. Sono state registrate 2 (12.4%) morti precoci: Al fine di "pesare" in qualche modo i nostri dati, li abbiamo confrontati con quelli riportati in letteratura con sorafenib da solo (braccio sperimentale dello studio Target) nei pazienti pre-trattati con citochine ovvero con Temozolomide, un inibitore di m-TOR attualmente indicato nel trattamento di prima linea dei pazienti "poor risk" (braccio sperimentale dello studio vs IFN). Da tale confronto non sono emerse differenze apprezzabili a vantaggio della combinazione sorafenib-gemcitabina da noi sperimentata, a fronte di effetti collaterali non trascurabili.

Pertanto, pur avendo raggiunto l'end-point previsto per la prima fase del reclutamento a due stadi (almeno 3 risposte nei primi 14 pazienti trattati) abbiamo deciso di chiudere lo studio, senza procedere alla seconda fase di reclutamento che prevedeva il coinvolgimento anche di centri esterni.

# Consuntivo progetti RC 2006-2008

*Presentazione a convegni:*

Tomasello L.-Sertoli MR.-Rubagotti A.-Guglielmini P.-Tacchini L.-Bedognetti D.-Ricci F.-Sanguineti S.-Cassata A.-Boccardo F.

Combination of sorafenib and weekly gemcitabine in patients (pts) with metastatic renal cell Cancer (MRCC): A phase II study, preliminary results.

ASCO Annual Meeting Proceedings J. Clin. Oncol. 26:16011, 2008

## **Caratterizzazione biologica del carcinoma prostatico. Identificazione di nuovi parametri prognostici e di indicatori di risposta alla terapia endocrina**

*Linea di ricerca:* 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

*Programma:* c - Identificazione di indicatori di risposta ai trattamenti

*Responsabile:* Alessandra Rubagotti

*Partecipanti:* Francesco Boccardo, Rosa Mangerini

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* carcinoma della prostata; prognosi; ormonoterapia

*Altre strutture IST:* S.S. Tumori Urologici; S.S. Genomica Funzionale; S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica; S.C. Oncologia Urologica

*Altri Enti coinvolti:* Università di Genova, DISCAT, Clinica Urologica (G. Carmignani)

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica osservazionale

*Area di interesse:* diagnostica

*Soggetti cofinanziatori:* Università di Genova; Ministero della Salute; Compagnia San Paolo

### *Background*

Attualmente in molti Paesi occidentali il ca. prostatico rappresenta il secondo tumore più frequente nel sesso maschile. Tale tendenza si spiega essenzialmente con l'aumentato impiego della determinazione dell'antigene prostatico (PSA) come test di screening opportunistico e la conseguente diagnosi di un numero molto elevato di carcinomi asintomatici e preclinici, anche se non può essere trascurato il contributo legato al progressivo invecchiamento della popolazione maschile. Con l'aumentare dell'incidenza di questa malattia è parallelamente aumentato l'interesse verso lo studio di variabili prognostiche in grado di discriminare le neoplasie meno aggressive - che potrebbero anche giovare di un approccio di tipo attendistico - da quelle più aggressive, che viceversa potrebbero avvantaggiarsi da approcci di tipo multimodale ed, in particolare, dell'impiego in fase precoce delle terapie ormonali a scopo adiuvante e neoadiuvante. A questo riguardo un aspetto rilevante ed innovativo è rivestito dagli studi di proteomica e genomica. Tra gli studi di proteomica, crescente rilevanza hanno assunto le ricerche sull'espressione del pattern di espressione delle proteine che compongono la matrice nucleare (NM). Cambiamenti nel pattern dell'espressione genica che avvengono durante il processo neoplastico potrebbero infatti essere guidati, almeno in parte, da alterazioni nelle funzioni regolatrici esercitate dalla NM. Numerosi studi sul carcinoma prostatico hanno dimostrato che questa neoplasia è caratterizzata da profondi riarrangiamenti quali-quantitativi della NM; inoltre l'espressione di alcune proteine è significativamente correlata al rischio di progressione biochimica dopo prostatectomia radicale.

### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari:*

L'attività di ricerca si è articolata in due filoni principali, entrambi volti allo studio in vitro, in linee cellulari dei pattern di espressione proteica di neoplasie prostatiche in varie condizioni di crescita e, in vivo, in campioni di tessuto neoplastico ottenuti da pazienti prostatectomizzati e seguiti in follow-up presso il nostro Istituto. Lo scopo ultimo era quello di contribuire a chiarire il ruolo della NM nella progressione neoplastica e nello sviluppo dell'ormonorefrattarietà ed identificare nuovi indici prognostici e nuovi bersagli terapeutici.

### *Beneficiari*

Centri interessati a questo tipo di problematiche di ricerca. Pazienti affetti da carcinoma prostatico.

### *Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008*

1) Gli studi condotti su linee cellulari in vitro hanno evidenziato l'esistenza di una omologia tra i patterns di espressione delle proteine della matrice nucleare delle linee cellulari utilizzate per questi esperimenti e le neoplasie asportate chirurgicamente. In particolare è stato evidenziato che, mentre le proteine NM-6 e NM-8 sono espresse sia dalle cellule ormono-sensibili (LNCap) che da quelle ormoindipendenti (PC3), la proteina NM-7 è espressa solo da queste ultime. Anche questo dato sembrerebbe dimostrare l'importanza della proteina NM-7 come fattore di progressione. Gli attuali studi hanno inoltre confermato in via preliminare che la espressione di queste proteine è ridotta dalla esposizione a antiandrogeni come la bicalutamide, che sono comunemente utilizzati nel trattamento del carcinoma prostatico umano. Questo fenomeno è osservabile nella linea ormono-sensibile LNCap, ma non nella linea androgeno-resistente PC3.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

2) Si è proceduto ad ampliare e aggiornare il follow-up di una coorte di pazienti sottoposti a prostatectomia radicale per neoplasia prostatica e a valutare il significato prognostico del pattern di espressione delle proteine della matrice nucleare. L'attuale analisi, condotta su 101 pazienti ad un follow-up mediano di 98 mesi, ha permesso di confermare che la espressione delle proteine NM-6, NM-7 e NM-8 è significativamente correlata con il rischio di ricaduta biochimica e, per la prima volta, di correlare questo dato con il rischio di morte. Anche in questa analisi il rischio maggiore è stato evidenziato per le neoplasie che esprimevano tutte e tre queste proteine, a supporto della ipotesi che la co-espressione sia importante per guidare la trascrizione di geni implicati nella progressione neoplastica. Questa ipotesi verrà verificata mediante gli studi di "gene profiling".

I risultati di queste ricerche ci hanno indotto a sequenziare queste tre proteine che sono risultate omologhe alla proteina hnr npK e a due frammenti della CK10. Gli studi hanno riguardato principalmente la proteina K, che è stato possibile identificare anche attraverso metodiche immunostochiche. I risultati preliminari hanno confermato il significato prognostico di K, che potrebbe rappresentare non solo un nuovo marker della cancerogenesi prostatica, utilizzabile sia a fini diagnostici che prognostici, ma anche un nuovo target terapeutico. L'implementazione di queste ricerche e di studi per validarne la possibile ricaduta a livello clinico rappresenta l'obiettivo di ricerca per il prossimo triennio.

### *Elenco pubblicazioni:*

Coradeghini R.-Barboro P.-Rubagotti A.-Boccardo F.-Parodi S.-Carmignani G.-D'arrigo C.-Patrone E.-Balbi C.  
Differential expression of nuclear lamins in normal and cancerous prostate tissues.  
Oncol. Rep. 15:609/613, 2006

Barboro P.-Repaci E.-Rubagotti A.-Salvi S.-Boccardo S.-Spina B.-Truini M.-Introini C.-Puppo P.-Ferrari N.-Carmignani G.-Boccardo F.-Balbi C.  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer.  
Br. J. Cancer, in press

Rubagotti A.-Boccardo F.-Mangerini R.-Carmignani G.-Repaci E.-Barboro P.-Balbi C.  
Nuclear matrix proteins 6,7 and 8 predict for disease recurrence and survival in early prostate cancer patients  
In preparation

### *Presentazione a convegni:*

Barboro P.-Carpina D.-Repaci E.-Rubagotti A.-Boccardo F.-Salvi S.-Carnemolla B.-Romagnoli A.-D'Arrigo C.-Balbi C.  
Espressione differenziale delle lamine nucleari e dell'hnrNP K nel tumore prostatico  
XVI Congresso Nazionale Società Italiana di Urologia Oncologica (S.I.Ur.O.)Vol. 78; n. 3, Supplement 2, 192, 2006

Barboro P.-Repaci E.-Carpina D.-Salvi S.-Boccardo S.-Spina B.-Truini M.-Rubagotti A.-Boccardo F.-Balbi C.  
HNRNP K: Un nuovo biomarcatore per il tumore prostatico.  
XVIII Congresso Nazionale Società Italiana di Urologia Oncologica (S.I.Ur.O.)Vol. 80; n. 3, Supplement 1, 33, 2008