

## S.C. Terapia Immunologica

### Meccanismi molecolari di regolazione dell'adesione cellulare in corso di neoplasia e risposta immunitaria

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni ospite-tumore

*Programma:* a - Infiammazione, immunità innata e tumore

*Responsabile:* Marina Fabbi

*Partecipanti:* Silvano Ferrini, Anna Maria Orengo

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* adesione cellulare; proteolisi; crescita invasiva; attivazione cellulare; trasduzione del segnale

*Altre strutture IST:* S.C. Trasferimento Genico (D. De Toter); S.S. Oncologia Molecolare e Angiogenesi; S.C. Oncologia Ginecologica

*Altri Enti coinvolti:* Istituto Nazionale Tumori, Milano (S. Canevari); Università degli Studi di Pisa (A. Rossello); Istituto G. Gaslini, Genova (C. Gambini); Università di Heidelberg, Germania (A. Bierhaus)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* MIUR FIRB; Regione Liguria

#### *Background*

Una modulazione orchestrata dell'adesione cellulare è essenziale per lo sviluppo e l'omeostasi degli organismi multicellulari. Molecole di adesione infatti regolano una varietà di funzioni cellulari che vanno dalla migrazione alla comunicazione intercellulare, alla risposta infiammatoria, all'angiogenesi. Nella biologia del tumore il controllo dinamico delle molecole di adesione è importante in tutte le fasi del processo di metastatizzazione, dal distacco dal tumore primario all'invasione di altri distretti. Interazioni multiple e interconnesse giocano un ruolo critico in tutti questi processi, tuttavia la conoscenza del contributo di ciascuna molecola di adesione è essenziale nella definizione di complesse reti di interazioni. In uno studio precedente abbiamo identificato, mediante lo screening di anticorpi prodotti in librerie fagiche (scFv), la molecola di adesione intercellulare ALCAM/CD166 sulla superficie di carcinomi ovarici. Mediante tali scFv sono state definite alcune proprietà della molecola, quali internalizzazione e ricircolo. Inoltre, la letteratura indica che ALCAM può funzionare come un sensore di densità cellulare capace di regolare l'attività proteolitica che avvia la mobilizzazione cellulare, e che la sua espressione è correlata alla progressione di diverse patologie oncologiche (melanoma, carcinoma della mammella, della prostata e del colon). In particolare, è stato dimostrato in cellule di melanoma che l'alterazione della adesione omofila di ALCAM, ottenuta attraverso la generazione di mutanti di delezione, determina un incremento del distacco di cellule dal tumore primario e della loro disseminazione. Questo suggerisce che la regolazione dinamica di ALCAM sulla superficie cellulare sia direttamente coinvolta nei processi di metastatizzazione.

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

L'obiettivo generale del progetto è la caratterizzazione del ruolo di ALCAM nella progressione tumorale e disseminazione metastatica, particolarmente nel carcinoma ovarico e nel neuroblastoma. Questo obiettivo viene perseguito attraverso lo studio dei seguenti aspetti della biologia di ALCAM.

- Studio in vitro del controllo dinamico di ALCAM sulla superficie cellulare, in particolare del rilascio ('shedding') della molecola e del suo rapporto con la mobilizzazione cellulare. Studio dei meccanismi di rilascio in relazione sia ai processi di attivazione cellulare, per esempio da parte di chinasi, che all'induzione di attività proteolitica, per esempio a carico di metalloproteasi. Studio della funzione pro- o anti-adesiva della molecola rilasciata e solubile, nell'ambito della biologia del tumore.
- Analisi dell'espressione di ALCAM in rapporto alla capacità di adesione e diffusione metastatica di cellule tumorali.
- Caratterizzazione dell'attività in vitro di una serie di inibitori di metalloproteasi di nuova sintesi, forniti dall'Università degli Studi di Pisa, e disegnati per incrementare la specificità dell'inibizione di ADAM17/TACE.
- Valutazione del valore prognostico dell'espressione di ALCAM in carcinoma ovarico e neuroblastoma, utilizzando ampie e ben caratterizzate casistiche a disposizione grazie alla collaborazione con l'INT di Milano e con l'Istituto G. Gaslini, rispettivamente.

#### *Beneficiari*

Comunità scientifica e Servizio Sanitario Nazionale.

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

Per quanto riguarda lo studio in vitro del controllo dinamico di ALCAM sulla superficie cellulare, soprattutto in relazione al distacco e mobilizzazione delle cellule dal substrato, abbiamo dimostrato che ALCAM è rilasciato in forma solubile da cellule di carcinoma ovarico, che il processo di rilascio è stimolato da recettori tirosina-chinasi come EGFR ed è mediato dall'attività proteolitica di metalloproteasi. Inoltre, la forma solubile di ALCAM così generata è costituita dalla maggior parte del dominio extracellulare della molecola. Una forma solubile di ALCAM strutturalmente analoga è stata individuata nel liquido ascitico e nel siero di pazienti affette da carcinoma ovarico, suggerendo che il processo

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

caratterizzato in vitro sia operativo anche in vivo. Esperimenti con inibitori farmacologici o silenziamento genico mediante siRNA ci hanno permesso di identificare nella metalloproteasi ADAM17/TACE l'enzima responsabile del taglio proteolitico di ALCAM e della generazione di ALCAM solubile. ADAM17/TACE è l'enzima responsabile dell'attivazione del TNF-alfa, mediante clivaggio della forma di membrana in forma solubile. Inoltre ADAM17/TACE promuove il rilascio di ligandi attivi di EGFR permettendo loro di attivare questo recettore tirosin cinasico, coinvolto nell'attivazione della proliferazione cellulare. Esperimenti di inibizione della metalloproteasi o di blocco delle funzioni adesive di ALCAM hanno evidenziato che la de-localizzazione di ALCAM dalla membrana è un momento importante nell'invasività di cellule di carcinoma ovarico in vitro (Rosso et al., Mol Cancer Res. 2007). Poiché sALCAM può essere rilevato mediante test immunoenzimatici, è stato avviato lo studio della presenza di ALCAM in siero e asciti di pazienti a storia clinica nota, per valutarne il potenziale ruolo di marcatore prognostico nelle neoplasie ovariche. I dati di questo studio sono in corso di elaborazione.

Relativamente alla valutazione del significato prognostico dell'espressione di ALCAM in carcinoma ovarico, dallo studio clinico svolto in collaborazione con il Laboratorio di Terapia Molecolare dell'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano è emerso che la delocalizzazione di ALCAM dalla membrana cellulare al citoplasma è un fattore prognostico negativo e predittivo della sopravvivenza. La localizzazione citoplasmatica di ALCAM potrebbe quindi essere utile nell'identificazione di pazienti da avviare ad un follow up più frequente o a modalità terapeutiche alternative (Mezzanzanica et al., Clin Cancer Res 2008).

Partendo dall'ipotesi di lavoro che ADAM17/TACE svolga un ruolo centrale nella progressione dei tumori ovarici mediando il distacco intercellulare attraverso il taglio proteolitico di ALCAM e attivando loop paracrini EGFR-dipendenti, sono stati sintetizzati dal gruppo del Prof. A. Rossello dell'Università di Pisa nuovi inibitori farmacologici di ADAM17/TACE, potenzialmente utilizzabili in esperimenti in vivo in topi portatori di xenotrapianti. La fase di caratterizzazione dell'attività in vitro su linee cellulari di tali inibitori si è conclusa ed i risultati sono raccolti in una richiesta di brevetto attualmente in fase di preparazione.

Partendo dalla considerazione che ALCAM è stato correlato a progressione e metastatizzazione in tipi di tumore diversi, e che partecipa allo sviluppo del sistema nervoso, è stato svolto lo studio di ALCAM come potenziale marcatore prognostico in pazienti con neuroblastoma, grazie alla collaborazione con l'Istituto G. Gaslini di Genova. In questo studio dimostriamo che ALCAM è espresso a vari livelli anche nel neuroblastoma, e che può essere rilasciato in forma solubile ad opera di ADAM17/TACE. Inoltre, l'analisi di una coorte, piccola ma omogenea, di casi di neuroblastoma localizzato, operabile, 'schwannian stroma-poor' ha dimostrato che, in assenza di fattori prognostici negativi noti, alta espressione di ALCAM sulla membrana del neuroblasto e bassa espressione a livello del neuropilo sono significativamente associati alla comparsa di recidive locali. I dati relativi sono raccolti in un manoscritto (Corrias MV, Gambini C, Gregorio A, Croce M, Barisione G, Cossu C, Rossello A, Ferrini S and Fabbi M. ALCAM as potential prognostic marker in patients with localized schwannian stroma-poor neuroblastoma. Submitted 2008) che è al momento sottomesso per la pubblicazione.

### *Elenco pubblicazioni:*

Rosso O.-Piazza T.-Bongarzone I.-Rossello A.-Mezzanzanica D.-Canevari S.-Orengo A.-Puppo A.-Ferrini S.-Fabbi M.  
The ALCAM shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE is involved in motility of ovarian carcinoma cells.  
Mol. Cancer Res. 5:1246/1253, 2007

Mezzanzanica D.-Fabbi M.-Bagnoli M.-Staurengo S.-Losa M.-Balladore E.-Alberti P.-Lusa L.-Ditto A.-Ferrini S.-Pierotti M.-Barbareschi M.-Pilotti S.-Canevari S.  
Subcellular localization of activated leukocyte cell adhesion molecule is a molecular predictor of survival in ovarian carcinoma patients.  
Clin. Cancer Res. 14:1726/1733, 2008

### **Studio di risposte anticorpali e cellule-mediate protettive indotte nell'animale da diverse strategie immunoterapeutiche**

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni ospite-tumore

*Programma:* c – Alterazioni dell'immunità innata associata ai tumori e meccanismi di sovversione delle risposte antitumorali

*Responsabile:* Anna Maria Orengo

*Partecipanti:* Silvano Ferrini

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* vaccinazione; TAA; anticorpi; risposte cellule-mediate; citochine

*Altre strutture IST:* Animal Facility; S.C. Oncologia Ginecologica

*Altri Enti coinvolti:* Università di Bologna (PL. Lollini); Istituto G. Gaslini, Genova (M.V. Corrias, V. Pistoia)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

*Soggetti cofinanziatori:* AIRC; Regione Liguria

### *Background*

Nel corso degli ultimi anni sono state sviluppate nuove strategie immunoterapeutiche basate sull'utilizzo di cellule tumorali ingegnerizzate con geni di citochine immunostimolanti e/o di molecole co-stimolatorie. Scopo del progetto è lo studio preclinico di questo approccio terapeutico e delle modalità di potenziamento delle risposte immuni da esso indotte, mediante co-espressione di molecole immunostimolanti (citochine e CD40L). Saranno caratterizzate le risposte nell'animale da esperimento, al fine di valutare l'eventuale ruolo protettivo svolto dalla risposta anticorpale, mediante induzione di ADCC o CDC, e quello delle risposte cellulo-mediate, attraverso l'induzione di citochine secondarie o tramite l'attivazione del programma citolitico.

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

Un obiettivo del progetto riguarda lo studio delle risposte terapeutiche anti-tumorali indotte nel modello neuroblastoma N2a/topo singenico A/J. Il nostro protocollo prevede che gli animali vengano inoculati con cellule N2a parentali tumorigeniche e quindi sottoposti a terapia sequenziale con cellule ingegnerizzate con geni di citochine immunostimolanti. Studi recenti ci hanno indicato che nel caso di terapia con N2a ingegnerizzate con i geni di IL-12 e IL-15 l'effetto terapeutico osservato è mediato principalmente da linfociti CD8+, che sono responsabili di una risposta citotossica tumore-specifica. Intendiamo ora studiare gli effetti di questa strategia immunoterapeutica utilizzando altre citochine immunostimolanti ed attuare analoghi protocolli di terapia in topi transgenici per il proto-oncogene MycN, che sviluppano spontaneamente una malattia simile al neuroblastoma umano.

Altri obiettivi del progetto, in collaborazione con il Prof. Lollini dell'Università di Bologna, riguardano lo studio di strategie in grado di prevenire l'insorgenza spontanea di tumori nel topo Balb/c transgenico per HER-2/neu e nel topo TRAMP.

Inoltre, nel momento in cui sarà attivato un trial clinico di vaccinazione nel melanoma, intendiamo utilizzare le competenze acquisite negli studi preclinici, per valutare il tipo di risposta indotta nel paziente, mediante test di rilascio di citochine da parte di linfociti T co-coltivati con il melanoma autologo, test di immunofluorescenza con tetrameri per gli antigeni del melanoma noti, test di citotossicità e valutazione di eventuali risposte anticorpali.

Infine intendiamo valutare le risposte immuni in pazienti affette da neoplasie ginecologiche, sia in termini di produzione di citochine che di risposta anticorpale.

### *Beneficiari*

Comunità scientifica e Servizio Sanitario Nazionale.

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

Nel corso di questi anni abbiamo valutato l'efficacia della terapia basata sull'utilizzo di cellule di neuroblastoma murino N2a trasfettate con il gene della citochina immunostimolante IL-21 nel topo singenico AJ. Il nostro protocollo prevedeva che gli animali venissero inoculati con cellule N2a parentali tumorigeniche e quindi sottoposti a terapia con cellule ingegnerizzate. In animali affetti da micrometastasi una singola vaccinazione sc con N2a/IL-21 aumenta significativamente il tempo medio di sopravvivenza degli animali trattati (43 giorni vs 22,  $P=0.0001$ ) e cura a lungo termine il 14% di loro. La somministrazione di due o tre dosi di vaccino incrementa ulteriormente il tempo di sopravvivenza e la % degli animali curati (sino al 30%). Esperimenti di deplezione "in vivo" ci hanno indicato che l'effetto terapeutico è mediato da linfociti CD8+ responsabili di una risposta citotossica tumore-specifica, mentre il coinvolgimento del compartimento B è limitato ad una risposta anticorpale a basso titolo. Un bersaglio antigenico dei linfociti CD8+ è rappresentato dalla survivina (Croce et al., 2008), un antigene pan-tumorale coinvolto nelle risposte T-mediate in molti tumori umani, inclusi i neuroblastomi, mentre l'antigene retrovirale endogeno gp70env, non sembra svolgere un ruolo immunodominante, come avviene in altri tumori murini, quali ad esempio l'adenocarcinoma mammario TS/A (Comes et al., 2006).

Inoltre, in questo modello preclinico, abbiamo valutato la possibilità di conferire immunità passiva nei confronti delle cellule tumorali ad animali "naive" trasferendo loro linfociti CD8+, artefici del rigetto, prelevati da animali precedentemente immunizzati. Abbiamo condotto esperimenti di "winn assay" inoculando s.c. in animali immunodeficienti cellule tumorali e cellule CD8+ provenienti da animali immuni o da animali naive. In nessuno degli animali inoculati con linfociti CD8+ immuni si osservava crescita del tumore che invece era visibile in tutti quelli inoculati con cellule CD8+ di animali naive.

Abbiamo inoltre portato a termine il progetto, in collaborazione con il Prof. Lollini dell'Università di Bologna, sullo studio di strategie in grado di prevenire lo sviluppo spontaneo di tumori alla prostata nei topi transgenici TRAMP, un modello che mima l'insorgenza spontanea di tumori nell'uomo (De Giovanni et al., 2008). Sono stati studiati approcci di immunoprofilassi attiva basata sull'utilizzo di cellule allogene che esprimono l'antigene large T di Sv40 combinata alla somministrazione per via sistemica di IL-12 ricombinante a partire dalla quinta settimana di vita, quando cioè l'animale è ancora privo di tumore. La vaccinazione combinata raddoppia il tempo di latenza dell'insorgenza dei tumori (53 settimane vs 26,  $P=0.05$ ) e si associa ad una risposta anticorpale diretta contro l'antigene large T, di cui è stata dimostrata una localizzazione sulla membrana cellulare.

Infine abbiamo creato una banca di sieri di donne affette da neoplasie ginecologiche, dove abbiamo valutato la presenza di citochine endogene e potenzialmente immunostimolanti. Abbiamo riscontrato che i livelli sierici di IL-18 in queste pazienti sono significativamente più alti rispetto a quelli rilevati in sieri di controlli sani. Ulteriori studi sono in corso per chiarire la rilevanza clinica di questa osservazione, l'eventuale ruolo diagnostico/prognostico di tale citochina ed il possibile ruolo biologico dell'IL-18 nella storia naturale del carcinoma ovarico.

### *Elenco pubblicazioni:*

Comes A.-Rosso O.-Orengo A.-Di Carlo E.-Sorrentino C.-Meazza R.-Piazza T.-Valzasina B.-Nanni P.-Colombo M.-Ferrini S.

CD25+ regulatory T cell depletion augments immunotherapy of micrometastases by an IL/21 secreting cellular vaccine.

J. Immunol. 176:1750/1758, 2006

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

Daga A.-Orengo A.-Gangemi R.-Marubbi D.-Perera M.-Comes A.-Ferrini S.-Corte G.  
Glioma immunotherapy by IL/21 gene modified cell or by recombinant IL/21 involves antibody responses.  
Int. J. Cancer 121:1756/1763, 2007

De Giovanni C.-Crocchi S.-Nicoletti G.-Landuzzi L.-Palladini A.-Pannellini T.-Borgia L.-Iezzi M.-Di Carlo E.-Orengo A.-Kennedy R.-Lollini P.-Nanni P.-Musiani P.  
Inhibition of prostate carcinogenesis by combined active immunoprophylaxis.  
Int. J. Cancer 121:88/94, 2007

Croce M.-Meazza R.-Orengo A.-Fabbi M.-Borghi M.-Ribatti D.-Nico B.-Carlini B.-Pistoia V.-Corrias M.-Ferrini S.  
Immunotherapy of neuroblastoma by an interleukin/21 secreting cell vaccine involves survivin as antigen.  
Cancer Immunol. Immunother. 57:1625/1634, 2008

### Inibizione dell'immunosoppressione neoplastica e citochine nell'immunoterapia dei tumori

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni ospite-tumore

*Programma:* f - Sviluppo preclinico e di fase I di terapie biologiche antitumorali: immunoterapia, immunoterapia adottiva, terapie "antisense", terapia antiangiogenica, terapia genica e terapia cellulare

*Responsabile:* Silvano Ferrini

*Partecipanti:* Marina Fabbi, Anna Maria Orengo, Rosaria Gangemi

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* citochine; immunoterapia; immunosoppressione indotta da tumore

*Altre strutture IST:* S.C. Trasferimento Genico; S.C. Immunologia; S.C. Oncologia Medica A; Banca Biologica e Cell Factory; Animal Facility

*Altri Enti coinvolti:* INT, Milano (M. Colombo); Università di Bologna (PL. Lollini, P. Nanni); Università di Chieti (E. Di Carlo); Università di Varese (R. Accolla); Istituto G. Gaslini, Genova (V. Corrias, V. Pistoia, R. Meazza)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* AIRC; Ministero della Salute

#### Background

E' noto che il sistema immunitario può riconoscere come estranee le cellule tumorali e che mediante immunostimolazione è possibile indurre un effetto anti-tumorale preventivo o terapeutico. Peraltro, i tumori in fase avanzata inducono una serie di meccanismi immunosoppressivi che inibiscono la risposta immune anti-tumore, limitando l'efficacia dell'immunoterapia. Fattori prodotti dal tumore (PGE2, VEGF, Galectin-1, TGF-beta etc.) possono sopprimere direttamente risposte dei linfociti T, o reclutare cellule soppressive di origine linfoide (cellule T regolatorie, Treg o Tr1), mieloidi (MSC) o macrofagi tumore associati (TAM) con fenotipo immunosoppressivo. Pertanto si ritiene che l'utilizzo di agenti farmacologici o biologici in grado di bloccare l'immunosoppressione tumorale sia un pre-requisito necessario per l'immunoterapia attiva. In particolare, intendiamo utilizzare come immunostimolanti citochine come l'IL-12 o nuovi membri della famiglia dell'IL-2, come IL-15 ed IL-21 che condividono funzioni immunostimolanti con l'IL-2. Il razionale per utilizzare queste nuove molecole anziché IL-2 è basato sul fatto che IL-2 attiva meccanismi di immunosoppressione, quali lo sviluppo di Treg e l'induzione di apoptosi di linfociti effettori attivati (AICD). Ricerche in un modello murino ci hanno permesso di dimostrare che cellule TS/A di adenocarcinoma mammario trasdotte con IL-21 vengono rigettate con meccanismi immuno-mediati e che tali cellule trasdotte, utilizzate come vaccino terapeutico, allungano il tempo di sopravvivenza tumor-free di animali con malattia micrometastatica da tumore wild-type. La presenza di cellule Treg CD4+CD25+foxp3+ nel tessuto di tumori TS/A ci ha suggerito che queste cellule possano limitare l'effetto del vaccino.

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

1) Intendiamo ampliare gli studi sull'IL-21 o per sulla citochina strutturalmente correlata IL-15, come molecole anti-tumorali mediante lo sviluppo di tecnologie di gene transfer diretto in vivo di DNA plasmidico codificante per IL-21, o mediante l'utilizzo di citochine ricombinanti. Verranno anche studiati i meccanismi d'azione di questi approcci e la combinazione con deplezione di cellule Treg.

2) Inoltre, poiché l'efficacia del trattamento con cellule TS/A trasdotte con IL-21 associate ad anticorpi anti-CD25 decresce progressivamente negli animali in rapporto al momento di induzione delle micrometastasi, abbiamo ipotizzato un ruolo di altri meccanismi di immunosoppressione Treg indipendenti, nelle fasi tardive di sviluppo del tumore TS/A. Attualmente stiamo studiando questi meccanismi di immunosoppressione "tardiva" legati a fattori prodotti direttamente dal tumore (prostaglandine e VEGF prodotti da TS/A). Inoltre il tumore TS/A recluta cellule mieloidi esprimenti arginasi che infiltrano il tumore mediante meccanismi che sono oggetto di studio. Infine intendiamo

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

valutare differenti approcci farmacologici per superare l'immunosoppressione ed aumentare l'efficacia dell'immunoterapia di tumori più avanzati.

3) Stiamo estendendo lo studio dell'attività dell'IL-21 ad altri modelli di tumori trapiantabili come il glioblastoma (in collaborazione con la struttura Trasferimento Genico), il melanoma e il neuroblastoma. Intendiamo valutare anche la possibile efficacia di IL-21 e IL-12 in modelli di topi transgenici per l'oncogene Her-2/neu, che sviluppano tumori spontanei mammari (in collaborazione con l'Università di Bologna).

4) Dall'insieme di questi dati speriamo di ricavare utili indicazioni per sviluppare nuovi protocolli di immunoterapia del melanoma basati sulla combinazione di farmaci in grado di superare l'immunosoppressione, vaccini cellulari autologhi e citochine, in collaborazione con l'Oncologia Medica A, l'Immunologia e la Banca Biologica e Cell Factory dell'IST.

### *Beneficiari:*

Comunità scientifica e Servizio Sanitario Nazionale.

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

Nel corso del triennio abbiamo proseguito gli studi sull'IL-21 e sulla citochina strutturalmente correlata, IL-15, come anti-tumorali, in associazione a molecole in grado di bloccare l'immunosoppressione tumore-associata (Frumento et al., 2006). Nel modello del carcinoma mammario TS/A, la vaccinazione con cellule tumorali trasdotte con IL-21 curava il 20% degli animali portatori di micro-metastasi polmonari. Cellule T regolatorie (Treg) CD4+CD25+Foxp3+ presenti nel tumore TS/A limitavano la risposta immune indotta dal vaccino, che era mediata da CTL CD8+, antigene-specifici, cellule NK e IFN-gamma. Infatti la deplezione di cellule Treg con anticorpi anti-CD25 (Comes et al., 2006) permetteva di curare circa l'80% degli animali. Abbiamo anche dimostrato un'attività di IL-21 in un modello di neuroblastoma, dove un vaccino cellulare secernente IL-21 ha attività terapeutica CTL-dipendente (Croce et al., 2008). Anche in tale neoplasia IFN-gamma potrebbe giocare un ruolo importante, regolando l'espressione di caspasi-8, principale via apoptotica (De Ambrosis et al., 2007).

In collaborazione con la SC Trasferimento Genico abbiamo dimostrato che l'inoculo locale di cellule di glioblastoma trasdotte con IL-21 o di IL-21 in un glioblastoma ortotopico curava la maggioranza degli animali. L'effetto era mediato dalla produzione di anticorpi citotossici (IgG2a e 2b) contro antigeni di glioblastoma ed era abrogato nel topo singenico B-KO, deficitario di anticorpi (Daga et al., 2007). Pertanto IL-21 può indurre risposte anti-tumorali mediate da CTL, cellule NK o anticorpi in differenti tumori (di Carlo et al., 2007).

Abbiamo provato quindi a combinare un vaccino cellulare con la deplezione di cellule Treg nel modello del topo transgenico per l'oncogene Her2Neu (con Università di Bologna). Un vaccino allogenico geneticamente modificato con IL-12 ha inibito lo sviluppo di micrometastasi indotte dall'inoculo iv. di cellule tumorali HER2neu+ (Nanni et al., 2007). L'effetto di tale vaccino veniva potenziato dalla co-somministrazione di anticorpi anti-CD25, dimostrando un ruolo generale delle Treg in differenti modelli animali di tumori trapiantabili o transgenici.

E' proseguito anche lo studio della possibilità di aumentare l'efficacia dei vaccini mediante il blocco funzionale di differenti popolazioni di linfociti Treg indotti dal tumore. In particolare abbiamo osservato effetti di sinergismo con il vaccino utilizzando un anticorpo agonista anti-OX40, che inibisce l'attività di Treg. Inoltre, poiché la terapia basata su anticorpi anti-CD25 combinati a TS/A secernenti IL-21 non è in grado di contrastare metastasi in fase avanzata, abbiamo combinato il vaccino cellulare con i due anticorpi anti-CD40 e anti-CD25. Tale combinazione si è dimostrata attiva anche in stadi tumorali più avanzati (manoscritto in preparazione). Abbiamo anche valutato il possibile ruolo di Arginasi II, che pur essendo espressa da carcinomi polmonari non sembra svolgere un ruolo significativo nell'immunosoppressione mediata da tumore (Rotondo et al., 2008).

Sono stati anche provati sistemi di gene transfer diretto di IL-21 o IL-15 in topi portatori di tumore (in coll. con Univ. di Navarra, Spagna), mediante un sistema idrodinamico. Nonostante che IL-15 induca in vivo il differenziamento di NK-DC (Prieto et al., 2008), abbiamo osservato solo risposte terapeutiche parziali negli animali portatori di tumore. Peraltro, IL-15 è coinvolta anche nel differenziamento di cellule NK con fenotipo regolatorio, suggerendo l'esistenza di possibili feed-back negativi sulla risposta immune (Giuliani et al., 2008).

Al fine di traslare i dati di modelli animali a situazioni cliniche abbiamo valutato il possibile effetto di IL-21 e IL-15 su cellule leucemiche umane di B-CLL, in quanto è stato proposto un loro utilizzo immunoterapico. Abbiamo dimostrato che IL-21 induce apoptosi (De Toter et al., 2008), mentre IL-15 è mitogenica e anti-apoptotica sulle cellule di CLL, in rapporto all'utilizzo di differenti vie di trasduzione del segnale (De Toter et al., 2008). Pertanto, IL-21 è preferibile ad IL-15 nell'immunoterapia delle CLL.

Abbiamo anche collaborato alla stesura di un protocollo clinico di fase I di vaccinazione autologa nel melanoma in collaborazione con l'Oncologia Medica A, l'Immunologia e la Cell Factory dell'IST. Abbiamo redatto le relative SOPs e stiamo inoltre svolgendo "run" di convalida del processo di produzione del vaccino in vista di una visita ispettiva dell'AIFA alla struttura GMP.

### *Elenco pubblicazioni:*

Comes A.-Rosso O.-Orengo A.-Di Carlo E.-Sorrentino C.-Meazza R.-Piazza T.-Valzasina B.-Nanni P.-Colombo M.-Ferrini S.

CD25+ regulatory T cell depletion augments immunotherapy of micrometastases by an IL/21 secreting cellular vaccine.

J. Immunol. 176:1750/1758, 2006

De Ambrosis A.-Casciano I.-Croce M.-Pagnan G.-Radic L.-Banelli B.-Di Vinci A.-Allemanni G.-Tonini G.P.-Ponzoni M.-Romani M.-Ferrini S.

An interferon sensitive response element is involved in constitutive caspase/8 gene expression in neuroblastoma cells.

Int. J. Cancer 120:39/47, 2006

Frumento G.-Piazza T.-Di Carlo E.-Ferrini S.

Targeting tumor related immunosuppression for cancer immunotherapy.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets 6:233/237, 2006

Mortara L.-Castellani P.-Meazza R.-Tosi G.-De Lerma A.-Procopio F.-Comes A.-Zardi L.-Ferrini S.-Accolla R.  
CIITA induced MHC class II expression in mammary adenocarcinoma leads to a Th1 polarization of the tumor microenvironment, tumor rejection, and specific antitumor memory.  
Clin. Cancer Res. 12:3435/3443, 2006

Daga A.-Orengo A.-Gangemi R.-Marubbi D.-Perera M.-Comes A.-Ferrini S.-Corte G.  
Glioma immunotherapy by IL/21 gene modified cell or by recombinant IL/21 involves antibody responses.  
Int. J. Cancer 121:1756/1763, 2007

Nanni P.-Nicoletti G.-Palladini A.-Crocchi S.-Murgo A.-Antognoli A.-Landuzzi L.-Fabbi M.-Ferrini S.-Musiani P.-Iezzi M.-De Giovanni C.-Lollini P.  
Antimetastatic activity of a preventive cancer vaccine.  
Cancer Res. 67:11037/11044, 2007

Arina A.-Murillo O.-Dubrot J.-Azpilikueta A.-Gabari I.-Perez J.-Alfaro C.-Berasain C.-Prieto J.-Ferrini S.-Hervas S.-Melero I.  
Interleukin/15 liver gene transfer increases the number and function of IKDCs and NK cells.  
Gene Ther. 15:473/483, 2008

Ceccarelli J.-Delfino L.-Zappia E.-Castellani P.-Borghi M.-Ferrini S.-Tosetti F.-Rubartelli A.  
The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affects tumor progression and response to prooxidants.  
Int. J. Cancer 123:1770/1778, 2008

Croce M.-Meazza R.-Orengo A.-Fabbi M.-Borghi M.-Ribatti D.-Nico B.-Carlini B.-Pistoia V.-Corrias M.-Ferrini S.  
Immunotherapy of neuroblastoma by an interleukin/21 secreting cell vaccine involves survivin as antigen.  
Cancer Immunol. Immunother. 57:1625/1634, 2008

Giuliani M.-Giron Michel J.-Negrini S.-Vacca P.-Durali D.-Caignard A.-Le Bousse C.-Chouaib S.-Devocelle A.-Bahri R.-Durrbach A.-Taoufik Y.-Ferrini S.-Croce M.-Mingari M.C.-Moretta L.-Azzarone B.  
Generation of a novel regulatory NK cell subset from peripheral blood CD34+ progenitors promoted by membrane bound IL/15.  
PLoS ONE 3:e2241;1/e2241;16, 2008

Rotondo R.-Mastracci L.-Piazza T.-Barisione G.-Fabbi M.-Cassanello M.-Costa R.-Morandi B.-Astigiano S.-Cesario A.-Sormani M.-Ferlazzo G.-Grossi F.-Ratto G.B.-Ferrini S.-Frumento G.  
Arginase 2 is expressed by human lung cancer, but it neither induces immune suppression, nor affects disease progression.  
Int. J. Cancer 123:1108/1116, 2008

### **Sintesi e valutazione di nuovi agenti revertanti la "multidrug resistance" derivati dagli inibitori dei canali del calcio diltiazem e nifedipina**

*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:* Maurizio Viale

*Partecipanti:* Cinzia Aiello

*Durata:* 2007-2008

*Parole chiave:* diltiazem; nifedipina; "multidrug resistance"; attività antitumorale; doxorubicina

*Altre strutture IST:* S.C. Nanobioteconologie (C. Rosano); S.C. Trasferimento Genico (D. De Toterò, P. Castagnola)

*Altri Enti coinvolti:* Dip. di Chimica Organica "A. Mangini", Università di Bologna (D. Spinelli); Dip. di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università Di Bari (M.A. Marigiò)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* MIUR PRIN; Università di Bologna

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

### *Background*

La "multidrug resistance" (MDR) o resistenza pleiotropica è un meccanismo che rende le cellule tumorali resistenti ad una varietà d'agenti antitumorali non chimicamente correlati come le antracicline, gli alcaloidi della vinca, le epipodofillotossine, i taxani, ecc. La MDR classica è causata da una sovra-espressione dei prodotti di uno o più geni membri della "ABC-transporter superfamily", codificanti per molecole di membrana che hanno il compito di far effluire sostanze tossiche (o, nella resistenza pleiotropica, farmaci) dalle cellule in modo ATP-dipendente. Cellule tumorali che sovraesprimono tali molecole rendono impossibile l'accumulo intracellulare d'adeguate concentrazioni di farmaci antitumorali, annullandone l'attività e facendo sì che questo fenomeno di resistenza, intrinseca o acquisita, rimanga uno dei maggiori ostacoli al trattamento dei pazienti oncologici. Ovviamente tale meccanismo ha fatto pensare che inibendo i trasportatori dei farmaci, in particolare la Pgp 170, si potessero superare i fenomeni di resistenza. Molte sostanze chimiche e farmaci sono stati quindi analizzati, ma sebbene attive in vitro e in vivo, la quasi totalità di tali sostanze una volta entrate in sperimentazione clinica hanno mostrato forti limitazioni dovute a tossicità intrinseca e interazioni farmacocinetiche negative con gli antitumorali co-somministrati. Resta quindi un obiettivo primario della ricerca farmaco-oncologica trovare nuove molecole dotate delle opportune caratteristiche farmacodinamiche e farmacocinetiche che possano soddisfare i requisiti richiesti dall'applicazione clinica di questa modalità di trattamento.

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

Il presente progetto si è prefisso come obiettivo la sintesi e l'analisi di alcuni "derivati" calcio-antagonisti di due farmaci cardioprotettori inibitori dei canali del Ca<sup>++</sup> come la nifedipina e il diltiazem, a loro volta in grado di inibire la Pgp 170. Tramite sintesi chimica si è quindi cercato di ottenere da questi cardioprotettori nuove molecole appartenenti ai gruppi chimici degli 8-aril-8-idrossi-8H-[1,4]tiazino[3,4-c][1,2,4]ossadiazol-3-oni e relativi acetali e 1,4-diidropiridine sostituite in C-4 con gruppi imidazo[2,1-b]tiazolici le cui variazioni chimico-strutturali sono state correlate con dati d'inibizione della Pgp 170 ottenuti da saggi MTT su linee con resistenza MDR1 e quindi sottoposti a saggi di conferma citofluorimetrici e biochimici.

L'obiettivo finale è consistito nella selezione di molecole attive da inserire in un protocollo sperimentale in vivo per la valutazione nel topo (progetto futuro) delle loro proprietà di potenziamento dell'attività antitumorale di farmaci bersaglio dei fenomeni MDR.

### *Beneficiari*

Comunità scientifica. A lungo termine Servizio Sanitario Nazionale (pazienti con neoplasie farmaco-resistenti).

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

A conclusione del progetto abbiamo valutato in totale 24 nuove sostanze derivate dal diltiazem e dalla nifedipina. Analizzate su cellule con resistenza pleiotropica A2780/DX3, soltanto sei hanno dimostrato di possedere un'attività potenziante l'attività antiproliferativa della doxorubicina (Dox) significativamente maggiore del 25%, come calcolato dalla riduzione del parametro IC<sub>50</sub> ed utilizzando concentrazioni prive o quasi d'attività antiproliferativa propria. Sulla base poi della valutazione dell'inibizione dell'attività della pompa di membrana Pgp170 eseguita al citofluorimetro e al microscopio a fluorescenza, delle 6 molecole iniziali una è stata esclusa non essendo in grado di incrementare l'accumulo di Dox intracellulare. Per le tre molecole risultate più attive, due derivate dalla nifedipina ed una derivata dal diltiazem abbiamo valutato il potenziamento dell'attività apoptotica legata all'esposizione alla Dox. Tutte e tre le molecole sono state in grado di determinare un potenziamento dell'apoptosi, come valutato dal saggio con Annessina V e ioduro di propidio, ed una sovra-espressione di alcuni marcatori molecolari legati all'apoptosi come la p53, la p21 ed il bax, mentre il bcl-2 veniva sotto-espresso. Analogamente venivano sovra-espressi gli effettori dell'apoptosi caspasi, a confermare ulteriormente il potenziamento di quest'importante modalità di morte cellulare.

Parallelamente mediante analisi "docking" è stato possibile valutare l'interazione del derivato più attivo del diltiazem e dei due derivati attivi della nifedipina con la Pgp 170 utilizzando un modello proteico tridimensionale derivato dalla sequenza aminoacidica di un frammento della Pgp 170. Nel primo caso si è osservato che l'interazione fra derivato del diltiazem e Pgp 170 avviene nel sito d'interazione Pgp 170-farmaco (inibizione competitiva) e poteva avvenire solo quando il derivato del diltiazem era in una determinata conformazione spaziale dalla quale dipendeva poi l'attività inibitoria nel suo complesso. Inoltre si è dedotto che un piccolo allungamento della catena laterale carbonilica poteva far generare un aumento significativo della stessa attività inibitoria. Ciò ha portato al disegno ed alla sintesi di un nuovo derivato (al momento in fase terminale di sintesi) che sarà valutato e verificato nel prossimo futuro. Per quanto riguarda i due derivati del diltiazem si è osservato che l'interazione con la Pgp 170 sembra avvenire in un sito diverso dal precedente, probabilmente deputato all'interazione della Pgp 170 con l'ATP. Ciò ha indotto a supporre un meccanismo d'inibizione non competitiva per queste molecole che sarà comunque verificato ulteriormente. Tutti questi dati saranno oggetto di un manoscritto al momento in fase di preparazione (C. Rosano et al.).

Nell'insieme, come previsto dal progetto, i risultati e i dati raccolti hanno permesso di selezionare un numero ridotto di molecole attive nell'inibizione della Pgp 170 e di stabilire un primo livello di meccanismo d'azione. E' nostra intenzione continuare nello studio da un lato verificando la nuova molecola disegnata sulla base dei dati di "docking" (ed eventualmente altre) e dall'altro iniziare la verifica in vivo in modelli murini di topi immunodepressi dell'attività delle sostanze selezionate in questo progetto di ricerca.

### *Elenco pubblicazioni:*

Viale M. et al.

Inhibition of MDR1 activity *in vitro* by a novel class of diltiazem analogues: towards new candidates.

J. Med. Chem., in press

Viale M. et al.

Studies *in vitro* of inhibition of MDR1 activity and induction of apoptosis by novel analogues of diltiazem and nifedipine.

J. Med. Chem., submitted

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

**Studi farmacodinamici e molecolari per valutare l'applicabilità terapeutica di nuove associazioni mirate al potenziamento dell'indice terapeutico del cisplatino e di nuove molecole ad attività antitumorale derivate dal 2,3-dinitrobutadiene**

*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:* Maurizio Viale

*Partecipanti:* Cinzia Aiello

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* procainamide; procaina; tossicità; indice terapeutico; nanoparticelle; derivati dinitrobutadienici; attività antitumorale

*Altre strutture IST:* S.C. Trasferimento Genico (D. De Toterò, P. Castagnola); Animal Facility (E. Ognio)

*Altri Enti coinvolti:* Dip. di Chimica Organica "A. Mangini", Università di Bologna (D. Spinelli); Dip. di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Bari (M.A. Marigiò); Dip. di Biologia Animale, Università di Pavia (C. Fenoglio)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* MIUR PRIN; Università di Bologna; Università di Genova

### *Background*

Il miglioramento delle strategie terapeutiche oncologiche ha bisogno sia di un continuo aggiornamento degli schemi terapeutici e di miglioramenti delle formulazioni di farmaci già nell'uso clinico, sia di nuove molecole ad attività antitumorale possibilmente caratterizzate da meccanismi d'azione nuovi, selettività, buon indice terapeutico e capacità di superare i fenomeni di resistenza. Il cisplatino (DDP) è uno dei più efficaci ed ampiamente utilizzati fra gli antitumorali classici ma è caratterizzato da un'elevata nefrotossicità, neurotossicità e ototossicità. Queste tossicità per molti pazienti rappresentano tossicità dose-limitanti che spesso impediscono il proseguimento della terapia. In precedenti studi avevamo dimostrato che alcuni farmaci non antitumorali come la procainamide (Pd), la procaina e l'acido para-aminobenzoico erano in grado di aumentare l'indice terapeutico del DDP grazie all'azione combinata del potenziamento della sua attività antitumorale e la riduzione dei suoi effetti tossici. Inoltre, l'attività potenziante di queste molecole sembrava essere legata sia a meccanismi di tipo più propriamente farmacocinetico che a meccanismi farmacodinamici. Questi dati insieme alle osservazioni riguardanti un nuovo derivato del 2,3-dinitrobutadiene dotato d'interessanti attività citotossiche in vitro ci ha indotto a disegnare il progetto di ricerca descritto in questo consuntivo RC 2006-2008.

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

Il primo obiettivo del progetto è stato quindi di raccogliere dati preclinici in vitro ed in vivo sulla protezione dai principali effetti tossici del DDP e sui meccanismi attraverso cui i fenomeni di potenziamento si realizzano, con l'obiettivo di mettere a punto un protocollo di associazione fra DDP e Pd (e/o procaina) che sia in grado di ridurre i fenomeni tossici del farmaco antitumorale e possa essere applicato in sicurezza nell'uomo. Parallelamente, sono state valutate nuove formulazioni del DDP realizzate attraverso procedure nanotecnologiche, con l'obiettivo di modificare il suo indice terapeutico mediante variazioni delle sue caratteristiche farmacocinetiche e/o farmacodinamiche.

Il secondo obiettivo è stato rivolto al miglioramento della chemioterapia antitumorale attraverso il tentativo di ampliare lo spettro delle molecole disponibili con meccanismi d'azione nuovi, selettività e superamento delle barriere di resistenza. Ci siamo quindi focalizzati su alcuni derivati del 2,3-dinitro-1,3-butadiene dotati della capacità d'inibire la proliferazione cellulare, indurre apoptosi tramite l'attivazione della p53 e inibire la crescita tumorale in vivo, iniziando a definirne il meccanismo d'azione.

### *Beneficiari*

Comunità scientifica. A medio e lungo termine Servizio Sanitario Nazionale.

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

Per il primo obiettivo i risultati indicano che la co-somministrazione di Pd e DDP causa un aumento dell'attività del farmaco antitumorale legato alla sua attività apoptotica in vitro e in vivo. Per contro non siamo riusciti a dimostrare nessun significativo coinvolgimento in questo processo di marcatori come la p53, la p21 e c-jun. L'analisi mediante plasmidi trattati con DDP e Pd ed enzimi di restrizione ha indicato che in presenza di Pd la specificità di legame del DDP sembra in parte cambiare, a conferma dell'ipotesi di formazione di un nuovo derivato attivo diverso dal DDP. Sulla base del fatto poi che il DDP viene spesso associato in polichemioterapie con doxorubicina (Dox) abbiamo valutato l'effetto della co-somministrazione della Pd con questo inibitore delle topoisomerasi. Abbiamo osservato il potenziamento dell'attività antiproliferativa e apoptotica della Dox su cellule con resistenza pleiotropica MDR1 A2780/DX3 dopo pre-trattamento con Pd per 1-5 giorni. Tale potenziamento sembra solo parzialmente legato alla minore espressione della Pgp-170 di membrana, al di là dell'ipotesi iniziale legata all'attività demetilante della Pd che poteva influire sull'espressione del trasportatore di membrana. In uno studio farmacocinetico nel topo abbiamo poi

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

verificato gli effetti della Pd sulla farmacocinetica plasmatica e cardiaca della Dox, in modo da escludere eventuali aumenti della cardiotoxicità legati ad un maggior accumulo di Dox nel tessuto cardiaco. I risultati hanno indicato che la Pd da un lato non causa accumulo tossico di Dox nel cuore dall'altro causa un aumento farmacologicamente significativo della sua AUC plasmatica (+22%). Questi dati sono stati essenziali per dare l'avvio al co-trattamento con Pd in vivo. L'applicabilità del trattamento con Pd, DDP e Dox dopo exeresi chirurgica nel cane da compagnia affetto da osteosarcoma è tuttora in atto e si spera di poterlo chiudere entro un'anno. Inoltre, abbiamo dimostrato che il co-trattamento con Pd in topine gravide protegge i feti dall'embriotossicità del DDP ciò a conferma dell'effetto protettivo della Pd e della validità dell'ipotesi di somministrazione nei casi di chemioterapia durante la gravidanza. Infine, lo studio di nanoparticelle di chitosano contenenti DDP complessato con alginati e ialuronati ha messo a punto la sintesi di alcuni prodotti che hanno dimostrato in vitro significative attività antiproliferative e apoptotiche ed in vivo buona attività antitumorale con effetti tossici poco significativi. Per quanto riguarda il filone di ricerca riguardante i composti nitrobutadienici, dalla sintesi di una serie di molecole derivate dal 2,3-dinitrobutadiene è emerso che alcune di queste e cioè 1-Naph-DNB, 1-Naph-NMCB e 2-Naph-DNB sono dotate di significative proprietà antiproliferative ed antitumorali. Dal punto di vista istologico queste molecole, ma soprattutto 1-Naph-NMCB, hanno dimostrato una ridotta capacità di indurre rilevanti alterazioni strutturali dei tessuti. L'attività antitumorale in vivo, valutata in modelli murini sc ha dimostrato che l'introduzione di una funzionalità insatura associata ad una strategia di "semplificazione molecolare" permette a 1-Naph-NMCB una migliore attività antitumorale rispetto a 1-Naph-DNB, con minore tossicità, mentre il 2-Naph-DNB ha dimostrato un'attività minore rispetto alle altre due molecole. A questo proposito va però ricordato che mentre le molecole di 1-Naph-DNB e 1-Naph-NMCB non hanno mostrato fenomeni di cross-resistenza in vitro verso farmaci come il DDP, la Dox, il taxolo (Tax) e il 5-fluorouracile, il 2-Naph-DNB è stato caratterizzato da una significativa cross-resistenza nei confronti del Tax sulla linea A549/T12, il cui meccanismo di resistenza risiede in una mutazione del sito di interazione del Tax con i microtubuli. Studi d'immunofluorescenza su cellule A549-T12 dimostranti la formazione di "bundles" hanno permesso di postulare per 2-Naph-DNB un nuovo meccanismo d'azione che coinvolgerebbe il legame a siti sui microtubuli cellulari. Nell'insieme questi dati hanno permesso di considerare il 2-Naph-DNB come un possibile "lead compound" per la sintesi di nuove molecole con meccanismo simile a quello del taxolo. L'analisi degli specifici siti di taglio d'enzimi di restrizione dopo incubazione con i naftilnitrobutadieni ci ha permesso di discriminare "pattern" differenti di legame fra questi e i nucleotidi; insieme allo stop dell'amplificazione della beta-globina mediante PCR, questo conferma il loro legame al DNA (Mariggio et al., manoscritto in preparazione). Infine, l'analisi della metilazione del DNA in zone ricche di CpG mediante l'enzima di restrizione HpaII sensibile alla metilazione ha suggerito processi d'amplificazione nelle regioni promotrici di PDGR, MDM2 e SMAR mentre nessuna amplificazione è stata osservata nelle stesse regioni di p53 e p73. Ciò apre nuove prospettive di ricerca sull'induzione di apoptosi da parte di queste molecole.

### *Elenco pubblicazioni:*

Ognio E.-Chiavarina B.-Peterka M.-Mariggio' M.-Viale M.

Study of feasibility of the treatment with procainamide hydrochloride and cisplatin in pregnant mice.  
Chem. Biol. Interact. 164:232/240, 2006

Viale M.-Fenoglio C.-Mariggio' M.A.-Spinelli D.-Aiello C.-Petrillo G.

Evaluation of antitumour activity in vivo of two nitrobutadiene derivatives.  
XLVIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Cancerologia, Bari, 2006

Cafaggi S.-Russo E.-Stefani R.-Leardi R.-Caviglioli G.-Parodi Br.-Bignardi G.-De Totero D.-Aiello C.-Viale M.

Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N/trimethyl chitosan and a cisplatin/alginate complex.  
J. Control. Release 121:110/123, 2007

Petrillo G.-Fenoglio C.-Ognio E.-Aiello C.-Spinelli D.-Mariggio' M.-Maccagno M.-Morganti S.-Cordazzo C.-Viale M.

Naphthylnitrobutadienes as pharmacologically active molecules: evaluation of the in vivo antitumour activity.  
Invest. New Drugs 25:535/544, 2007

Viale M.-Petrillo G.-Aiello C.-Fenoglio C.-Cordazzo C.-Mariggio'm.-Cassano A.-Prevosto C.-Ognio E.-Maccagno M.-Bianchi L.-Vaccarone R.-Rizzato E.-Spinelli D.

Synthesis, in vitro activity and in vivo toxicity of the new 2,3-dinitrobutadiene derivative (1E,3E)-1,4-bis(2-naphthyl)-2,3-dinitro-1,3-butadiene.  
Pharmacol. Res. 56:318/328, 2007

Fenoglio C.-Grosso A.-Petrillo G.-Boncompagni E.-Aiello C.-Cordazzo C.-Spinelli D.-Ognio E.-Mariggio' M.-Cassano A.-Viale M.

A histochemical approach to the evaluation of the in vivo cytotoxicity of the nitrobutadienes (1E,3E)/1,4-bis(1/naphthyl)/2,3/dinitro/1,3/butadiene and methyl (2Z,4E)/2/methylsulfanyl/5/(1/naphthyl)/4/nitro/2,4/pentadienoate in mice liver and kidney.  
Anticancer Res. 28:813/823, 2008

Petrillo G.-Mariggio' M.-Aiello C.-Cordazzo C.-Fenoglio C.-Morganti S.-Croce M.-Rizzato E.-Spinelli D.-Maccagno M.-Bianchi L.-Prevosto C.-Tavani C.-Viale M.

Design, synthesis, and in vitro evaluation of new naphthylnitrobutadienes with potential antiproliferative activity: toward a structure/activity correlation.  
Bioorg. Med. Chem. 16:240/247, 2008

Viale M.-Petrillo G.-Maccagno M.-Castagnola P.-Aiello C.-Cordazzo C.-Mariggio' M.-Jadhav S.-Bianchi L.-Leto G.-Rizzato E.-Poggi A.-Spinelli D.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

Sensitivity of different resistant tumour cell lines to the two novel compounds (2Z,4E)/2/methylsulfanyl/5/(1/naphthyl)/4/nitro/2,4 /pentadienoate and (1E,3E)/1,4/bis(2/naphthyl)/2,3/dinitro/1,3/buta diene.  
Eur. J. Pharmacol. 588:47/51, 2008

Alama A.-Viale M.-Cilli M.-Bruzzo C.-Novelli F.-Tasso B.-Sparatore F.  
In vitro cytotoxic activity of tri-n-butyltin(IV) lupinylsulfide hydrogen fumarate (IST-FS 35) and preliminary antitumor activity in vivo.  
Invest. New Drug, in press

Cafaggi S.-Russo E.-Stefani R.-Parodi B.-Caviglioli G.-Bignardi G.-Aiello C.-Viale M.  
Antitumour activity of cisplatin delivered by a nanoparticulate system based on hyaluronate and trimethyl chitosan.  
Biomaterials, submitted

### *Presentazione a convegni:*

Cafaggi S.-Russo E.-Stefani R.-Caviglioli G.-Parodi B.-Viale M.-Bignardi G.  
Preparation and evaluation of N-trimethylchitosan/alginate nanoparticles containing cisplatin complexed with alginate.  
XX Simposio A.D.R.I.T.E.L.F., Catania, 2006

Viale M.-Fenoglio C.-Marigiò M.A.-Spinelli D.-Aiello C.-Petrillo G.  
Evaluation of antitumour activity in vivo of two nitrobutadiene derivatives.  
XLVIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Cancerologia, Bari, 1-4 Ottobre 2006

Russo E.-Stefani R.-Cafaggi S.-Caviglioli G.-Parodi B.-Bignardi G.-Viale M.-Cordazzo C.  
A new carrier for cisplatin: nanoparticles deriving from the interaction between N-trimethyl glycol chitosan and poly-L-glutamate.  
Innovation in Drug Delivery from Biomaterials to Devices, A.D.R.I.T.E.L.F., Napoli, 30 settembre – 3 ottobre 2007

Russo E.-Stefani R.-Parodi B.-Caviglioli G.-Aiello C.-Viale M.-Cafaggi S.-Bignardi G.  
Cisplatin delivery: a study on a cisplatin/hyaluronate complex and nanoparticles formed by its interaction with N-trimethyl chitosan.  
6<sup>th</sup> World meeting on pharmaceuticals, biopharmaceutics and pharmaceutical technology, Barcellona, Spagna, 7-10 Aprile 2008

### *Capitoli di Libro:*

Bianchi L.-Maccagno M.-Petrillo G.-Rizzato E.-Sancassan F.-Severi E.-Spinelli D.-Tavani C.-Viale M.  
Versatile nitrobutadienic building-blocks from the ring opening of 2- and 3-nitrothiophenes.  
In Targets in heterocyclic systems - Chemistry and Properties. Eds. O. A. Attanasi, D. Spinelli.  
Società Chimica Italiana, Roma, Vol. 11, 2007