

S.S. Biopolimeri e Proteomica

Sviluppo di metodi per l'analisi multi-risoluzione e definizione di modelli strutturali/funzionali di proteine coinvolte nell'interazione cellula-matrice extracellulare, nella coagulazione del sangue, nelle metastasi tumorali e nell'angiogenesi

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: a – Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

Responsabile scientifico: Mattia Rocco

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Aldo Profumo

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: angiogenesi; struttura delle proteine; modelli idrodinamici; integrine; fibrinogeno; SAXS (small-angle x-ray scattering)

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Nanobiotechnologie (C. Rosano)

Altri Enti coinvolti: University of Glasgow, UK (O. Byron); University of Nottingham, UK (S. Harding); EMBL-Hamburg, DE (M. Roessle); The Burham Institute, La Jolla, CA, USA (N. Volkmann); University of Texas, San Antonio, TX, USA (B. Demeler)

Tipologia progetto: tecnologie abilitanti

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Background

L'interazione cellula-matrice extracellulare ha un ruolo fondamentale in molti processi fisiologici ed associate patologie, tra cui l'invasione e la migrazione di cellule tumorali metastatizzanti e l'angiogenesi. Tra le proteine coinvolte nell'interazione cellula-matrice extracellulare e nell'angiogenesi ci sono fibrinogeno/fibrina e le integrine alfaIIb-beta3 (GPIIb-IIIa) e alfav-beta3. Di queste proteine non sono disponibili strutture ad alta risoluzione dell'intera molecola, ma solo di moduli o domini anche estesi, a volte provenienti da varie molecole omologhe. Questa mancanza impedisce una comprensione più approfondita dei meccanismi che regolano le interazioni tra recettori cellulari e proteine della matrice, un aspetto fondamentale per esempio per poter sviluppare farmaci selettivi.

In precedenti progetti abbiamo cominciato a costruire modelli di queste proteine attraverso l'uso congiunto di tecniche ad alta e bassa risoluzione, utilizzando anche una serie di programmi al computer da noi sviluppati. In particolare, le proprietà idrodinamiche e conformazionali in soluzione delle proteine misurate tramite tecniche di diffusione della luce, di velocità di sedimentazione all'ultracentrifuga analitica (AUC) e di viscosimetria, possono essere confrontate con quelle calcolate a partire da modelli ad alta risoluzione utilizzando il programma SOMO (Rai et al., Structure, 13, 723-734, 2005) ed il sistema BEAMS (Spotorno et al., Eur. Biophys. J. 25, 373-384, 1997). Il programma SOMO (SOLUTION MODeller) genera modelli a media risoluzione di proteine a partire dalla loro struttura tridimensionale, mentre BEAMS calcola i parametri dei modelli. I vari modelli vengono generati a partire da strutture tridimensionali ad alta risoluzione adattate in mappe a minor risoluzione derivate da microscopia elettronica o small-angle X-ray scattering (SAXS). Più recentemente, questi programmi sono stati ricodificati all'interno di un pacchetto software per l'analisi di dati di AUC molto utilizzato, UltraS can (US), grazie ad una nuova collaborazione con il Prof. B. Demeler dell'University of Texas at San Antonio, USA. Una versione di base di SOMO (US-SOMO) è già perfettamente funzionale ed operante attraverso una sofisticata graphical user interface (GUI), e nuovi sviluppi sono previsti a breve anche all'interno di questo progetto.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

- Sviluppare e rifinire modelli del fibrinogeno e delle integrine alfa-v beta3 e alfa-IIb beta3, in modo che i parametri calcolati per ciascun modello siano il più possibile in accordo con i dati sperimentali. I modelli ottenuti per le singole proteine saranno poi impiegati per lo studio delle loro interazioni, applicando la stessa metodologia, con l'obiettivo di definire un modello del complesso e dei cambi conformazionali necessari a formarlo. Questi modelli saranno di utilità per lo sviluppo di farmaci mirati a modulare od impedire le interazioni tra queste proteine in diversi scenari biologici, quali la coagulazione del sangue e l'angiogenesi.

- Sviluppare ulteriormente il programma US-SOMO in modo da renderlo in grado di calcolare i parametri idrodinamici e conformazionali di proteine anche per strutture che presentano regioni di flessibilità, spesso molto importanti dal punto di vista funzionale, e che non sono al momento trattabili con accuratezza. Inoltre, nel programma verrà incluso un nuovo modulo in grado di simulare i dati di SAXS a partire da una struttura tridimensionale, e di variarne la conformazione fino a raggiungere un buon accordo con i dati sperimentali. La tecnica SAXS è sempre più utilizzata per studiare complessi tra proteine e proteine/DNA, ed il nuovo modulo aumenterebbe decisamente le capacità di US-SOMO.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Non si prevede un impatto assistenziale a breve termine.

Programmazione 2009-2011

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Le attività saranno divise in tre linee:

- 1) Sviluppo del programma US-SOMO, in diretta collaborazione con il gruppo del Prof. B. Demeler dell'University of Texas at San Antonio (USA) ed in parziale collaborazione con la Dr.ssa O. Byron della Glasgow University (UK). Alla fine del progetto, ci aspettiamo di avere completato questo programma in modo da permettere il calcolo di parametri idrodinamici e strutturali in soluzione di macromolecole biologiche a partire dalla struttura tridimensionale, tenendo conto di eventuali regioni di flessibilità. Questo sarà di grande aiuto sia nel completamento di modelli strutturali di proteine multi-dominio o modulari, utilizzando tecniche multi-risoluzione, che nello studio di complessi proteina-proteina e proteina-acidi nucleici.
- 2) Acquisizione di nuovi dati sperimentali di SAXS, di AUC, ed eventualmente di viscosità intrinseca se sarà possibile acquistare uno strumento dedicato, su fibrinogeno altamente purificato, sull'integrina piastrinica $\alpha\text{IIb}\beta_3$, e possibilmente su complessi formati dalle due macromolecole in soluzione. Queste misure verranno eseguite in collaborazione con la Dr.ssa Byron, con il gruppo del Prof. S. Harding della Nottingham University, e con il laboratorio EMBL di Amburgo (Dr. M. Roessle) che gestisce una delle linee di SAXS al sincrotrone DESY. E' in fase di definizione una collaborazione con il Prof. P. Vachette dell'Université Paris-Sud (FR) per l'acquisizione di dati dei SAXS presso il sincrotrone SOLEIL (Parigi, FR), utilizzando strumentazioni all'avanguardia come un HPLC collegato direttamente con la cella di misura.
- 3) Miglioramento dei modelli di fibrinogeno e di $\alpha\text{IIb}\beta_3$ da noi sviluppati, sia sulla base dei nuovi dati che acquisiremo, sia su nuovi dati di letteratura. Possibile sviluppo di un modello del complesso fibrinogeno-integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, di grande interesse per lo studio della trombosi/emostasi, dell'angiogenesi e dell'interazione cellula-matrice extracellulare data l'alta omologia di $\alpha\text{IIb}\beta_3$ con $\alpha\text{v}\beta_3$.

Per il primo anno, si prevede di lavorare principalmente alle linee 1 e 3, e parzialmente alla 2.

In dettaglio, stiamo cominciando ad implementare in US-SOMO il modulo per il calcolo del SAXS a partire da strutture atomiche, una prima versione del quale dovrebbe essere disponibile entro dicembre 2009. Questa versione conterrà un metodo innovativo per calcolare il contributo del solvente alla diffusione dei raggi X a piccolo angolo, ed un modulo per calcolare le curve di SAXS anche a partire da modelli a più bassa risoluzione. Questo consentirà di esplorare rapidamente un gran numero di conformazioni sia nel caso di proteine con regioni flessibili, che nella formazione di complessi. Si comincerà anche ad implementare il modulo per il calcolo dei parametri idrodinamici utilizzando la dinamica Browniana.

Riguardo ai modelli di fibrinogeno ed integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, in stretta collaborazione con C. Rosano (Nanobiotecnologie IST) stiamo attivamente rifinando nuovi modelli di quest'ultima, basandoci su recentissimi dati di letteratura applicati al modello che abbiamo pubblicato nel 2008 (Rocco M. et al., *Structure*, 16:954-964, 2008). Questi nuovi dati riguardano la struttura cristallografica del dominio extracellulare completo di $\alpha\text{IIb}\beta_3$, ed un modello sperimentale NMR delle due eliche transmembrana. I nostri nuovi modelli comprendono l'integrina "a riposo" e quella parzialmente attivata, e verranno depositati nella banca dati PMDB (Protein Model Data Base, <http://mi.caspar.it/PMDB/help.php>). Contiamo di sottoporre una pubblicazione entro agosto 2009. Anche per il fibrinogeno siamo attivamente lavorando a rifinire un modello basato sui dati sperimentali raccolti nel precedente progetto triennale (pubblicazione in fase di sottomissione), in collaborazione con N. Volkmann (Burnham Institute, CA, USA) e M. Roessle (EMBL-Hamburg, DE). Abbiamo praticamente definito la struttura del corpo base (frammento X), che si presenta notevolmente più piegata di quanto appare anche nella nuova struttura cristallografica del fibrinogeno umano recentemente pubblicata (2009). Contiamo di sottoporre una pubblicazione con questo nuovo modello entro dicembre 2009.

Infine, presenteremo domanda per tempo macchina al sincrotrone SOLEIL (FR) per misure da eseguirsi sul fibrinogeno (e possibilmente sull'integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$) nel 2010. Queste misure verranno integrate con nuove misure all'AUC in collaborazione con il Prof. S. Harding (Nottingham University, UK).

Track record

Hantgan R.-Stahle M.C.-Connor J.H.-Horita D.A.-Rocco M.-McLane M.A.-Yakovlev S.-Medved L.
Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ligand interactions are linked to binding-site remodeling.
Protein Sci. 15: 1893/1906, 2006

Rocco M.-Rosano C.-Weisel J.W.-Horita D.A.-Hantgan R.R.
Integrin conformational regulation: uncoupling extension/tail separation from changes in the head region by a multi-resolution approach.
Structure 16:954/964, 2008

Brookes E.-Demeler B.-Rosano C.-Rocco M.
The implementation of SOMO (SOLUTION MOdeller) in the UltraScan analytical ultracentrifugation data analysis suite: enhanced capabilities allow the reliable hydrodynamic modeling of virtually any kind of biomacromolecule.
Eur. Biophys. J. Biophys. Lett., in press

Cölfen H.-Laue T.N.-Wohlleben W.-Schilling K.-Karabudak E.-Langhorst B.W.-Brookes E.-Dubbs B.-Zollars D.-Rocco M.-Demeler B.
The Open AUC Project.
Eur. Biophys. J. Biophys. Lett., in press

Programmazione 2009-2011

Studi di proteomica per l'identificazione di profili di rischio individuale nel paziente neoplastico e preneoplastico

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

Programma: a - Definizione del profilo di rischio individuale in pazienti con neoplasia in fase iniziale o avanzata

Responsabile scientifico: Aldo Profumo

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Mattia Rocco, Anna Aprile

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: melanoma uveale; mastopatia fibrocistica a grosse cisti, cromatografia multidimensionale, spettrometria di massa, stress ossidativo

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Chirurgia Toracica (C. Mosci); S.C. Oncologia Medica B (F. Boccardo); S.S. Genomica Funzionale (U. Pfeffer, G. Angelini); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini, P. Romano)

Altri Enti coinvolti: DIMES, Università di Genova (G. Damonte); S.S.D. Microcitemia, Ospedali Galliera, Genova (G.L. Forni); S.C. Oncologia Medica, Ospedali Galliera, Genova (A. Decensi)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica sperimentale

Area di interesse: prevenzione primaria/secondaria

Soggetti cofinanziatori: E' stata presentata domanda di finanziamento nel 2009 al Ministero della Salute – Bando malattie rare (melanoma uveale) in attesa di risposta.

Background

Una delle sfide più stimolanti nel campo della ricerca oncologica è l'identificazione di marcatori biologici in grado di evidenziare, il più precocemente possibile, l'alterazione della condizione normale della cellula. Particolarmente intrigante risulta, tuttavia, anche la possibilità di disporre di uno strumento in grado di stabilire in anticipo se un paziente affetto da una particolare condizione morbosa corra o meno il rischio di andare incontro ad una progressione della malattia.

E' in quest'ottica che si inquadra la necessità di disporre di tecnologie in grado di valutare, in maniera rapida e precisa, la complessa componente proteica di un organismo. Lo sviluppo e l'affinamento delle tecniche di spettrometria di massa ha reso possibile l'identificazione di una proteina ignota attraverso la determinazione della massa esatta dei peptidi che la costituiscono. Questa operazione, che prende il nome di peptide mass fingerprinting (PMF), prevede la digestione con tripsina della proteina da identificare ed il successivo confronto tra le masse dei frammenti triptici ottenuti con quelle dei frammenti ottenibili dalla teorica digestione delle proteine la cui sequenza è contenuta in una banca dati. Per garantire una attendibile analisi spettrometrica di massa di una proteina è di importanza fondamentale una riduzione della complessità del campione quanto più efficace possibile. A tale scopo, risulta essere particolarmente utile la cromatografia multidimensionale, costituita da due, o più, separazioni cromatografiche successive (solitamente viene realizzata una prima separazione con un meccanismo a scambio ionico seguita da una seconda separazione secondo modalità a fase inversa). Questo tipo di approccio verrà impiegato in uno studio, condotto in collaborazione con la Dr.ssa Tosetti (S.C. Biologia Cellulare, IST) e i Dr. Forni e Decensi (Ospedali Galliera di Genova), nel corso del quale, accanto al dosaggio di biomarcatori di elezione dello stress ossidativo quali malondialdeide (MDA), formaldeide (FA) e isoprostani, si mirerà all'individuazione qualitativa di derivati proteici ottenuti in seguito a stress ossidativo e alla misura quantitativa di proteine direttamente o indirettamente coinvolte nella generazione di ROS e nell'oncogenesi. Un altro studio, realizzato questa volta in collaborazione con la S.S. Genomica Funzionale e con la S.C. Chirurgia Toracica dell'IST, utilizzerà la tecnologia della 2D-HPLC/MS nell'identificazione di nuovi marcatori proteici associati alla progressione del melanoma uveale. In questo ambito l'attenzione della nostra struttura sarà rivolta anche all'analisi comparativa MALDI/TOF del peptidoma del siero/plasma ottenuto da pazienti affetti da melanoma uveale metastatico e non-metastatico. Il nostro gruppo ha inoltre da tempo realizzato una collaborazione con la S.C. Oncologia Medica B dell'IST, diretta dal Prof. Boccardo, nel corso della quale è stato messo a punto un valido protocollo per l'analisi del profilo peptidomico del siero di pazienti afferenti al nostro centro a seguito dell'insorgenza di una mastopatia fibrocistica a grosse cisti. Lo studio, che si avvale della disponibilità del materiale biologico raccolto nel corso di molti anni di attività del centro, ha come obiettivo la valutazione, mediante l'analisi dell'insieme dei peptidi presenti nel siero, del rischio di sviluppo del carcinoma mammario nelle pazienti portatrici di questa patologia mammaria relativamente comune.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Presso la S.S. Biopolimeri e Proteomica sono disponibili un cromatografo bidimensionale (2D HPLC) ed uno spettrometro di massa a tempo di volo (TOF) dotato di due sorgenti alternative: ESI e AP-MALDI. La disponibilità di tale strumentazione è fondamentale per un'efficace caratterizzazione dei peptidi e delle molecole proteiche. La nostra struttura ha da tempo instaurato una rete di collaborazioni con i servizi clinici e diagnostici dell'Istituto con l'obiettivo di avere accesso al materiale biologico proveniente dai pazienti afferenti. Questa interazione ci consentirà di lavorare all'identificazione di molecole potenzialmente rilevanti in campo oncologico sia dal punto di vista diagnostico, che per l'impostazione dei protocolli terapeutici. Vista la notevole competizione presente in campo proteomico nell'utilizzo della

Programmazione 2009-2011

2D gel elettroforesi per l'individuazione di nuovi marcatori biologici, è stata valutata l'opportunità di affrontare il problema mediante una tecnologia alternativa relativamente recente: la multidimensional HPLC-MS.

Un'altro degli obiettivi principali dell'attività della nostra struttura è la messa a punto di uno strumento in grado di evidenziare eventuali differenze presenti nel profilo peptidomico MALDI/TOF tra gruppi di pazienti affetti da patologia neoplastica. Tali dati potrebbero da un lato dare indicazioni sulla tendenza alla progressione neoplastica in pazienti affetti da neoplasia in fase iniziale e dall'altro predire la loro risposta ai possibili trattamenti. La nostra struttura ha inoltre accesso all'utilizzo (in uso condiviso con la S.S. Genomica Funzionale diretta dal Dott. U. Pfeffer) di una stazione robotizzata per la manipolazione dei liquidi. Questo strumento, che rende possibile la preparazione automatizzata dei campioni da sottoporre ad analisi, dovrebbe consentire il raggiungimento di numeri statisticamente significativi in tempi relativamente brevi. I dati ottenuti saranno quindi confrontati con i dati eventualmente presenti in letteratura o, dove disponibili, con i dati sui profili di espressione genica (microarray) per una ulteriore validazione.

Il nostro gruppo continuerà, inoltre, la collaborazione, che si è rivelata in questi ultimi anni estremamente proficua in termini di produzione scientifica, con il gruppo di spettrometria di massa dell'Università di Genova diretto dal Dott. G. Damonte, il cui laboratorio è dotato di una moderna strumentazione che può essere definita complementare a quella in nostro possesso.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Lo sviluppo di una metodologia in grado di segnalare, in maniera estremamente precoce e sicura, la tendenza in un determinato individuo a sviluppare una neoplasia oppure, in un paziente affetto da una patologia neoplastica in fase iniziale, la tendenza ad una progressione della stessa, potrebbe consentire l'adattamento della corretta terapia al singolo individuo evitando trattamenti non necessari, inefficaci e soprattutto molto debilitanti.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

L'attività della S.S. Biopolimeri e Proteomica si articolerà essenzialmente su due filoni paralleli: da un lato verranno sviluppati nuovi metodi di HPLC/MS in grado di evidenziare specifiche molecole proteiche in campioni biologici di notevole complessità (siero, plasma, tessuti) e dall'altro verranno messi a punto dei protocolli affidabili per l'analisi comparativa del profilo peptidomico, ottenuto mediante analisi di massa MALDI/TOF, dal siero/plasma dei pazienti.

Nel corso del primo anno di attività ci si orienterà, in particolare, sulla messa a punto di separazioni multidimensionali in grado di ridurre il più possibile la complessità del campione. Le tecniche cromatografiche multidimensionali generalmente richiedono l'impiego di tre distinte colonne: una colonna a scambio cationico forte (SCX) per una separazione iniziale delle frazioni proteiche, una prima colonna apolare (solitamente C18) per la cattura degli analiti, ed una seconda colonna apolare per l'analisi vera e propria del campione. In breve, il campione viene caricato sulla colonna iniziale SCX e le differenti frazioni proteiche vengono eluite grazie ad un gradiente a salinità crescente. La prima colonna apolare (solitamente di lunghezza ridotta) ha il compito di catturare e concentrare le proteine eluite consentendo il cambio del solvente e l'eliminazione di sali e contaminanti. L'analisi vera e propria di tutte le frazioni viene realizzata sulla seconda colonna apolare. Il flusso eluito da questa colonna, solitamente C18 o C4, viene direttamente convogliato ad una sorgente ESI per l'analisi spettrometrica di massa.

La metodologia che verrà impiegata nel secondo filone della nostra attività prevede invece la realizzazione dell'analisi comparativa del profilo del peptidoma del siero o plasma ottenuto da gruppi di pazienti diversi caratterizzati da un preciso quadro clinico. L'analisi di massa MALDI/TOF vera e propria verrà preceduta dall'estrazione, dal campione in esame, del materiale proteico a basso peso molecolare, utilizzando sferette magnetiche a superficie funzionalizzata. Tali superfici sono in grado di legare selettivamente gruppi specifici presenti in proteine e peptidi, a seconda della modalità di interazione prescelta. In particolare noi impiegheremo microsferiche la cui superficie è caratterizzata dalla presenza di gruppi alchilici C18 e quindi in grado di legare peptidi mediante interazione idrofobica. Grazie a questo tipo di approccio è possibile ottenere una frazione peptidica con un range massa compreso tra 500 e 5000 Daltons. Poiché risulta essenziale lavorare in condizioni non saturanti dei siti di legame, la capacità di legame delle sferette magnetiche sarà preventivamente testata mediante l'uso di peptidi sintetici di massa e idrofobicità note.

Già nel corso del primo anno dovrebbe essere disponibile la messa a punto di procedure sperimentali e di analisi dei dati (con lo sviluppo di software dedicati) in grado di snellire sensibilmente la gestione dell'enorme mole di dati originata nel corso dei diversi studi.

Track record

Cardinali B.-Damonte G.-Melone L.-Salis A.-Tosetti F.-Rocco M.-Profumo A.

Identification of a new truncated form and deamidation products of fibrinopeptide B released by thrombin from human fibrinogen.

Thromb. Haemost. 96:302/308, 2006

Sviluppo e caratterizzazione dei gel di fibrina come veicoli per il rilascio locale di chemioterapici

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

Programma: c - Innovazioni terapeutiche: sviluppo dalle fasi precoci, incluse le correlazioni biologiche, agli studi di efficacia, inclusa la verifica di applicabilità nella pratica clinica

Responsabile scientifico: Mattia Rocco

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Aldo Profumo, Anna Aprile

Anno di inizio: 2009

Programmazione 2009-2011

Durata: 36 mesi

Parole chiave: gel di fibrina; cancro; chemioterapia; rilascio localizzato; microscopia confocale; diffusione della luce

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Terapia Immunologica (M. Viale); S.C. Nanobiotecnologie (C. Rosano); Animal Facility (M. Cilli); S.C. Chirurgia Plastica Ricostruttiva (P.L. Santi, E. Raposio)

Altri Enti coinvolti: Università dell'Insubria, Como (F. Ferri); DCCI, Università di Genova (C. Cuniberti); Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Genova (S. Cafaggi); Istituto G. Gaslini, Genova (M. Ponzoni)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Domande di finanziamento presentate nel 2009 alla Fondazione San Paolo e al Ministero della Salute – Bando Malattie Rare (Neuroblastoma)

Background

La rimozione chirurgica di lesioni neoplastiche è spesso il trattamento d'elezione, ma un'eradicazione totale non sempre può essere ottenuta, con conseguenti recidive e formazione di metastasi. Il ricorso a chemioterapia sistemica è quindi spesso obbligato, con severi effetti collaterali e problemi nel raggiungere il bersaglio desiderato. Gel a base di fibrina sono potenzialmente degli ottimi veicoli per il rilascio locale di una varietà di agenti, quali farmaci, proteine e cellule, data la loro totale biocompatibilità, la possibilità di modularne forma, porosità, elasticità e degradazione e la facilità di preparazione. Film, adesivi, spugne e colle a base di fibrina sono in uso chirurgico da decenni, mentre il loro impiego quali carriers è ancora in fase di sviluppo e rappresenta un campo in forte espansione.

Nonostante la formazione della fibrina sia studiata da molto tempo, parecchi punti rimangono ancora oscuri. Una conoscenza più approfondita della cinetica di formazione e delle proprietà strutturali dei gel di fibrina potrebbe portare a correlare queste caratteristiche con le capacità di rilascio di agenti in essi inglobati. Su questa linea in nostro gruppo è impegnato da tempo, e verrà sviluppata ulteriormente in questo progetto. Questo ci consentirà di esplorare la fattibilità tecnica e valutare vantaggi e svantaggi della veicolazione locale di agenti chemioterapici in alcuni tipi di tumore, impiegando modelli animali in cui verranno impiantati tumori di origine umana.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo generale del progetto è verificare la fattibilità tecnica e valutare vantaggi e svantaggi della veicolazione locale di agenti chemioterapici utilizzando gel di fibrina in almeno un modello animale di tumore umano. Propedeutica e complementare a questa attività vi è la caratterizzazione cinetica e strutturale dei gel di fibrina, in modo da poter tenere sotto controllo alcuni parametri fondamentali dei gel, quali dimensioni dei pori e delle fibre, loro resistenza, elasticità e degradabilità in vivo. Per ragioni principalmente di budget, solo questa seconda parte del progetto è stata perseguita nel triennio 2006-2008, rimandando lo studio del rilascio di farmaci in vivo e in vitro al presente progetto.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Il progetto ha un notevole potenziale impatto assistenziale, qualora si riuscisse a dimostrare la fattibilità di questo approccio in un modello animale. Due sono le forme tumorali che saranno oggetto dello studio: il neuroblastoma ed il melanoma.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Le attività 2009-2011 si svolgeranno a seconda del livello di finanziamento ottenuto. Come attività di base, richiedente un finanziamento minimo, proseguiamo gli studi volti alla caratterizzazione dei gel di fibrina, e cominceremo a studiare l'incorporazione ed il rilascio di farmaci in vitro. Se il progetto riceverà adeguato supporto, passeremo alla fase di sperimentazione in animali, che presenta costi decisamente superiori.

Più in dettaglio, in una prima fase saranno messi a punto i metodi migliori per incorporare i farmaci antineoplastici in gel e film (ottenuti per compressione planare dei gel) di fibrina, variando opportunamente le loro proprietà chimico-fisiche (per esempio, porosità, diametro delle fibre, presenza di reticolazione enzimatica tra le catene). Il loro rilascio sarà valutato in vitro in funzione di questi parametri, e sarà esplorata l'utilità di pre-incorporarli in polimeri naturali biocompatibili a basso peso molecolare, quali gli alginati, gli acidi ialuronici ed i liposomi, prima dell'inclusione nei gel/film di fibrina, per favorire la ritenzione del farmaco in loco ed il suo rilascio graduale. Sarà anche valutata la possibilità di legare chimicamente il farmaco alle molecole di fibrinogeno, in modo da favorire il rilascio solo a seguito di degradazione locale del gel/film di fibrina ad opera degli enzimi presenti fisiologicamente. I farmaci antineoplastici su cui concentreremo la nostra attenzione sono tra quelli d'elezione per il tipo di neoplasie che ci prefiggiamo di studiare (neuroblastoma e melanoma), il cisplatino, la bleomicina e la doxorubicina, in modo da poter eventualmente trasferire rapidamente la metodologia ad una fase di sperimentazione clinica. Questo non precluderà l'eventuale impiego d'altri farmaci, da soli od in combinazione, a seconda dei risultati iniziali del nostro studio.

Nell'eventuale prosieguo dello studio, la tossicità locale e la cinetica di rilascio dei farmaci antineoplastici dai gel/film di fibrina (e la loro persistenza in loco) saranno inizialmente valutate nel modello animale rappresentato dal ratto. Questo verrà fatto a partire dalle migliori condizioni individuate dal lavoro svolto in vitro in precedenza. In una seconda fase, come modello animale del neuroblastoma umano sarà impiegato un modello ortotopico impiantato nella capsula surrenale in topi immunodeficienti (SCID e/o nudi). Per il melanoma si utilizzerà invece il modello rappresentato dalla linea di melanoma umano MZ2-MEL impiantata sottocute in topi immunodeficienti che in studi precedenti ha dato il 100% di crescita tumorale. In entrambi i casi, subito dopo la rimozione chirurgica delle lesioni indotte, gel o film di fibrina contenenti gli agenti antineoplastici saranno applicati localmente prima di suturare. In alternativa i gel/film di fibrina caricati con i farmaci, in forma libera e/o liposomiale, saranno messi a contatto con il tumore per valutarne l'attività. I topi saranno quindi monitorati clinicamente e con l'ausilio di tecniche di imaging per controllare la crescita tumorale e la morbilità associata al tumore.

Programmazione 2009-2011

Inoltre, durante il primo anno di lavoro proseguiremo gli studi fatti durante il precedente progetto triennale volti a caratterizzare meglio e più rapidamente i gel di fibrina, utilizzando tecniche chimico fisiche quali la diffusione della luce a piccolo angolo (LAELS), la turbidimetria, e la microscopia confocale. In collaborazione con il Prof. F. Ferri (Università dell'Insubria a Como), abbiamo sviluppato tecniche che permettono la misura delle dimensioni di maglia, frattalità, e diametro delle fibre a partire sia da misure di LAELS/turbidità, che da microscopia confocale. Contiamo di sottomettere due lavori entro la fine del 2009 nei quali queste tecniche, e la loro validazione tramite simulazioni al computer, verranno descritte in dettaglio. In particolare, la tecnica di analisi di immagini al microscopio confocale è particolarmente innovativa, e potrebbe trovare ampia diffusione nel campo.

Track record

Cardinali B.-Damonte G.-Melone L.-Salis A.-Tosetti F.-Rocco M.-Profumo A.
Identification of a new truncated form and deamidation products of fibrinopeptide B released by thrombin from human fibrinogen.
Thromb. Haemostasis 96:302/308, 2006

Rocco M.
Fibrin formation on fast forward.
Blood 111:4839, 2008