

S.C. Terapia Immunologica

Identificazione di nuovi marcatori di staminalità e progressione nel melanoma uveale e nei tumori polmonari

Linea di ricerca: : 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: a - Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

Responsabile scientifico: Rosaria Gangemi

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Silvano Ferrini, Gaia Barisione, Marina Fabbi, Antonella Brizzolara, Anna Maria Orengo, Maurizio Viale

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: cellule staminali tumorali; trasduzione del segnale; citochine; xenotrapianti; biomarcatori

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (S. Salvi); S.C. Chirurgia Toracica (C. Mosci); S.C. Oncologia Medica A (P. Queirolo); S.S. Genomica Funzionale (U. Pfeffer); Animal Facility (M. Cilli)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Compagnia di San Paolo

Background

L'esistenza di cellule staminali tumorali (CSC) inizialmente dimostrata (Dick 1994) nella leucemia mieloide acuta, è stata confermata in diversi tipi di tumori solidi fra cui carcinomi mammari e polmonari, e tumori cerebrali. Sfruttando l'espressione di marcatori di superficie, come CD24, CD34, CD38, CD44 e CD133, sottopopolazioni con caratteristiche staminali sono state isolate da numerosi tumori solidi. La staminalità e la tumorigenicità della sottopopolazione identificata sono state dimostrate iniettando le cellule isolate in topi immunodeficienti (NOD-SCID). Sebbene dati recenti sul melanoma cutaneo mettano in discussione l'esiguità del numero delle CSC, in molti casi un numero molto piccolo di cellule selezionate per marcatori di staminalità è sufficiente per ottenere nel topo immunodeficiente un tumore che riproduce l'eterogeneità di quello umano (fenocopia). La componente staminale di molti tumori è responsabile della resistenza alla chemio/ radioterapia, delle metastasi e delle recidive tumorali. Per eradicare il tumore sembra indispensabile colpire le cellule staminali tumorali. Oltre alle caratteristiche intrinseche delle CSC sembra essere molto rilevante la loro responsività al microambiente (nicchia tumorale) costituita da fibroblasti, endotelio e macrofagi e matrice, nei processi di metastatizzazione ed immunoevasione.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivi generali del progetto sono la caratterizzazione delle cellule staminali tumorali del melanoma uveale, del carcinoma polmonare e l'individuazione di molecole specifiche coinvolte nelle metastasi e nell'immunoevasione. Questi tumori sono stati scelti perchè tali patologie fanno riferimento al nostro Istituto in numeri discreti e per l'accessibilità ai dati di gene expression profile grazie alla collaborazione con l'Unità di Genomica Funzionale (Dr U. Pfeffer). Inoltre, poiché altre unità del laboratorio (Dr.ssa M. Fabbi) sono impegnate in studi sul molecole coinvolte nella progressione dei carcinomi ovarici, valuteremo se i markers di staminalità o di progressione/immunoevasione identificati negli altri modelli tumorali siano rilevanti anche per questo tipo di patologia.

Geni/molecole candidati saranno infatti inizialmente identificati mediante analisi di microarray di tumori di pazienti a diverso stadio di malattia tramite l'unità di Genomica Funzionale. Verrà quindi valutato il possibile ruolo di alcune molecole come biomarcatori e target terapeutici attraverso lo sviluppo di modelli animali della malattia umana.

Intendiamo identificare e isolare sottopopolazioni staminali da colture primarie di melanomi uveali e tumori polmonari NSCLC. Nostri risultati preliminari indicano la presenza di sottopopolazioni di cellule CD133+ e MDR1+ in alcune linee umane dei melanomi uveali ed in alcuni tumori polmonari NSCLC di tipo neuroendocrino. Le sottopopolazioni isolate sulla base di questi marcatori verranno trapiantate ortotopicamente nell'animale immunodeficiente per dimostrarne la tumorigenicità. La capacità di ricreare una fenocopia del tumore originario, di dare metastasi e di riprodurre tumori in modo seriale saranno elementi condizionanti nel definire la staminalità di una popolazione identificata da markers fenotipici. Per rispondere alla questione della possibile acquisizione di nuove proprietà delle cancer stem cells nelle metastasi o di un loro arricchimento numerico, studieremo mediante microarray CSC isolate da tumore primitivo e metastatico. Dimostrata la staminalità della sottopopolazione isolata paragoneremo il suo profilo d'espressione genica con quello della componente non tumorigenica. Studi di expression profiling potranno indicare il possibile ruolo di meccanismi intrinseci o di fattori estrinseci presenti nel microambiente correlati al fenotipo metastatico o all'immunoevasione. In particolare verranno considerate l'espressione di recettori per chemochine, potenzialmente coinvolte nel processo metastatico, e recettori per citochine quali IL-4, IL-13 ed IL-6 e verrà valutato il possibile ruolo di loop autocrini o paracrini, coinvolgenti i rispettivi ligandi. Il ruolo del microambiente tumorale nel determinare l'induzione o la selezione di un fenotipo metastatico verrà studiato attraverso lo studio delle cellule del microambiente (fibroblasti e macrofagi associati al tumore), capaci di produrre citochine immunosoppressive e neoangiogeniche e ad esperimenti di trapianto simultaneo di CSC con fibroblasti tumorali.

Programmazione 2009-2011

Nel caso del melanoma oculare verranno considerate molecole candidate identificate mediante l'analisi del profilo di espressione genica (microarray), in quanto associate allo sviluppo di metastasi di pazienti con melanoma uveale. Dati preliminari di microarray indicano infatti un'espressione eterogenea del recettore CXCR4 e dell'oncogene c-met e dei trasduttori di segnale quali SDCP e SOX4 in una casistica di 14 melanomi oculari. Intendiamo studiare se le CSC dei diversi tumori sono caratterizzate dall'attivazione prevalente di una via di trasduzione del segnale (AKT, KB, Notch, WNT). I dati dei microarray saranno confermati in vitro con tecniche di biologia molecolare e biochimica sulle linee in coltura continua, sulle colture primarie, sulle biopsie dei pazienti e, in vivo attraverso esperimenti di iperespressione genica o gene silencing. Ci proponiamo infatti di sviluppare un modello murino dei tumori umani mediante trapianti ortotopici ed eterotopici delle CSC in diversi ceppi di topi immunodeficienti. La produzione di un modello murino è di grande importanza sia per validare in vivo i risultati sperimentali che per lo sviluppo di nuovi protocolli terapeutici. A questo scopo utilizzeremo xenotrapianti ortotopici ed eterotopici in topi NOD-SCID e NOD-SCID IL2RG^{-/-}. Il vantaggio dell'utilizzo di quest'ultimo ceppo, privo di catena gamma del recettore dell'IL-2, è la mancanza di cellule NK, potenzialmente coinvolte nel controllo delle metastasi. Questi modelli saranno utilizzati per una dimostrazione formale del ruolo di molecole candidate per la formazione di metastasi, mediante esperimenti di silencing con siRNA specifici o di lentivirus. Infine il siero degli animali potrà rappresentare anche un'utile sorgente per lo studio di possibili biomarker mediante tecniche immunologiche e di proteomica. Come obiettivi secondari ci proponiamo di determinare l'eventuale correlazione tra il numero di CSC e la prognosi del paziente e la possibilità di isolare CSC dal sangue circolante per definirne le caratteristiche rispetto a quelle dei tumori primitivi e la relazione con la prognosi. Inoltre verrà considerata la possibilità che molecole iperesprese dal tumore nel corso della progressione possano essere rilasciate dal tumore e rappresentare quindi biomarcatori del tumore. A tal fine inizialmente studieremo le proteine presenti nel secretoma di colture primarie o di linee o di melanomi uveali e NSCLC. Questo aspetto può essere particolarmente importante per il melanoma uveale, in quanto il marcatore S-100, utilizzato per i melanomi cutanei, non è un marcatore predittivo di metastasi.

Impatto assistenziale certo o potenziale:

- Identificazione di marcatori di sottopopolazione di cellule staminali tumorali.
- Identificazione di potenziali bersagli terapeutici e loro validazione in modelli in vitro ed nel piccolo animale.
- Identificazione e validazione preliminare di potenziali biomarcatori.

Tali risultati saranno raggiungibili a medio o a lungo termine, trattandosi di studi pre-clinici che prevedono l'utilizzo di modelli animali.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Nel primo anno sono previste le seguenti attività:

- Isolamento e coltura delle cellule di melanoma uveale e di NSCLC

Le linee di melanoma uveale MEL270 e 92.1 (derivate da tumori primitivi) e OMM1, OMM2.5 e OMM2.3 (derivate da metastasi) sono state cortesemente fornite dalla Dott.essa M. Jager (Leiden, The Netherland). Colture primarie di melanoma uveale saranno ottenute da frammenti di tumore primitivo o metastatico previo consenso informato. Le cellule saranno coltivate sia come monostrato nelle condizioni standard (RPMI 1640+10%FCS) che in assenza di siero per la crescita di cellule staminali.

Colture primarie di NSCLC saranno derivate con modalità analoghe da frammenti di tumore previo consenso informato

- Caratterizzazione fenotipica delle cellule di melanoma uveale e identificazione di marcatori di staminalità

Le colture primarie e le linee di melanoma uveale e polmonare verranno analizzate per l'espressione di marcatori di membrana mediante immunofluorescenza e citofluorimetria a flusso (FACS). Le sottopopolazioni che esprimeranno marcatori di staminalità come CD133, saranno isolate mediante FACS sorter o biglie immunomagnetiche. Molecole coinvolte nella trasduzione del segnale e nelle metastasi saranno analizzate su cellule coltivate in chamber slides mediante immunofluorescenza e microscopia confocale. Le caratteristiche molecolari saranno analizzate mediante Western blotting e immunoprecipitazione.

Nel secondo anno sono previste le seguenti attività:

- Sviluppo di un modello animale di melanoma uveale umano mediante xenotrapianto in ceppi di topi immunodeficienti
Cellule di colture primarie, di linee di melanoma uveale o sottopopolazioni purificate, saranno trapiantate ortotopicamente o eterotopicamente in topi NOD-SCID oppure in topi NOD-SCID IL-2RG^{-/-}. Quest'ultimo ceppo non solo è privo di cellule T e B ma anche di NK e sarà di particolare interesse soprattutto per lo studio dello sviluppo di metastasi. Nel caso del trapianto ortotopico, cellule di melanoma uveale trasdotte con il gene della luciferasi, saranno inoculate nella camera posteriore di un occhio dell'animale anestetizzato mediante un microscopio operatorio. Una volta sviluppato il tumore, l'occhio verrà enucleato e i topi controllati ad intervalli di tempo per sviluppo di metastasi, con l'impiego di un sistema di immagine IVIS. La presenza di metastasi sarà confermata dall'esame autoptico. Metastasi sperimentali verranno anche indotte mediante impianto intrasplenico o intravenoso di linee trasdotte con il gene della luciferasi o con cellule di colture primarie con lo scopo di studiare il tropismo epatico delle cellule metastatiche.

Linee di carcinoma polmonare, cellule di colture primarie di NSCLC o sottopopolazioni separate su base fenotipica verranno trapiantate sottocute o in un polmone di topi immunodeficienti dopo anestesia. La crescita del tumore sarà controllata mediante IVIS.

- Profili di espressione genica

Utilizzeremo la tecnologia dei microarray per analizzare i geni differenzialmente espressi dalla popolazione arricchita in putative cellule staminali di melanoma uveale e polmonare rispetto alle popolazioni deplete. Tenteremo anche di isolare cellule circolanti di melanoma uveale da pazienti con malattia metastatica utilizzando tecniche di separazione immunomagnetica. Nello studio del melanoma uveale sarà studiato il profilo di espressione genica delle cellule metastatiche rispetto a quelle del tumore primitivo. A tale scopo purificheremo l'RNA delle varie popolazioni cellulari mediante l'uso di TriZol e di colonne Minielute RNeasy clean-up kit (Qiagen). Il profilo di espressione genica globale verrà analizzato utilizzando la piattaforma Affymetrix. I dati più rilevanti verranno confermati con la real-time RT-PCR e, a livello proteico mediante immunofluorescenza e western blot.

Programmazione 2009-2011

Nel terzo anno sono previste le seguenti attività:

- Esperimenti di silenziamento genico

L'espressione di molecole rilevanti per la progressione e le metastasi verrà inattivata mediante transfezione di siRNA specifici (SMART pool from DHARMACON). Per esperimenti di silenziamento in vivo, saranno usati lentivirus o siRNA modificati che non necessitano di essere veicolati all'interno delle cellule. La capacità migratoria ed invasiva delle cellule sottoposte a silenziamento genico saranno valutate in vitro con esperimenti di wound healing e di invasione della matrice.

Risultati attesi per il I anno: Identificazione di marcatori di staminalità nelle linee di melanoma uveale e di carcinoma polmonare. Messa a punto delle condizioni di coltura per la derivazione di colture primarie da frammenti di tumore. Identificazione di marcatori di staminalità nelle cellule primarie di tumore e separazione di sottopopolazioni mediante l'uso di marcatori fenotipici. Verifica dell'espressione di molecole di traduzione del segnale, rilevanti dall'analisi dei microarrays, sulle linee in coltura continua e nelle colture primarie.

Track record

Gangemi RM.-Perera M.-Corte G.

Regulatory genes controlling cell fate choice in embryonic and adult neural stem cells.

J. Neurochem. 89(2):286/306, 2004

De Totero D.-Meazza R.-Zupo S.-Cutrona G.-Matis S.-Colombo M.-Balleari E.-Pierri I.-Fabbi M.-Capaia M.-Azzarone B.-Gobbi M.-Ferrarini M.-Ferrini S.

Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells.

Blood 107:3708/3715, 2006

Gangemi RM.-Daga A.-Muzio L.-Marubbi D.-Cocozza S.-Perera M.-Verardo S.-Bordo D.-Griffero F.-Capra MC.-Mallamaci A.-Corte G.

Effects of Emx2 inactivation on the gene expression profile of neural precursors.

Eur. J. Neurosci. 23(2):325/334, 2006

Daga A.-Orengo AM.-Gangemi RM.-Marubbi D.-Perera M.-Comes A.-Ferrini S.-Corte G.

Glioma immunotherapy by IL-21 gene-modified cells or by recombinant IL-21 involves antibody responses.

Int. J. Cancer 121(8):1756/1763, 2007

Di Carlo E.-De Totero D.-Piazza T.-Fabbi M.-Ferrini S.

Role of IL-21 in immune-regulation and tumor immunotherapy.

Cancer Immunol. Immunother. 56:1323/1334, 2007

Rosso O.-Piazza T.-Bongarzone I.-Rossello A.-Mezzanzanica D.-Canevari S.-Orengo AM.-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(12):1246/1253, 2007

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 AM.-Fabbi M.-Borghi M.-Ribatti D.-Nico B.-Carlini B.-Pistoia V.-Corrias MV.-Ferrini S.

Immunotherapy of neuroblastoma by an Interleukin-21-secreting cell vaccine involves survivin as antigen.

Cancer Immunol. Immunother. 57:1625/1634, 2008

De Totero D, Meazza R, Capaia M, Fabbi M, Azzarone B, Balleari E, Gobbi M, Cutrona G, Ferrarini M, Ferrini S.

The opposite effects of IL-15 and IL-21 on CLL B cells correlate with differential activation of the JAK/STAT and ERK1/2 pathways.

Blood 111:517/524, 2008

Giuliani M.-Giron Michel J.-Negrini S.-Vacca P.-Durali D.-Caignard A.-Le Bousse-Kerdiles C.-Chouaib S.-Devocelle A.-Bahri R.-Durrbach A.-Taoufik Y.-Ferrini S.-Croce M.-Mingari MC.-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, 2008

Rotondo R.-Mastracci L.-Piazza T.-Barisione G.-Fabbi M.-Cassanello M.-Costa R.-Morandi B.-Astigiano S.-Cesario A.-Sormani MP.-Ferralazzo G.-Grossi F.-Ratto GB.-Ferrini S.-Fruento 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

Gangemi RM.-Griffero F.-Marubbi D.-Perera M.-Capra MC.-Malatesta P.-Ravetti GL.-Zona GL.-Daga A.-Corte G.

SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity.

Stem Cells 27(1):40/48, 2009

Programmazione 2009-2011

Gangemi R.-Paleari L.-Orengo AM.-Cesario A.-Chessa L.-Ferrini S.-Russo P.
Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor growth and progression and drug resistance.
Curr. Med. Chem. 16(14):1688/1703, 2009

Khawam K.-Giron-Michel J.-Gu Y.-Perier A.-Giuliani M.-Caignard A.-Devocelle A.-Ferrini S.-Fabbi M.-Charpentier B.-Ludwig A.-Chouaib S.-Azzarone B.-Eid P.
Human renal cancer cells express a novel membrane-bound interleukin-15 that induces, in response to the soluble interleukin-15 receptor alpha chain, epithelial-to-mesenchymal transition.
Cancer Res. 69:1561/1569, 2009

Rotondo R.-Barisione G.-Mastracci L.-Grossi F.-Orengo AM.-Costa R.-Truini M.-Fabbi M.-Ferrini S.-Barbieri O.
IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer.
Int. J. Cancer 125:887/893, 2009

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

Linea di ricerca: 2 – Interazioni Tumore-Ospite

Programma: a – Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

Responsabile scientifico: Marina Fabbi

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Silvano Ferrini, Anna Maria Orengo, Sara Gangemi

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

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

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

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

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; Ministero della Salute; Compagnia di San Paolo

Background

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. Questi processi sono sostenuti da interazioni multiple e interconnesse, la cui conoscenza passa attraverso la definizione del contributo di ciascuna molecola di adesione coinvolta. 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 e ne abbiamo definito alcune proprietà, quali internalizzazione e ricircolo (Piazza et al.). Abbiamo inoltre dimostrato che ALCAM è rilasciato in forma solubile da cellule di carcinoma ovarico, che il processo di rilascio è stimolato da recettori tirosina-cinasici come EGFR ed è mediato dall'attività proteolitica di metalloproteasi, soprattutto di ADAM17/TACE. 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.). Questo dato è corroborato dall'osservazione che la perdita dell'espressione di membrana di ALCAM correla con una peggiore prognosi nei carcinomi ovarici (Mezzanzanica et al.). Secondo studi di altri autori, ALCAM può funzionare come un sensore di densità cellulare capace di regolare l'attività proteolitica che avvia la mobilitazione cellulare, e la sua espressione è correlata alla progressione di diverse patologie oncologiche (melanoma, carcinoma della mammella, della prostata e del colon). L'insieme di questi dati 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 e di ADAM17/TACE nella progressione tumorale e disseminazione metastatica, particolarmente in carcinoma ovarico, neuroblastoma e carcinoma della tiroide. Questo obiettivo viene perseguito attraverso i seguenti obiettivi secondari:

- Studio in vitro del controllo dinamico di ALCAM sulla superficie cellulare, in particolare del rilascio ('shedding') della molecola e del suo rapporto con la mobilitazione 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.

Programmazione 2009-2011

- 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 di Genova, rispettivamente.

Come obiettivo secondario nell'ambito dello studio del ruolo del microambiente nella disseminazione del carcinoma ovarico, proponiamo inoltre la valutazione del ruolo della citochina proinfiammatoria IL-18 come bio-marcatore e la caratterizzazione molecolare della forma prodotta (se pro-IL18, biologicamente inattiva, o IL-18 matura, biologicamente attiva).

Impatto assistenziale certo o potenziale L'impatto assistenziale è potenziale e consiste nella possibile identificazione di molecole utilizzabili come biomarcatori diagnostici, prognostici, predittivi del trattamento o come bersagli terapeutici.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

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, intendiamo utilizzare nuovi inibitori farmacologici di questa molecola, che verranno caratterizzati sulla base della loro attività di inibizione del rilascio di ALCAM solubile da parte di cellule ovariche in coltura e di blocco della motilità ed invasività cellulare, mediante tests in vitro ("wound-healing", penetrazione in spugne di matrice). Successivamente gli inibitori con le migliori caratteristiche di specificità e di attività (IC50) potranno essere utilizzati in esperimenti in vivo in topi portatori di xenotrapianti o in topi transgenici che sviluppano carcinomi ovarici spontanei, al fine di determinarne le potenzialità come farmaci antineoplastici.

Per valutare il ruolo di ADAM17/TACE in vivo in carcinomi ovarici umani, intendiamo dosare i livelli di ALCAM solubile nei liquidi biologici di pazienti comparandoli con quelli della molecola di adesione L1, già descritta come biomarcatore di malattia, quali possibili parametri dell'attività proteolitica di questa molecola. In particolare intendiamo valutare se i livelli di ALCAM ed L1 solubile nel liquido ascitico o nel siero di pazienti con carcinoma ovarico possano correlare con lo stadio di malattia e con la sopravvivenza. Questi dati oltre a permettere di validare il ruolo di ALCAM come biomarcatore di malattia, potrebbero essere utili per identificare sottogruppi di pazienti che potrebbero beneficiare di terapie mirate al blocco di ADAM17/TACE.

Siccome dati in silico indicano potenziali siti di legame di ALCAM con la proteina della matrice laminina, valuteremo la capacità di ALCAM di interagire con la matrice extracellulare. Intendiamo pertanto verificare l'interazione con proteine della matrice mediante esperimenti di co-precipitazione di ALCAM e analisi proteomica delle proteine coprecipitate. Inoltre dato che nello sviluppo neuronale ALCAM svolge un ruolo di pathfinder, intendiamo verificare se le sue interazioni con la matrice possano contribuire in modo analogo all'invasività dei tumori e se questo compito sia svolto da ALCAM di membrana. Studieremo anche il ruolo di ALCAM nella biologia delle "cancer stem cells" ovariche isolate da ascite ed espanse in vitro come "sferoidi" in terreni formulati per la crescita di cellule staminali. Inoltre verrà analizzato il secretoma di tali colture primarie mantenute in condizioni di staminalità, al fine di identificare nuovi biomarcatori.

Proseguiremo anche con la caratterizzazione strutturale e funzionale della forma solubile di ALCAM e con lo studio delle sue interazioni. A questo proposito, studieremo la capacità di ALCAM di interagire con danger factors, quali S100B e HMGB1, entrambi ligandi di RAGE che potrebbe giocare un ruolo nei processi infiammatori importanti per la progressione tumorale. Valuteremo quindi i possibili effetti biologici di tale interazione su cellule tumorali e componenti del microambiente tumorale ovarico, con particolare riferimento ai macrofagi tumore-associati.

L'influenza della componente infiammatoria sulla progressione del carcinoma ovarico verrà affrontata con lo studio del significato della produzione della citochina proinfiammatoria IL-18 da parte delle cellule di carcinoma ovarico.

I risultati attesi nel corso del primo anno riguardano a) la caratterizzazione di IL-18 nell'ascite di carcinoma ovarico e la definizione di un suo possibile ruolo come biomarcatore, b) la caratterizzazione di ALCAM solubile "sheddato" da cellule di neuroblastoma, carcinoma ovarico e carcinoma della tiroide, c) la valutazione in vitro e preliminari studi in vivo dell'attività di inibitori di ADAM17/TACE di nuova sintesi.

Track record

Piazza T.-Cha E.-Bongarzone I.-Canevari S.-Bolognesi A.-Polito L.-Bargellesi A.-Sassi F.-Ferrini S.-Fabbi M.
Internalization and recycling of ALCAM/CD166 detected by a fully human single chain recombinant antibody.
J. Cell Sci. 118:1515/1525, 2005

Rosso O.-Piazza T.-Bongarzone I.-Rossello A.-Mezzanzanica D.-Canevari S.-Orengo A.M.-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.-Staurengho S.-Losa M.-Balladore E.-Alberti P.-Lusa L.-Ditto A.-Ferrini S.-Pierotti M.A.-Barbareschi M.-Pilotti S.-Canevari S.
Sub-cellular localization of activated cell adhesion molecule is a molecular predictor of survival in ovarian carcinoma patients.
Clin. Cancer Res. 14:1726/1733, 2008

Ruolo e meccanismi d'azione di citochine della famiglia dell'IL2 condizionanti la sopravvivenza di neoplasie linfatiche con andamento cronico
--

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: a – Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

Programmazione 2009-2011

Responsabile scientifico: Silvano Ferrini

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Anna Maria Orengo, Marina Fabbi

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: leucemia linfatica cronica; linfomi follicolari; interleuchine; microambiente

Altre strutture IST partecipanti: Animal Facility (M. Cilli); S.S. Malattie Linfoproliferative (S. Zupo, G. Cutrona)

Altri Enti coinvolti: Istituto G. Gaslini, Genova (I. Airoidi)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

Background

Molte evidenze indicano che il microambiente degli organi linfoidei secondari e del midollo osseo svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi di malattie linfoproliferative croniche delle cellule B, come la leucemia linfatica cronica (CLL) ed i linfomi follicolari (FL) o linfocitici (LL). Infatti cellule di questi tumori non proliferano e tendono ad andare incontro ad apoptosi spontanea se coltivati in vitro, poiché vengono a mancare stimoli del microambiente, quali la stimolazione antigenica, il CD40L e molteplici citochine, essenziali per la sopravvivenza e proliferazione delle cellule linfoidee B. In studi precedenti, la SC Terapia Immunologica ha dimostrato che due citochine della famiglia dell'interleuchina (IL)2: IL21 e IL15, svolgono funzioni opposte in cellule di CLL. Infatti, IL15 si comporta come un fattore di crescita, inducendo proliferazione e protezione dall'apoptosi spontanea, mentre IL21 induce apoptosi e si contrappone agli effetti mitogenici dell'IL15 (De Toter et al, Blood 2006).

Va ricordato che entrambe le citochine sono attivatrici della proliferazione e delle attività funzionali di cellule T ed NK. Dati gli effetti comuni di IL21 ed IL15 su cellule T ed NK il fatto che queste citochine possano indurre effetti opposti in cellule di CLL è difficilmente spiegabile. A tale riguardo, va ricordato che entrambe le citochine utilizzano la catena gamma comune del recettore dell'IL-2 (IL2RG) come componente dei loro complessi recettoriali e la tirosina chinasi JAK3, che è essenziale per la trasduzione del segnale tramite proteine STAT. Nel caso delle CLL gli effetti di IL21 e IL15, anche se di segno opposto, sono aumentati da una precedente stimolazione cellulare attraverso il recettore CD40. Questo stimolo determina una up-regolazione dell'espressione di IL21R α e, in alcuni casi anche di IL15R α e di IL21R β , una componente del complesso recettoriale dell'IL-2 che è condivisa dall'IL15. Lo studio della trasduzione del segnale mediato da IL21 ed IL15 in cellule di CLL ha indicato che, come atteso, sia IL15 che IL21 attivano la fosforilazione di JAK3, tuttavia, IL21 induce prevalentemente la fosforilazione di STAT3, mentre IL15 attiva STAT5. Inoltre IL21, ma non IL15, attiva la via JAK1/STAT1, una via che è stata legata a fenomeni apoptotici in molti tipi cellulari. Di conseguenza la via JAK1/STAT1 potrebbe essere coinvolta nell'apoptosi indotta da IL21, mentre la via JAK3/STAT5 potrebbe essere importante per l'effetto mitogenico dell'IL15 in cellule di CLL. Infatti STAT5 è importante per lo sviluppo del sistema linfoide e per la proliferazione di cellule linfoidee. In effetti inibitori di JAK3 sono stati in grado di bloccare l'effetto mitogenico di IL15 in maniera dose-dipendente (De Toter et al, 2008).

La via MEK1/ERK1/2 è stata correlata a segnali mitogenici e anti-apoptotici in cellule di CLL in risposta a stimoli diversi. Poiché IL21R β è in grado di reclutare l'adaptor protein Shc che, tramite la via Ras/Raf può attivare Mek1, abbiamo studiato l'effetto di IL21 ed IL15 su questa pathway in cellule di CLL. I nostri dati indicano che IL15, ma non IL21, induce fosforilazione di Shc e di ERK1/2. La via MEK1/ ERK1/2 sembra svolgere un ruolo molto importante nel segnale anti-apoptotico di IL15. Infatti, inibitori di MEK1 sono in grado di revertare l'effetto anti-apoptotico di IL15 e di aumentare l'apoptosi spontanea in cellule di CLL.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo generale del progetto è lo studio dei mediatori intracellulari che regolano l'apoptosi o la sopravvivenza cellulare indotta da citochine della famiglia dell'IL-2 (IL21, IL15 ed IL4) in cellule di CLL o FL. Obiettivi intermedi saranno 1) La caratterizzazione dei recettori, vie di trasduzione del segnale e meccanismi di induzione di apoptosi in cellule di FL 2) Lo studio dei recettori per IL-4 espressi da cellule di FL e la caratterizzazione delle pathways di trasduzione del segnale anti-apoptotico 3) Lo studio della regolazione di geni e di miRNA da parte di IL15 ed IL21 in cellule di B-CLL mediante microarray ad alta densità. L'identificazione di geni differenzialmente regolati potrebbe fornire nuove indicazioni sulle vie che mediano l'apoptosi o la sopravvivenza in cellule di B-CLL 4) Studio di possibili inibitori di meccanismi molecolari di sopravvivenza/proliferazione a fini terapeutici in modelli in vitro ed in vivo.

Impatto assistenziale certo o potenziale

L'impatto assistenziale è potenziale e consiste nella possibile identificazione di molecole utilizzabili come bersagli terapeutici nella B-CLL o nei FL che potrebbe tradursi in possibili applicazioni terapeutiche nel medio/lungo periodo. Tali inibitori potrebbero trovare un utilizzo al fine di limitare l'espansione di cellule di CLL o di FL o di sensibilizzarle a farmaci anti-tumorali pro-apoptotici.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Attualmente, in collaborazione con S. Zupo e coll., stiamo estendendo lo studio degli effetti di IL21 a cellule primarie e linee cellulari di FL, che hanno la caratteristica traslocazione t(14;18). Questo aspetto è importante, in quanto sono in corso studi clinici di fase I che prevedono l'associazione di anticorpi anti-CD20 e IL21 nei linfomi non-Hodgkin, di cui i

Programmazione 2009-2011

FL rappresentano una percentuale importante. Dati preliminari su linee cellulari indicano una eterogeneità di espressione di IL21R in FL ed una ridotta sensibilità all'effetto pro-apoptotico di IL21. Stiamo attualmente studiando le vie di trasduzione del segnale indotto dall'IL21 in cellule di FL, i meccanismi dell'effetto apoptotico e ed i possibili meccanismi coinvolti nella resistenza di alcune linee di FL all'apoptosi indotta da IL21.

E' stato proposto che anche IL4, un'altra citochina della famiglia dell'IL2 possa svolgere un ruolo nel FL, svolgendo un'attività pro-tumorale. In effetti IL4 aumenta la sopravvivenza di cellule primarie di FL in vitro, svolgendo quindi un effetto opposto rispetto ad IL21. Poiché esistono due tipi di recettore per IL4, entrambi a struttura eterodimerica (IL4RA/IL2R e IL4RA/IL13RA), intendiamo caratterizzare il tipo di recettore espresso e le vie di trasduzione del segnale in linee e cellule primarie di FL.

Parallelamente a questo aspetto stiamo conducendo studi di espressione genica in cellule di CLL attivate da IL21 o da IL15, al fine di chiarire i meccanismi di azione di queste citochine, in collaborazione con L. De Cecco e S. Canevari (INT, Milano). A tal fine cellule di CLL ottenute da differenti pazienti sono state stimulate con terreno di coltura, IL21 o IL15 per vari tempi ed il loro RNA è stato estratto ed analizzato per "gene expression profiling" mediante microarray ad alta densità e la piattaforma Illumina. Attualmente è in corso l'analisi bioinformatica per identificare i geni modulati in modo significativo, anche allo scopo di fare un clustering di geni differenzialmente regolati sulla base di vie di signaling intracellulare mediante opportuni algoritmi (Ingenuity). Questi dati potrebbero fornire importanti informazioni sulle pathways coinvolte nella regolazione della sopravvivenza e proliferazione di cellule di CLL. I dati ottenuti verranno validati mediante RT-PCR quantitativa e analisi delle proteine codificate, mediante immunofluorescenza, ELISA o Western blotting. Inoltre poiché nei tumori, ed in particolare nelle CLL, i miRNA svolgono importanti funzioni di controllo sulla proliferazione e sopravvivenza cellulare, regolando l'espressione di proteine funzionalmente rilevanti, intendiamo valutare i possibili effetti delle due citochine sul miRNAoma. In tempi successivi valuteremo anche l'effetto di IL21 e IL4 sull'espressione genica e di miRNA di cellule di FL.

Il ruolo funzionale di specifiche molecole proteiche o di miRNA nel regolare la proliferazione o la sopravvivenza cellulare verrà studiata con tecniche di trasfezione genica o di silencing.

Nell'insieme i risultati di questi studi potranno fornire nuove indicazioni sui meccanismi molecolari che regolano proliferazione e sopravvivenza di neoplasie linfatiche ed indicare nuovi potenziali target terapeutici. Nel corso del terzo anno ci proponiamo pertanto lo studio di inibitori di meccanismi molecolari di sopravvivenza/proliferazione di cellule di CLL o FL in modelli pre-clinici in vitro ed in vivo.

Track record

De Toter D.-Meazza R.-Zupo S.-Cutrona G.-Matis S.-Colombo M.-Balleari E.-Pierri I.-Fabbi M.-Capaia M.-Azzarone B.-Gobbi M.-Ferrari M.-Ferrini S.

Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells.

Blood 107:3708/3715, 2006

Daga A.-Orengo AM.-Gangemi RM.-Marubbi D.-Perera M.-Comes A.-Ferrini S.-Corte G.

Glioma immunotherapy by IL-21 gene-modified cells or by recombinant IL-21 involves antibody responses.

Int. J. Cancer 121:1756/1763, 2007

De Ambrosis A.-Casciano I.-Croce M.-Pagnan G.-Radic L.-Banelli B.-Di Vinci A.-Allemanni G.-Tonini GP.-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, 2007

Di Carlo E.-de Toter D.-Piazza T.-Fabbi M.-Ferrini S.

Role of IL-21 in immune-regulation and tumor immunotherapy.

Cancer Immunol. Immunother. 56:1323/1334, 2007

Nanni P.-Nicoletti G.-Palladini A.-Crocì S.-Murgo A.-Antognoli A.-Landuzzi L.-Fabbi M.-Ferrini S.-Musiani P.-Iezzi M.-De Giovanni C.-Lollini PL.

Antimetastatic activity of a preventive cancer vaccine.

Cancer Res. 67:11037/11044, 2007

Rosso O.-Piazza T.-Bongarzone I.-Rossello A.-Mezzananza D.-Canevari S.-Orengo AM.-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(12):1246/1253, 2007

Arina A.-Murillo O.-Dubrot J.-Azpilikueta A.-Gabari I.-Perez-Gracia JL.-Alfaro C.-Berasain C.-Prieto J.-Ferrini S.-Hervas-Stubbs 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 AM.-Fabbi M.-Borghi M.-Ribatti D.-Nico B.-Carlini B.-Pistoia V.-Corrias MV.-Ferrini S.

Immunotherapy of neuroblastoma by an Interleukin-21-secreting cell vaccine involves survivin as antigen.

Cancer Immunol. Immunother. 57:1625/1634, 2008

De Toter D.-Meazza R.-Capaia M.-Fabbi M.-Azzarone B.-Balleari E.-Gobbi M.-Cutrona G.-Ferrari M.-Ferrini S.

Programmazione 2009-2011

The opposite effects of IL-15 and IL-21 on CLL B cells correlate with differential activation of the JAK/STAT and ERK1/2 pathways.

Blood 111:517/524, 2008

Giuliani M.-Giron-Michel J.-Negrini S.-Vacca P.-Durali D.-Caignard A.-Le Bousse-Kerdiles C.-Chouaib S.-Devocelle A.-Bahri R.-Durrbach A.-Taoufik Y.-Ferrini S.-Croce M.-Mingari MC.-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, 2008

Gangemi R.-Paleari L.-Orengo AM.-Cesario A.-Chessa L.-Ferrini S.-Russo P.

Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor growth and progression and drug resistance.

Curr. Med. Chem. 16:1688/1703, 2009

Khawam K.-Giron-Michel J.-Gu Y.-Perier A.-Giuliani M.-Caignard A.-Devocelle A.-Ferrini S.-Fabbi M.-Charpentier B.-Ludwig A.-Chouaib S.-Azzarone B.-Eid P.

Human renal cancer cells express a novel membrane-bound interleukin-15 that induces, in response to the soluble interleukin-15 receptor alpha chain, epithelial-to-mesenchymal transition.

Cancer Res. 69:1561/1569, 2009

Rotondo R.-Barisione G.-Mastracci L.-Grossi F.-Orengo AM.-Costa R.-Truini M.-Fabbi M.-Ferrini S.-Barbieri O.

IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer.

Int. J. Cancer 125:887/893, 2009

Studio dei meccanismi immunosoppressivi che limitano la risposta anti-tumorale indotta da vaccini cellulari in modelli preclinici e delle possibili strategie per ottenere una risposta immune efficace nei confronti del tumore

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: b - Risposta immunitaria antitumorale: interazioni cellulari, fattori solubili e recettori

Responsabile scientifico: Anna Maria Orengo

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Silvano Ferrini

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: immunosoppressione; citochine; linfociti effettori

Altre strutture IST partecipanti: Animal Facility (M. Cilli); S.C. Oncologia Medica A (P. Queirolo); S.S. Banca Biologica e Cell Factory (B. Parodi)

Altri Enti coinvolti: Università degli Studi di Bologna (P.L. Lollini); Istituto G. Gaslini, Genova (M.V. Corrias, V. Pistoia)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute; Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

Background

Le cellule tumorali producono fattori solubili che possono impedire l'instaurarsi di una efficace risposta immune o indurre un fenotipo immunosoppressivo in cellule mieloidi e linfociti o favorire il differenziamento di precursori a cellule mature a funzione soppressoria. La principale sottopopolazione di linfociti T a funzione regolatoria è rappresentata dalle Treg CD4+CD25+Foxp3+ che si sviluppano normalmente nel timo o possono essere indotte, da fattori di origine tumorale quali PGE2 e TGFbeta, a differenziare a partire da precursori CD4-CD25- circolanti. Queste cellule esprimono in superficie marcatori caratteristici quali GITR e CTLA-4 e producono IL-10 e TGFbeta, citochine a funzione immunosoppressoria. Inoltre anche i contatti cellula-cellula mediano segnali inibitori sulla risposta immune, mediante l'interazione tra TGFbeta e CTLA-4 espressi sulle membrane delle Treg con molecole espresse sulle cellule effettrici. E' stato descritto inoltre che svolgano una funzione immunosoppressiva sottopopolazioni di cellule TCD8+CD28-, Tr1, macrofagi tumore associati e cellule mieloidi soppressorie.

L'esistenza di queste diverse forme di immunosoppressione, che limita fortemente l'efficacia dei protocolli di immunoterapia, ha indotto a sperimentare l'associazione ai farmaci anti-tumorali di molecole in grado di rimuovere l'inibizione della risposta immune.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo generale del progetto consiste nel chiarire, grazie a studi preclinici in diversi modelli murini, i meccanismi immunosoppressivi che limitano la risposta anti-tumorale indotta da terapie cellulari e nello sperimentare strategie in

Programmazione 2009-2011

grado di rimuoverli, permettendo così una risposta immune efficace nei confronti del tumore. Intendiamo inoltre produrre e utilizzare in modelli preclinici nuovi "vaccini" cellulari basati su cellule tumorali modificate con i geni di citochine immunostimolanti diverse da quelle fino ad oggi utilizzate e/o molecole costimolatorie. Alternativamente ci proponiamo lo studio di sistemi di veicolazione di DNA nudo codificante per antigeni tumorali e citochine. Tali sistemi di attivazione della risposta immunitaria verranno quindi associati a strategie in grado di superare l'immunosoppressione tumore-associata, quali, ad esempio, l'utilizzo di anticorpi inattivanti specifiche sottopopolazioni cellulari (anti-CD25, anti-CD4 o anti-OX40). Infine ci proponiamo di studiare le risposte indotte nell'animale dalle terapie, al fine di valutare l'eventuale ruolo protettivo svolto dalla risposta anticorpale tramite induzione di ADCC o CDC, e quello delle risposte cellulo-mediate, attraverso l'induzione di citochine secondarie o l'attivazione del programma citolitico.

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.

Impatto assistenziale certo o potenziale

L'impatto assistenziale di questo progetto è potenziale, anche se l'eventuale attivazione di un protocollo di fase I-II di vaccinazione cellulare autologa potrebbe avvenire in tempi medio-brevi.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Abbiamo valutato l'efficacia della terapia basata sull'utilizzo di cellule di neuroblastoma N2a trasfettate con il gene della citochina immunostimolante IL-21 (N2a/IL-21) nel modello di neuroblastoma murino N2a/AJ. Tale citochina appartiene alla famiglia della IL-2 con cui condivide varie funzioni, con l'eccezione della capacità di attivare le Treg deprimendo così la risposta immune. In animali singenici affetti da micrometastasi, tre dosi di vaccino determinavano un notevole incremento del tempo di sopravvivenza, ma curavano solo il 30% degli animali. Dal momento che questa limitata efficacia del vaccino poteva dipendere dall'attività delle T regolatorie (Treg) CD4+CD25+Foxp3+ innate o indotte dal tumore, abbiamo fatto precedere all'inoculo del vaccino cellulare quello di anticorpi depletanti anti-CD25. La somministrazione del vaccino in combinazione con l'anticorpo depletante incrementa in modo modesto la percentuale di animali curati (dal 30% al 50%). Ciò può dipendere dal fatto che una piccola % di cellule Treg CD4+CD25-Foxp3+ permane (come in un altro modello murino da noi studiato di adenocarcinoma mammario TS/A) ed esercita un ruolo immunosoppressivo limitando l'efficacia del vaccino. Inoltre le cellule tumorali N2a sono in grado, come i neuroblastomi umani in stadio avanzato, di produrre TGF-beta che induce il differenziamento dei precursori Treg CD4+CD25-Foxp3- a Treg mature CD4+CD25+Foxp3+. Pertanto, per migliorare l'efficacia terapeutica proveremo una ulteriore associazione di anticorpi agonisti anti-OX40 che sono in grado di inibire le Treg. Una possibilità alternativa è rappresentata dall'utilizzo di anticorpi anti-CD4 da associare al vaccino cellulare N2a/IL-21. Ciò permetterebbe l'eliminazione completa delle Treg e la IL-21 prodotta dal vaccino potrebbe supportare la proliferazione e l'attività delle T CD8+, responsabili del rigetto, in assenza delle T CD4+ Helper. Inoltre, poiché Neuro2a esprimono oltre a TGFbeta, anche altre citochine in grado di alterare la risposta dei linfociti T, quali IL-6 e IL-10 è possibile che esse inducano un differenziamento delle cellule CD4 verso Th17 (IL-6 insieme a TGFbeta) o verso Tr1 (IL-10). Pertanto studieremo il potenziale ruolo di queste sottopopolazioni di cellule CD4 nell'alterare la risposta immune o indurre progressione nel neuroblastoma. Infine intendiamo validare questa strategia immunoterapeutica in topi transgenici per il proto-oncogene MycN, che sviluppano spontaneamente una malattia simile al neuroblastoma umano.

Infine esploreremo protocolli di vaccinazione nel modello di melanoma murino B16/topo singenico C57/BL6. Abbiamo scelto come citochina immunostimolante il GM-CSF, che è in grado di indurre la maturazione delle cellule dendritiche, a carico delle quali sono stati spesso descritti nei pazienti oncologici deficit quantitativi e funzionali, senza attivare le cellule mieloidi soppressorie. Nel vettore di espressione pcDNA3.1 utilizzato poi per trasfettare le cellule tumorali B16, oltre al gene del GM-CSF è stato inserito il motivo RGD. Il tripeptide RGD (arginina-glicina-acido aspartico) si lega all'integrina $\alpha_5\beta_3$, che è overespressa sulle cellule endoteliali durante l'angiogenesi indotta da tumori, mentre è assente sulle cellule endoteliali quiescenti e nei tessuti normali. L'espressione ristretta di $\alpha_5\beta_3$ nei tumori rende il tripeptide RGD il mezzo ideale per veicolare alla sede tumorale le molecole immunostimolanti. Inoculeremo gli animali i.v. con cellule parentali tumorigeniche e quindi li sottoporremo a vaccinazioni sequenziali con le cellule B16/GM-CSF/RGD. Studieremo quindi il tipo di risposta immune indotta dal vaccino e la sua efficacia terapeutica valutando la possibilità di incrementare quest'ultima associando strategie per contrastare l'azione dei fattori immunosoppressivi.

Track record

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

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

J. Immunol. 176:1750/1758, 2006

Daga A.-Orengo A.M.-Gangemi R.M.-Marubbi D.-Perera M.-Comes A.-Ferrini S.-Corte G.

Glioma immunotherapy by IL-21 gene-modified cells or by recombinant IL-21 involves antibody responses.

Int. J. Cancer, 121:1756/1763, 2007

De Giovanni C.-Croci S.-Nicoletti G.-Landuzzi L.-Palladini A.-Pannellini T.-Borgia L.-Iezzi M.-Di Carlo E.-Orengo A.M.-Kennedy R.C.-Lollini P.L.-Nanni P.-Musiani P.

Inhibition of prostate carcinogenesis by combined active immunoprophylaxis.

Int. J. Cancer, 121:88/94, 2007

Rosso O.-Piazza T.-Bongarzone I.-Rossello A.-Mezzanzanica D.-Canevari S.-Orengo A.M.-Puppo A.-Ferrini S.-Fabbi M.

The ALCAM shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE Is involved in motility of ovarian carcinoma cells.

Programmazione 2009-2011

Mol. Cancer Res. 5:1246/1253, 2007

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

Gangemi S.-Paleari L.-Orengo A.M.-Cesario A.-Chessa L.-Ferrini S.-Russo P. Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor growth and progression and drug resistance. Curr. Med. Chem. 16:1686/1703, 2009

Rotondo R.-Barisione G.-Mastracci L.-Grossi F.-Orengo A.M.-Costa R.-Truini M.-Fabbi M.-Ferrini S.-Barbieri O. IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in non small cell lung cancer. Int. J. Cancer 125:887/893, 2009

Disegno e sintesi di nuove molecole in grado di annullare la resistenza pleiotropica in cellule tumorali resistenti e di inibire l'MDR1 in cellule staminali derivate da tumori umani di diverso istotipo

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

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

Responsabile scientifico: Maurizio Viale

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Cinzia Aiello, Rosaria Gangemi, Anna Maria Orengo

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: diltiazem; nifedipina; multidrug resistance; attività antitumorale; doxorubicina; tumor stem cells

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Nanobioteconologie (C. Rosano); Animal Facility (E. Ognio)

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

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Compagnia di San Paolo

Background

Nonostante i progressi compiuti negli ultimi anni nella chemioterapia antitumorale i fenomeni di resistenza intrinseca o acquisita con le conseguenti ricadute di malattia rimangono uno dei principali problemi che i clinici incontrano durante il trattamento dei pazienti neoplastici. Inoltre, negli ultimi anni, analizzando l'eterogeneità del potenziale tumorigenico delle cellule tumorali, si è sviluppata l'ipotesi riguardante le cellule staminali tumorali (CST) che postula che solo una piccola frazione di cellule tumorali è caratterizzata da illimitate potenzialità proliferative asimmetriche, ovvero capaci di generare tutte le sottopopolazioni del tessuto tumorale, ed ha la responsabilità della ricrescita tumorale e del fallimento terapeutico di tanti tumori. Queste cellule sono state per molti istotipi tumorali caratterizzate dal punto di vista fenotipico e funzionale per cui oggi è possibile con varie metodiche isolarle e studiarle. Proprio da questi studi è risultato che molte di queste cellule sono caratterizzate dall'aumentata espressione di trasportatori di membrana legati alla famiglia delle "ATP-binding cassette transporters" [ABCB1 (Pgp); ABCG2 e ABCB5]] inizialmente conosciuti per essere coinvolti in molti fenomeni di resistenza pleiotropica. Questo meccanismo, ormai noto da tempo, permette la selezione di cellule tumorali resistenti ad una varietà d'agenti antitumorali non chimicamente correlati fra loro come le antracicline, gli alcaloidi della vinca, le epipodofillotossine, i taxani ed altre molecole. La resistenza nella sua forma acquisita è causata principalmente da una sovraespressione di uno o più di tre geni [ABCB1 (Pgp-170); ABCG2 e ABCB1]] che codificano per molecole di membrana che hanno funzionalmente il compito di far effluire sostanze tossiche (o, nel caso di resistenza, farmaci) dalle cellule in modo ATP-dipendente. Quindi, cellule tumorali, siano esse o meno staminali, che sovraesprimono tali molecole in modo significativo rendono impossibile l'accumulo di adeguate quantità citotossiche di farmaco antitumorale, rendendone così vanificata l'attività.

Attualmente si pensa sia possibile attraverso sistemi diversi rendere le CST più sensibili all'azione dei farmaci antitumorali, in particolare proprio utilizzando molecole che siano in grado di inibire l'attività dei trasportatori di membrana così da facilitare l'accumulo di farmaci antitumorali altrimenti esclusi dalle cellule. Tale procedura è del tutto sovrapponibile a quella utilizzata per inibire la Pgp (ABCB1) nei tumori con resistenza acquisita. Ed è proprio su questa base che molte sostanze chimiche nuove o già utilizzate come farmaci vengono studiate per annullare i fenomeni di resistenza pleiotropica, ma sebbene alcune di esse si siano dimostrate attive nei saggi preclinici in vitro ed in vivo, una volta entrate in sperimentazione clinica hanno mostrato forti limitazioni dovute al loro scarso effetto, alla loro tossicità intrinseca e a interazioni farmacocinetiche negative con i farmaci antitumorali somministrati in associazione.

Programmazione 2009-2011

Negli ultimi anni parte del nostro lavoro di ricerca si è concentrato sulla sintesi e valutazione farmacologica come inibitori della Pgp-170 di sostanze chimiche nuove derivate da farmaci inibitori dei canali del Ca^{++} come il diltiazem e la nifedipina. Ciò ha portato alla selezione di alcune di queste molecole caratterizzate da una buona attività nel inibire l'attività della Pgp-170 e capacità di contrastare i fenomeni di resistenza pleiotropica in modelli cellulari in vitro.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo finale di questo progetto consiste quindi nella selezione di un numero significativo di molecole in grado di inibire la resistenza pleiotropica intrinseca o acquisita in modelli sperimentali in vitro ed in vivo in tumori murini e/o umani resistenti impiantati eterotopicamente e/o ortotopicamente nel topo.

Gli obiettivi secondari di questo progetto consistono:

- 1) nella selezione e nella valutazione in vitro ed in vivo di una o più molecole capaci di co-inibire il trasportatore di membrana ABCG2 e nell'identificazione di trattamenti in associazione con linfocine ad attività antitumorale attivi su CTS originate da tumori di istotipo diverso;
- 2) nella definizione di un modello in silico capace predire l'attività delle molecole e di definirne modifiche strutturali capaci di migliorarne l'attività farmacologia eventualmente riducendone l'impatto tossicologico.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Essendo un progetto di natura sostanzialmente preclinica l'impatto assistenziale andrà comunque considerato potenziale e a medio-lungo termine. Questa ricerca offre la possibilità di definire strutture molecolari efficaci nell'inibire la resistenza pleiotropica e di migliorarle attraverso un'attenta analisi eseguita con i metodi del "drug-design". Accanto a questa possibilità va anche considerata l'opportunità di coinvolgere industrie farmaceutiche nello sviluppo di quelle molecole che dovessero dimostrarsi particolarmente interessanti.

Descrizione delle attività 2009-2011, con dettaglio delle attività e dei risultati attesi nel primo anno

Il presente progetto si prefigge in primis la sintesi e l'analisi d'ulteriori "derivati" diidropiridinici dei due farmaci cardioprotettori. Utilizzando poi tecniche di "drug-design" applicate alle molecole attive già selezionate in precedenza si cercherà di ottenere nuovi derivati maggiormente attivi nell'inibizione della Pgp-170 che saranno valutati mediante tecniche di biologia cellulare, citofluorimetriche, microscopiche e biochimiche. A conclusione di questo processo le sostanze più promettenti saranno valutate in opportuni modelli in vivo per verificarne l'effettiva attività preclinica.

Parallelamente le molecole selezionate in vitro saranno analizzate anche come inibitori del trasportatore di membrana ABCG2, descritto in molte CST come marcatore funzionalmente attivo, in opportuni modelli cellulari allo scopo di studiarne eventuali cross-inibizioni e con l'intenzione di valutare le molecole attive in successivi modelli di screening in vitro ed in vivo su CST derivate dal melanoma e/o tumori della mammella e/o tumori polmonari in associazione o meno con citochine ad attività antitumorale come le IL-12, IL-18, IL-15 e IL-21. Ciò allo scopo di identificare possibili procedure terapeutiche in grado di rendere possibile l'eliminazione delle CTS in corso di chemioterapia antitumorale.

Attività previste nel primo anno:

- Sintesi e valutazione in vitro mediante saggi MTT, citofluorimetrici e microscopici di nuovi derivati del diltiazem e della nifedipina e di nuove composti frutto delle tecniche del "drug-design" applicate ai composti precedentemente sintetizzati e risultati positivi alla valutazione farmacologia in vitro.

- Analisi in vitro in un modello di cellula con resistenza pleiotropica dovuta alla sovraespressione di ABCG2 dei composti selezionati al punto precedente.

Risultati attesi:

- Ottenimento di 1-3 molecole inibitorie della Pgp-170 e/o della ABCG2.

Attività previste nel secondo e terzo anno:

Si continuerà con la selezione e valutazione in vitro dei nuovi derivati via via sintetizzati dall'Unità di chimica e si attiverà l'analisi tossicologica e di attività farmacologica in modelli murini di tumori resistenti umani e/o murini delle molecole selezionate.

Analogamente si continuerà con la valutazione in vitro delle molecole attive via via selezionate nel modello di resistenza pleiotropica ABCG2. Alla fine di questo processo le molecole più attive saranno valutate in modelli murini in vivo d'impianto di cellule staminali di diversa origine istologica (melanoma, carcinoma della mammella, carcinoma polmonare).

Track record

Budriesi R.-Cosimelli B.-Ioan P.-Lanza CZ.-Spinelli D.-Chiarini A.

Cardiovascular characterization of [1,4]thiazino[3,4-c][1,2,4]oxadiazol-1-one derivatives: Selective myocardial calcium channel modulators.

J. Med. Chem. 45: 3475/3481, 2002

Gangemi RM.-Daga A.-Muzio L.-Marubbi D.-Cocozza S.-Perera M.-Verardo S.-Bordo D.-Griffero F.-Capra MC.-Mallamaci A.-Corte G.

Effects of Emx2 inactivation on the gene expression profile of neural precursors.

Eur. J. Neurosci. 23:325/334, 2006

Budriesi R.-Cosimelli B.-Ioan P.-Ugenti MP.-Carosati E.-Frosini M.-Fusi F.-Spisani R.-Saponara S.-Cruciani G.-Novellino E.-Spinelli D.-Chiarini A.

L-Type calcium channel blockers: from diltiazem to 1,2,4-oxadiazol-5-ones via thiazinooxadiazol-3-one derivatives.

J. Med. Chem. 52:2352/2362, 2009

Gangemi RM.-Griffero F.-Marubbi D.-Perera M.-Capra MC.-Malatesta P.-Ravetti GL.-Zona GL.-Daga A.-Corte G.

Programmazione 2009-2011

SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. Stem Cells 27: 40/48, 2009

Gangemi R.-Paleari L.-Orengo AM.-Cesario A.-Chessa L.-Ferrini S.-Russo P.
Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor growth and progression and drug resistance. Curr. Med. Chem. 16:1688/1703, 2009

Viale M.-Cordazzo C.-Cosimelli B.-de Toterò D.-Castagnola P.-Aiello C.-Severi E.-Petrillo G.-Budriesi R.-Cianfriglia M.-Spinelli D.
Inhibition of MDR1 activity in vitro by a novel class of diltiazem analogues: towards new candidates. J. Med. Chem. 52:259/266, 2009

Viale M.-de Toterò D.-Cordazzo C.-Castagnola P.-Rosano C.-Aiello C.-Croce M.-Leoni A.-Russo P.-Spinelli D.
Inhibition of MDR1 activity and induction of apoptosis by analogues of nifedipine and diltiazem: an in vitro study. Biochem. Pharmacol., submitted

Studi farmacodinamici e farmacocinetici per valutare l'applicabilità terapeutica di nuove associazioni farmacologiche, di nuove sostanze ad attività antitumorale e di nuovi trasportatori macromolecolari e nanotecnologici di farmaci antitumorali

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

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

Responsabile scientifico: Maurizio Viale

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Cinzia Aiello, Michela Croce

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: derivati dinitrobutadienici; derivati pirazolici; nanoparticelle; attività antitumorale; farmaci antiaritmici; anestetici locali

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Nanobiotecnologie (C. Rosano); Animal Facility (E. Ognio); S.C. Trasferimento Genico (D. de Toterò)

Altri Enti coinvolti: Dip. di Biologia Animale, Università di Pavia (C. Fenoglio); Dip. di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Bari (M.A. Mariggio); Dip. di Chimica Organica A. Mangini, Università di Bologna (D. Spinelli); Dip. Di Chimica e Chimica Industriale, Università di Genova (G. Petrillo, S. Thea); Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova (A. Balbi, C. Macciò); Dip. di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche, Università di Genova (S. Cafaggi); Dip. di Scienze del Farmaco, Università G. d'Annunzio, Chieti (A. Fontana, C. Gasbarri)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: MIUR

Background

Sia la validazione preclinica di nuovi schemi terapeutici e di nuove formulazioni di farmaci già nell'uso clinico, sia la definizione di nuove molecole a potenziale attività antitumorale rappresenta un ovvio quanto obbligato passaggio mirato al miglioramento delle strategie terapeutiche in campo oncologico.

Da molti anni il nostro laboratorio è impegnato in questo tipo di ricerca preclinica volta sostanzialmente al miglioramento dell'indice terapeutico di farmaci antitumorali già impiegati in clinica e alla scoperta di nuove entità molecolari capaci di svolgere attività antitumorale caratterizzata da nuove specificità, minore tossicità (migliore indice terapeutico rispetto a quelli dei classici farmaci antitumorali) e capacità di sfuggire ai meccanismi di resistenza farmacologica siano essi specifici che di tipo pleiotropico.

Su queste basi abbiamo iniziato a studiare le caratteristiche farmacologiche di nuove sostanze appartenenti alle categorie dei composti nitrobutadienici e 1,5-pirazolici (e isomeri 1,3-pirazoli) e di nuove formulazioni del cisplatino su base nanotecnologica con risultati in parte preliminari ed in parte ormai consolidati estremamente incoraggianti.

L'1,4-bis(1-naphthyl)-2,3-dinitro-1,3-butadiene (Naph-DNB), molecola sintetizzata a partire dal 2,3-dinitro-1,3-butadiene, è dotato della capacità di inibire la proliferazione cellulare e di indurre apoptosi tramite l'attivazione della p53. Da questa molecola sono state derivate per sintesi chimica due altre molecole attive l'1,4-bis(2-naphthyl)-2,3-dinitro-1,3-butadiene (2-Naph-DNB), capace di legarsi anche ai microtubuli, e l'1-methoxycarbonyl-1-methylthio-3-nitro-4-(1-naphthyl)-2,3-butadiene (1-Naph-NMGB) dotato di un'attività in vitro e in vivo maggiore rispetto agli altri due composti. Dal punto di vista meccanicistico tutte e tre le molecole sono in grado di legarsi, sebbene in modo diverso, al DNA che quindi potrebbe rappresentare uno dei bersagli molecolari di queste molecole (oltre ai microtubuli per il 2-Naph-DNB). L'uso di queste molecole è peraltro problematico a causa della loro scarsa solubilità. Nell'insieme

Programmazione 2009-2011

esse rappresentano veri e propri "lead compounds" sui quali poter effettuare opportune variazioni della struttura (anche in rapporto alle indicazioni dell'analisi "docking") in modo da migliorarne sia le caratteristiche farmacotossicologiche che la solubilità in mezzi acquosi. Quest'ultimo obiettivo potrebbe essere ottenuto grazie all'inserimento delle molecole in trasportatori macromolecolari come le ciclodestrine e i liposomi in grado sia di migliorarne la solubilità e quindi la somministrazione sia il "targeting", quest'ultimo fortemente legato alle proprietà fisiche di questi complessi macromolecolari.

Per quanto riguarda invece i composti 1,5-pirazoli e isomeri 1,3-pirazoli N-sostituiti essi ricoprono ruoli essenziali in numerosi composti farmaceutici come gli analgesici, gli antiinfiammatori, gli antibatterici, gli agenti antiangiogenetici e gli inibitori della CDK2/CiclinaA. Essi sono ampiamente studiati anche come chemioterapici antitumorali ed è in questa veste che saranno analizzati in questo progetto sulla base di modificazioni sintetiche del loro residuo eterociclico, modificazioni capaci di modificarne profondamente l'attività biologica generale. Delle nuove molecole via via sintetizzate dal DISCIFAR verranno analizzate le proprietà antiproliferative, citotossiche, apoptotiche e di induzione dei marcatori molecolari legati a questo fenomeno di morte cellulare. Una volta selezionate in vitro alcune molecole attive esse saranno avviate alla valutazione preclinica in vivo con saggi tossicologici e di attività farmacologia valutata in modelli tumorali murini o umani trapiantati in topi immunodeficienti.

Com'è noto il cisplatino è uno dei farmaci antitumorali classici più efficaci ed utilizzati nei confronti d'alcune patologie oncologiche quali le ovariche, le testicolari e del distretto cervico-cefalico. Peraltro, la sua elevata tossicità nei confronti del rene, dell'orecchio interno e del sistema nervoso periferico rendono difficile la gestione del paziente trattato. Abbiamo già dimostrato che farmaci non antitumorali come la procainamide e la procaina sono in grado di aumentare l'indice terapeutico del cisplatino grazie all'azione combinata del potenziamento dell'attività antitumorale e la riduzione dell'effetto tossico di questo farmaco, dimostrando inoltre che tali azioni sono legate sia a meccanismi di tipo farmacocinetico che a meccanismi più strettamente farmacodinamici.

In questo progetto raccoglieremo dati preclinici in vitro ed in vivo riguardanti i meccanismi attraverso cui i fenomeni di potenziamento si realizzano soprattutto per quanto riguarda il potenziamento dell'attività apoptotica del cisplatino.

Infine, allo scopo di migliorare l'indice terapeutico del cisplatino mediante variazioni delle sue caratteristiche farmacocinetiche e/o farmacodinamiche valuteremo poi nuove formulazioni di natura nanotecnologica basate sulla sintesi di nanoparticelle contenenti chitosano a diverso grado di metilazione, alginati e acido ialuronico a diverso peso molecolare. Le diverse combinazioni a livello di sintesi di nanoparticelle permetteranno di selezionare i "carrier" più attivi sia in vitro che in vivo e con caratteristiche antiproliferative, apoptotiche, di tossicità ed attività antitumorale ben definite. Accanto a queste nanoparticelle contenenti cisplatino inizieremo la sintesi di prodotti nanotecnologici basati sulla tecnologia delle nanogabbie d'oro. Quest'argomento piuttosto recente offre spunti molto interessanti per la ricerca preclinica essendo queste particelle in grado di veicolare farmaci, sistemi di riconoscimento cellulare e, soprattutto, di essere in grado di convertire lunghezze d'onda vicine all'infrarosso in emissione localizzata di calore e produzione di temperature in grado di uccidere le cellule. Analizzeremo quindi parametri come l'inibizione della proliferazione cellulare, l'induzione di apoptosi e dei geni ad essa correlati, l'attività in vivo per quelle particelle attive nei saggi in vitro ed i fenomeni di sinergismo fra l'attività fototermica e quella dovuta ai farmaci trasportati.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo generale di questo progetto consiste:

- nella selezione di nuove molecole e/o di nuovi sistemi di veicolazione dei farmaci che abbiano buoni requisiti in termini d'attività antitumorale, meccanismi d'azione nuovi ed originali, selettività e superamento delle barriere di resistenza
- nel raccogliere dati preclinici in vivo sulla protezione dai principali effetti tossici del cisplatino e dati preclinici in vitro ed in vivo riguardanti i meccanismi attraverso cui i fenomeni di potenziamento si realizzano, così da mettere a punto un protocollo di associazione fra cisplatino e procainamide (e/o procaina) che possa essere proposto per l'applicazione in sicurezza nell'uomo.

Obiettivi secondari:

- definizione del meccanismo d'azione delle molecole attive
- valutazione della sovra- o sottoespressione di geni specifici coinvolti nei processi di apoptosi
- valutazione mediante analisi "docking" dell'interazione delle molecole attive con specifici bersagli molecolari
- "drug design" di nuove molecole con caratteristiche migliorate rispetto ai "lead compound"
- valutazione in vivo della tossicità tissutale e dell'attività antitumorale dei derivati nitrobutadienici e pirazolici attivi in vitro
- valutazione dell'attività in vivo e della farmacocinetica plasmatica e tissutale del cisplatino dopo somministrazione di nanoparticelle caricate con questo farmaco
- analisi in vivo dell'attività apoptotica del cisplatino dopo co-somministrazione con procainamide/procaina

Impatto assistenziale certo o potenziale

Sebbene di natura prettamente preclinica il progetto può considerarsi, per taluni suoi aspetti, come ad esempio quelli relativi agli studi sul miglioramento dell'indice terapeutico del cisplatino grazie all'associazione con farmaci come la procainamide e la procaina, con un impatto assistenziale potenziale a medio termine grazie al fatto che le molecole coinvolte sono già ampiamente utilizzate in clinica e potrebbero agevolmente essere introdotte in studi clinici disegnati ad hoc.

Per quanto riguarda l'insieme delle sperimentazioni che riguardano nuove molecole e/o nuove formulazioni l'applicabilità risulta evidentemente a più lungo termine e l'impatto assistenziale certamente potenziale.

Accanto all'impatto assistenziale va inoltre considerata l'opportunità di coinvolgere industrie farmaceutiche nello sviluppo di quelle molecole e/o sistemi di veicolazione farmacologia che dovessero dimostrarsi particolarmente attivi.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Attività del primo anno:

- Sintesi e valutazione in vitro mediante saggi MTT, biochimici, citofluorimetrici e microscopici ed in vivo di: a) nuovi derivati dei "lead compound" 1-Naph-DNB, 2-Naph-DNB e 1-Naph-NMCB; b) nuovi derivati eterociclici pirazolici; c)

Programmazione 2009-2011

nuovi trasportatori macromolecolari e nanotecnologici in grado di migliorare la farmacocinetica e/o la farmacodinamica del cisplatino e delle nuove molecole sintetizzate di natura nitrobutadienica.

Risultati attesi:

- Ottenimento di almeno 2-4 fra le nuove molecole dinitrobutadieniche e pirazoliche con attività antiproliferativa significativa;
- ottenimento di 1-3 nuovi trasportatori macromolecolari con migliorate caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche rispetto ai singoli farmaci/molecole trasportati.

Attività del secondo e terzo anno:

Si continuerà con la selezione e valutazione *in vitro* ed *in vivo* dei nuovi derivati pirazolici e dinitrobutadienici via via sintetizzati dagli enti coinvolti dell'Università di Genova (DCCI e DISCIFAR) e si attiverà l'analisi tossicologica e d'attività farmacologica in modelli murini per ciò che riguarda i composti dimostratisi attivi nei test *in vitro*.

Track record

Balbi A.-Anzaldi M.-Mazzei M.-Miele M.-Bertolotto M.-Ottonello L.-Dallegrì F.

Synthesis and biological evaluation of novel heterocyclic ionone-like derivatives as anti-inflammatory agents.

Bioorg. Med. Chem. 14:5152/5160, 2006

Ognio E.-Chiavarina B.-Peterka M.- Mariggiò MA.-Viale M.

Study of feasibility of the treatment with procainamide hydrochloride and cisplatin in pregnant mice.

Chem. Biol. Interact. 164:232/240, 2006

Cafaggi S.-Russo E.-R. Stefani.-R. Leardi.-Caviglioli G.-B.-Parodi.-Bignardi G.-De Toterò 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.-Mariggiò MA.-Taccagno M.-Moranti S.-Viale M.

Naphthylnitrobutadienes as pharmacologically-active molecules: evaluation of the *in vivo* antitumour activity.

Invest. New Drugs 25:535/544, 2007

Petrillo G.-Mariggiò MA.-Fenoglio C.-Aiello C.-Cordazzo C.-Morganti S.-Rizzato E.-Spinelli D.-Maccagno M.-Bianchi L.-Prevosto C.-Viale M.

Design, synthesis and *in vitro* evaluation of new naphthylnitrobutadienes with potential antiproliferative activity: towards a structure/activity relationship.

Bioorg. Med. Chem. 16:240/247, 2007

Viale M.-Petrillo G.-Aiello C.-Fenoglio C.-Codazzo C.-Mariggiò MA.-Cassano A.-Prevosto C.-Ognio E.-Vaccarone R.-Spinelli D.

Synthesis, activity *in vitro* and toxicity *in vivo* of the new 1-naphthyl-2-nitrobutadiene derivative 1,4-bis(2-naphthyl)-2,3-dinitro-1,3-butadiene.

Pharmacol. Res. 56:318/328, 2007

Fenoglio C.-Grosso A.-Boncompagni E.-Aiello C.-Cordazzo C.-Petrillo G.-Spinelli D.-Ognio E.-Mariggiò MA.-Viale M.

A histochemical approach to evaluate the *in vivo* cytotoxicity of nitrobutadiene compounds (1*E*,3*E*)-1,4-bis(1-naphthyl)-2,3-dinitro-1,3-butadiene and (1*E*,3*E*)-1,4-Bis(4-carboxy-1-naphthyl)-2,3-dinitro-1,3-butadiene in mice kidney and liver.

Anticancer Res. 28:813/823, 2008

Viale M.-Petrillo G.-Maccagno M.-Castagnola P.-Aiello C.-Cordazzo C.-Mariggiò MA.-Jadhav SA.-Bianchi L.-Leto G.-Rizzato E.-Poggi A.-Spinelli D.

Sensitivity of different resistant tumour cell lines to the two novel compounds (2*Z*,4*E*)-2-methylsulfanyl-5-(1-naphthyl)-4-nitro-2,4-pentadienoate and (1*E*,3*E*)-1,4-bis(2-naphthyl)-2,3-dinitro-1,3-butadiene

Eur. J. Pharmacol. 588:47/51, 2008

Anzaldi M.-Macciò C.-Mazzei M.-Bertolotto M.-Ottonello L.-Dallegrì F.-Balbi A.

Antiproliferative and proapoptotic activities of a new class of pyrazole derivatives in HL-60 cells.

Chem. Biol., 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.

J. Control. Release, submitted

Demartin A.-Alloisio M.-Cuniberti C.-Dellepiane G.- Jadhav SA.-Thea S.-Giorgetti E.-Gellini C.-Muniz-Mirand M.

Polydiacetylene functionalized noble metal nanocages.

J. Physical. Chemistry C, submitted

Capitolo 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. Vol. 11, A cura di: Attanasi O, Spinelli D.

Società Chimica Italiana, Roma, 2007

Programmazione 2009-2011

Relazioni a congressi

Alloisio M.-Demartini A.-Cuniberti C.-Dellepiane G.-Jadhav SA,-Petrillo G.-Thea S.-Giorgetti E.-Muniz-Miranda M.
Noble metal-organic nanohybrids for chemical sensing: synthesis and characterization.
E-MRS, abs, Strasburgo, 8-12 giugno 2009