

S.S. Sviluppo di terapie innovative

Personalizzazione dei trattamenti in donne con carcinoma mammario iperesprimente HER2

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

Programma: b - Predizione della risposta ai trattamenti, inclusa la possibilità di valutare precocemente la risposta definitiva

Responsabile scientifico: Lucia Del Mastro

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: trastuzumab; carcinoma mammario; herceptin

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Oncologia medica A (C., P. Taveggia, A. Levaggi, S. Giraudi, S. Pastorino, A. Abate); S.C. Anatomia e citoistologia patologica (M. Truini, F. Carli); S.C. Genetica ed epigenetica dei tumori (M.O. Vannozzi, G. Lunardi, M. Romani)

Altri Enti coinvolti: Università di Genova (T. Florio)

Tipologia progetto: clinico epidemiologica sperimentale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Background

Trastuzumab, è stato il primo farmaco in grado di interagire con il recettore tirosino-chinasico HER2, essendo un anticorpo monoclonale umanizzato che riconosce epitopi presenti nel suo dominio extracellulare (ECD). Il farmaco, che rappresenta una pietra miliare nel trattamento dei tumori mammari iperesprimenti HER2, inibisce la crescita delle cellule tumorali sia in vivo che in vitro.

Tuttavia, uno dei problemi clinici più importanti nella terapia con trastuzumab rimane la resistenza al farmaco che può essere primaria o acquisita (indotta dal trattamento).

Nella terapia neo-adiuvante e del tumore metastatico, la resistenza primaria al trastuzumab, varia dal 66% al 88% come singolo agente, e dal 20% al 50% nel caso di terapia combinata. Inoltre, molte pazienti con tumore metastatico della mammella che rispondono inizialmente alla terapia con trastuzumab, hanno poi una progressione di malattia entro un anno.

Anche in terapia adiuvante è stato dimostrato che il trastuzumab, somministrato insieme o successivamente alla chemioterapia, aumenta la sopravvivenza totale e la sopravvivenza libera da malattia. Tuttavia, circa il 15% delle donne che hanno ricevuto il trastuzumab in terapia adiuvante sviluppano metastasi.

Risulta quindi importante delucidare i meccanismi alla base delle resistenze primaria o acquisita a questo farmaco al fine di migliorare la sopravvivenza di pazienti con tumori che iperesprimono HER2.

Sono stati proposti diversi meccanismi molecolari che potrebbero essere alla base della resistenza al trastuzumab. Alcuni di questi coinvolgono proteine associate ai meccanismi di proliferazione attivati da HER2 come PTEN, Akt o P27kip1; altri invece coinvolgono altri tipi di recettori sia della famiglia HER (HER1 e HER3) sia di altre famiglie (IGF-IR, c-Met). Infine sono stati proposti meccanismi di resistenza legati alla presenza di una forma intracellulare troncata del recettore (p95) che, anche in assenza dell'ECD, manterrebbe l'attività di stimolo alla proliferazione cellulare del recettore.

I tumori mammari resistenti al trastuzumab potrebbero richiedere l'utilizzo di terapie alternative o addizionali in grado di bloccare il recettore HER2. Di conseguenza una precoce individuazione di fattori predittivi la resistenza al trastuzumab sarebbe molto utile per decidere il trattamento migliore.

È stato riportato che le caratteristiche biologiche delle metastasi possono essere diverse rispetto a quelle del tumore primitivo. In particolare tumori HER2 negativi alla diagnosi potrebbero diventare HER2 positivi in fase metastatica e viceversa. Dal momento che la modifica dello stato di HER2 può comportare una importante modifica del tipo di trattamento, l'attuale orientamento clinico prevede ove possibile il prelievo biotipico delle metastasi per rivalutare lo stato di HER2. Dal momento che non tutti i siti metastatici possono essere facilmente sottoposti a biopsia, si pone la necessità di test rapidi che non necessino del prelievo biotipico per valutare lo stato di HER2 sulle metastasi.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Valutare l'importanza clinica di fattori predittivi la resistenza al trastuzumab ed in particolare:

- la presenza della forma troncata del recettore HER2 (p95): questa proteina corrisponde alla parte citoplasmatica del recettore privo dell'ECD (bersaglio del trastuzumab). p95 manterrebbe un'attività tirosino chinasi costitutiva con continui stimoli di crescita e di sopravvivenza alle cellule tumorali anche in presenza di trastuzumab
- la presenza di peptidasi ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) responsabili del taglio di diversi ligandi per i recettori HER e degli stessi recettori con la formazione di recettori solubili e tirosino chinasi intracellulari attive
- la presenza di recettori HER3 che possono formare eterodimeri con il recettore HER2 e la cui simultanea iperespressione è stata valutata nel 12-50% dei tumori mammari invasivi e sembra anche determinare resistenza alla terapia con trastuzumab
- assenza della proteina PTEN, fattore di regolazione importante in grado di inibire la cascata di eventi attivati da HER2 la cui mancanza sembra essere correlata alla resistenza al trastuzumab

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

- la presenza di recettori IGF-I la cui attività stimola la stessa cascata di eventi indotta da HER2 e le cui interazioni con HER2 contribuiscono alla resistenza al trastuzumab
- identificazione dello stato di amplificazione di HER2 nel DNA tumorale circolante.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Con la presente ricerca ci si propone di individuare i fattori predittivi la risposta al trastuzumab in pazienti con carcinoma mammario iperesprimente il recettore HER2. La possibilità di predire la risposta permetterebbe una precoce personalizzazione della terapia con conseguenti benefici terapeutici. Nel caso infatti di soggetti a rischio di resistenza potrebbero essere utilizzate terapie diverse anti HER2 (es. inibitori della tirosina chinasi HER2) o terapie in grado di interagire con i meccanismi determinanti la resistenza.

L'identificazione dello stato di amplificazione di HER2 sul DNA circolante permetterebbe di evitare i prelievi biotici e di avere l'informazione anche nei casi in cui la sede di metastasi non è suscettibile di prelievo biotico

Risultati e prodotti 2009

Nel corso del 2009 l'attività di ricerca si è concentrata sui seguenti punti:

1. Valutazione della presenza di peptidasi ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease), responsabili del taglio di diversi ligandi per i recettori HER e degli stessi recettori con la formazione di recettori solubili e tirosino-chinasi intracellulari.
2. Valutazione della presenza dei recettori IGF-I la cui attività stimola la stessa cascata di eventi indotta da HER2 e le cui interazioni con HER2 contribuiscono alla resistenza al Trastuzumab.

Sono stati selezionati i campioni paraffinati di tumore HER2 positivi provenienti da 15 casi di pazienti trattate con uno stesso regime di chemioterapia neo-adiuvante e 5 casi di pazienti trattate per malattia metastatica nell'ambito di uno studio di fase II. Su tali tessuti è in corso la valutazione dell'espressione sia di ADAM-10 che di ADAM-17, sia come proteine (con metodo immunostochimico) che come RNA (con metodo Real-Time PCR). Su questi stessi tessuti è in corso la valutazione dell'espressione di IGF-IR e IGF binding protein 2 (IGFBP-2), attraverso metodo immunostochimico.

3. Identificazione dello stato di amplificazione di HER2 nel DNA tumorale circolante.

Nel corso del 2009 è stata effettuata la correlazione, su 40 tessuti di carcinoma mammario, tra la valutazione dello stato di HER2 effettuata con metodo di PCR quantitativa, e le metodiche standard rappresentate da Herceptest e FISH. La correlazione ha evidenziato una concordanza di risultati nel 90% dei casi. Sono stati raccolti campioni di 10 pazienti ed in 7 pazienti è in corso la valutazione dello stato di HER2 su DNA circolante. Su questi stessi campioni viene effettuata determinazione del polimorfismo dei geni FcgammaRII e III e l'entità della reazione di citotossicità anticorpo dipendente (ADCC) mediata da cellule NK.

Sono infine stati analizzati i risultati ottenuti in fase neo-adiuvante con l'utilizzo di uno schema di chemioterapia che prevede la somministrazione di Trastuzumab in combinazione con taxolo settimanale e non con antracicline. Il risultato particolarmente sorprendente (90% di risposte complete patologiche) ha portato al disegno di uno studio di fase II con l'utilizzo di tale schema e di uno studio di fase II per effettuare chirurgia maggiormente conservativa (mastectomia nipple-sparing) nelle pazienti con risposta completa ma candidate comunque a mastectomia radicale.

Pubblicazioni

Banelli B.-Casciano I.-Di Vinci A.-Gatteschi B.-Levaggi A.-Carli F.-Bighin C.-Salvi S.-Allemanni G.-Ghiorzo P.-Pronzato P.-Venturini M.-Romani M.-Del Mastro L.

Pathological and molecular characteristics distinguishing contralateral metastatic from new primary breast cancer
Ann. Oncol. Epub Oct 29, 2009

BIG 1/98 Collaborative Group-Mouridsen H.-Giobbie Hurder A.- Goldhirsch A.-Thurlimann B.-Paridaens R.-Smith I.-Mauriac L.- Forbes J.-Price K.-Regan M.-Gelber R.-Coates A.-Rosso R.-Del Mastro L.-Bighin C.

Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer.
N. Engl. J. Med. 361(8):766-776, 2009

Giobbie Hurder A.-Price K.-Gelber R.-International Breast Cancer Study Group BIG 1/98 Collaborative Group-Rosso R.-Del Mastro L.- Bighin C.

Design, conduct, and analyses of Breast International Group (BIG) 1-98: a randomized, double-blind, phase-III study comparing letrozole and tamoxifen as adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women with receptor-positive, early breast cancer.

Clin. Trials 6(3):272-287, 2009

Montemurro F.-Aglietta M.-Del Mastro L.

Aromatase inhibitors as adjuvant therapy for breast cancer.
J. Clin. Oncol. 20;27(15):2566-2567, 2009

Montemurro F.-Del Mastro L.-Aglietta M.

Reply to A. Sánchez-Muñoz et al.
J. Clin. Oncol. Epub Dec 10, 2009

Rabaglio M.-Sun Z.-Price K.-Castiglione Gertsch M.-Hawle H.- Thurlimann B.-Mouridsen H.-Campone M.-Forbes J.-Paridaens R.- Colleoni M.-Pienkowski T.-Nogaret J.-Lang I.-Smith I.-Gelber R.- Goldhirsch A.-Coates A.-BIG 1/98 Collaborative International Breast Cancer Study Groups-Rosso R.-Del Mastro L.-Bighin C.

Bone fractures among postmenopausal patients with endocrine-responsive early breast cancer treated with 5 years of letrozole or tamoxifen in the BIG 1-98 trial.

Ann. Oncol. 20(9):1489-1498, 2009

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Venturini M.-Bighin C.-Puglisi F.-Olmeo N.-Aitini E.-Colucci G.-Garrone O.-Paccagnella A.- Morabito A.-Dozin B.-Salvi S.-Pasciucco G.-Balbi G.-Laurent S.-Pastorino S.-Carli F.-Truini M.-Bruzzi P.-Del Mastro L.-Pistillo M.P.

Analysis and clinical relevance of human leukocyte antigen class I, heavy chain, and beta2-microglobulin downregulation in breast cancer.

Hum. Immunol. 70(7):492-495, 2009

Marini G.-Crinò L.-Mansutti M.-Djazouli K.-Barbato A.-Del Mastro L.

A multicenter phase II study of non-pegylated liposomal doxorubicin in combination with trastuzumab and docetaxel as first-line therapy in metastatic breast cancer.

The Breast, in press

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Proseguire la valutazione dell'espressione di ADAM7, ADAM10, IGFIR e IGFBP-2 sino a raggiungere un numero di casi pari a 40. Proseguire raccolta dei campioni per valutare stato di amplificazione di HER2 su DNA tumorale circolante, polimorfismi dei geni FcgammaR II e III e reazione ADCC, sino a raggiungere un numero di campioni pari a 25. Correlazione preliminare con i risultati clinici ottenuti in termini di risposte patologiche, risposte cliniche, tempo libero da progressione. Iniziare il reclutamento nello studio di fase II di chemioterapia neoadiuvante all'interno dell'IST ed estensione dello stesso studio ad altri 3 centri italiani. Proseguire il reclutamento nello studio di fase II basato sull'utilizzo della mastectomia nipple sparing nelle pazienti che ottengono risposta clinico-strumentale completa.

Gravidanza e preservazione della fertilità in donne affette da carcinoma mammario: percorsi diagnostico-terapeutici su base regionale e ricerca applicata

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

Programma: d - Assistenza ai pazienti neoplastici: aspetti clinici e gestionali

Responsabile scientifico: Lucia Del Mastro

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: carcinoma mammario; fertilità; gravidanza

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Oncologia medica A (C. Bighin, P. Taveggia, A. Levaggi, S. Giraudi, A. Abate, S. Pastorino); S.S. Senologia chirurgica avanzata (G. Canavese, C. Vecchio, A. Catturich); S.C. Diagnostica per immagini (C. Neumaier, G. Rescinito, F. Monetti); S.C. Senologia diagnostica

Altri Enti coinvolti: Dipartimento Ostetrico Neonatale, Istituto G. Gaslini, Genova (P. Venturini); Centro di Fisiopatologia della Riproduzione Umana, A.O.U. San Martino, Genova (P. Anserini)

Tipologia progetto: gestionale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Fondazione Rotary, Genova; Regione Liguria

Background

La gestione delle donne con diagnosi di carcinoma mammario, presenta due problematiche che per essere affrontate adeguatamente necessitano di un approccio multidisciplinare e di un percorso diagnostico terapeutico predefinito. Queste 2 situazioni sono rappresentate dalla problematica della diagnosi di carcinoma mammario in corso di gravidanza e dall'esigenza di preservazione della funzione ovarica in donne giovani candidate a chemioterapia.

1. Diagnosi di carcinoma mammario durante gravidanza.

Si tratta di una situazione clinica che necessita di una gestione multidisciplinare con competenze altamente specializzate. Tale condizione è poco frequente, verificandosi in 1 caso ogni 3000 gravidanze, ma è destinata a diventare più frequente, in considerazione dell'aumentata incidenza di carcinoma mammario in funzione dell'età e dello spostamento in avanti dell'età in cui le donne vanno incontro a gravidanza. Per tale condizione clinica è necessario un percorso diagnostico-terapeutico diverso rispetto agli altri casi di carcinoma mammario. Sia le procedure diagnostiche che i trattamenti possono avere effetti sul feto che necessitano di specifico monitoraggio.

2. Preservazione della funzione ovarica in donne candidate a chemioterapia.

Ogni anno in Liguria si registrano circa 1.230 nuovi casi di carcinoma mammario. Il 4% di questi casi, pari quindi ad un totale di 600, si verifica in donne al di sotto dei 40 anni. In questo gruppo di donne, la giovane età determina quasi sempre l'indicazione ad effettuare una chemioterapia adiuvante dopo la chirurgia. Uno degli effetti collaterali della chemioterapia maggiormente temuti dalla giovani donne è la perdita della fertilità. Tale effetto assume un'importanza sempre maggiore in considerazione dello spostamento in avanti dell'età alla prima gravidanza. Si pone quindi la necessità di avere a disposizione le strutture e le capacità professionali multidisciplinari necessarie per mettere in atto le possibili strategie di preservazione della fertilità.

Le 2 condizioni cliniche sopra riportate costituiscono importante area di ricerca per: stabilire effetto della gravidanza sulla prognosi delle pazienti e gli effetti a lungo termine dell'esposizione durante la vita intrauterina a farmaci

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

antiblastici; per mettere a punto nuove tecniche di criopreservazione degli ovociti, valutare l'effetto gonadotossico dei diversi farmaci antiblastici, stabilire la reale incidenza di gravidanze dopo diagnosi di carcinoma mammario.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

1. Per garantire la gestione clinica ottimale delle donne alle quali viene effettuata diagnosi di carcinoma mammario durante gravidanza e delle donne candidate a chemioterapia adiuvante e desiderose di preservare la fertilità, il progetto ha l'obiettivo di costituire un'unità funzionale multidisciplinare, interaziendale, che faccia da riferimento regionale, assicurando l'attuazione degli adeguati percorsi diagnostico-terapeutici per le 2 situazioni cliniche.

a. Attraverso il percorso diagnostico-terapeutico prestabilito, le donne con diagnosi di carcinoma durante gravidanza avranno accesso immediato alle tecniche diagnostiche ed alle terapie chirurgiche e mediche adeguate; accesso alle procedure di monitoraggio e gestione della gravidanza.

b. Attraverso il percorso diagnostico-terapeutico prestabilito, le donne candidate a ricevere chemioterapia e desiderose di preservare la fertilità potranno accedere in tempi rapidi ai programmi di crioconservazione ovocitaria e ad altre strategie di tipo medico preposte ad aumentare la probabilità di preservazione della fertilità

2. Attuazione di protocolli di ricerca per il miglioramento delle conoscenze delle 2 situazioni cliniche oggetto di questo progetto. In particolare per la problematica del carcinoma mammario durante gravidanza il progetto ha l'obiettivo di: registrare tutti i casi afferenti, raccogliere tutte le informazioni clinicamente importanti per stabilire prognosi delle pazienti, effetti dei trattamenti sul feto, effetti a lungo termine dell'esposizione durante la vita intrauterina a farmaci antiblastici. Per la problematica della preservazione della fertilità il progetto ha l'obiettivo di: stabilire protocollo di criopreservazione degli ovociti, valutare l'effetto gonadotossico dei diversi farmaci antiblastici, stabilire la reale incidenza di gravidanze dopo diagnosi di carcinoma mammario, valutare l'impatto della gravidanza sulla prognosi

Impatto assistenziale certo o potenziale

L'unità funzionale interaziendale per la gestione delle donne con carcinoma mammario insorto in gravidanza e la preservazione della fertilità in donne candidate a chemioterapia costituirà un riferimento regionale, assicurando la pronta disponibilità per la gestione di tutte le problematiche connesse alle 2 situazioni cliniche. Poiché le competenze specifiche e multidisciplinari richieste per tali situazioni non sono disponibili nelle singole strutture sanitarie, l'unità funzionale si propone di soddisfare un fabbisogno emergente in oncologia caratterizzato dalla necessità di rispettare delle tempistiche molto strette. La gestione di tutti i casi da parte di un'unica unità funzionale garantisce l'adeguatezza e la qualità degli interventi sanitari effettuati e consente l'effettuazione di attività di ricerca non perseguibile in strutture che gestiscono casi sporadici. Il modello operativo sarà esportabile in altre realtà regionali.

Risultati e prodotti 2009

Nel corso del 2009 sono state effettuate riunioni operative tra le diverse figure professionali coinvolte nella gestione delle donne in gravidanza con diagnosi di carcinoma mammario e delle donne candidate a chemioterapia adiuvante e desiderose di preservare la fertilità. E' iniziata la stesura del percorso diagnostico-terapeutico per la gestione delle due situazioni cliniche sopra menzionate. In particolare è stata individuata la procedura per la stimolazione ovarica e la criopreservazione degli ovociti. E' iniziata una collaborazione a livello nazionale con figure professionali di altri enti direttamente coinvolte nella gestione di tale problematiche, al fine di elaborare un percorso diagnostico-terapeutico da proporre a livello nazionale, al fine di uniformare interventi e procedure. A scopo di ricerca è in fase di definizione una collaborazione con l'Istituto Europeo di Oncologia di Milano, per effettuare dosaggi atti a determinare i livelli di chemioterapici presenti a livello di placenta, liquido amniotico, siero del neonato e siero della madre, nei casi di carcinoma mammario trattato con chemioterapia durante gravidanza.

Il primo caso di carcinoma mammario insorto in gravidanza è stato gestito dall'unità funzionale interaziendale con effettuazione sia della chirurgia che della chemioterapia.

Sono stati analizzati i dati di uno studio di fase III basato sull'utilizzo di LH-RH analoghi somministrati prima e durante chemioterapia allo scopo di ridurre la tossicità gonadica della chemioterapia stessa. I risultati indicano che tale strategia è in grado di ridurre l'incidenza di menopausa precoce indotta da chemioterapia.

Pubblicazioni

Banelli B.-Casciano I.-Di Vinci A.-Gatteschi B.-Levaggi A.-Carli F.-Bighin C.-Salvi S.-Allemanni G.-Ghiorzo P.-Pronzato P.-Venturini M.-Romani M.-Del Mastro L.

Pathological and molecular characteristics distinguishing contralateral metastatic from new primary breast cancer
Ann. Oncol. Epub Oct 29, 2009

BIG 1/98 Collaborative Group-Mouridsen H.-Giobbie Hurder A.- Goldhirsch A.-Thurlimann B.-Paridaens R.-Smith I.-Mauriac L.- Forbes J.-Price K.-Regan M.-Gelber R.-Coates A.-Rosso R.-Del Mastro L.-Bighin C.

Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer.
N. Engl. J. Med. 361(8):766-776, 2009

Giobbie Hurder A.-Price K.-Gelber R.-International Breast Cancer Study Group BIG 1/98 Collaborative Group-Rosso R.-Del Mastro L.- Bighin C.

Design, conduct, and analyses of Breast International Group (BIG) 1-98: a randomized, double-blind, phase-III study comparing letrozole and tamoxifen as adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women with receptor-positive, early breast cancer.

Clin. Trials 6(3):272-287, 2009

Montemurro F.-Aglietta M.-Del Mastro L.

Aromatase inhibitors as adjuvant therapy for breast cancer.

J. Clin. Oncol. 20;27(15):2566-2567, 2009

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Montemurro F.-Del Mastro L.-Aglietta M.
Reply to A. Sánchez-Muñoz et al.
J. Clin. Oncol. Epub Dec 10, 2009

Rabaglio M.-Sun Z.-Price K.-Castiglione Gertsch M.-Hawle H.- Thurlimann B.-Mouridsen H.-Campone M.-Forbes J.-Paridaens R.- Colleoni M.-Pienkowski T.-Nogaret J.-Lang I.-Smith I.-Gelber R.- Goldhirsch A.-Coates A.-BIG 1/98 Collaborative International Breast Cancer Study Groups-Rosso R.-Del Mastro L.-Bighin C.
Bone fractures among postmenopausal patients with endocrine-responsive early breast cancer treated with 5 years of letrozole or tamoxifen in the BIG 1-98 trial.
Ann. Oncol. 20(9):1489-1498, 2009

Venturini M.-Bighin C.-Puglisi F.-Olmeo N.-Aitini E.-Colucci G.-Garrone O.-Paccagnella A.- Morabito A.-Dozin B.-Salvi S.-Pasciucco G.-Balbi G.-Laurent S.-Pastorino S.-Carli F.-Truini M.-Bruzzi P.-Del Mastro L.-Pistillo M.P.
Analysis and clinical relevance of human leukocyte antigen class I, heavy chain, and beta2-microglobulin downregulation in breast cancer.
Hum. Immunol. 70(7):492-495, 2009

Marini G.-Crinò L.-Mansutti M.-Djazouli K.-Barbato A.-Del Mastro L.
A multicenter phase II study of non-pegylated liposomal doxorubicin in combination with trastuzumab and docetaxel as first-line therapy in metastatic breast cancer.
The Breast, in press

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Proseguire ed ultimare la stesura del percorso diagnostico terapeutico, da applicare sia su base regionale che su base nazionale. Iniziare ad effettuare nelle pazienti eleggibili (previste circa 10/anno) la procedura di stimolazione ovarica e criopreservazione degli ovociti. Valutare il ruolo di marcatori di fertilità, quale AMH, nel predire l'efficienza della stimolazione. Promuovere l'invio all'unità funzionale interaziendale di tutti i casi di carcinoma mammario in gravidanza che si verificano in Liguria. Proseguire l'attività di collaborazione con IEO di Milano.