

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

s.s. Biopolimeri e proteomica

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

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: a - Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

Responsabile scientifico: Mattia Rocco

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Aldo Profumo, Camillo Rosano

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

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

Altri Enti coinvolti: University of Glasgow, Glasgow, UK (O. Byron); University of Nottingham, Nottingham, UK (S. Harding); The Sanford-Burham Institute, La Jolla, Ca, USA (N. Volkman); University of Texas at San Antonio, USA (B. Demeler/E. Brookes), University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA (S. Lord, N. Dokholyan); CNRS-Université Paris-Sud, Orsay, France (P. Vachette); Institut Pasteur, Paris, France (B. Raynal/P. England); Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France (J. Perez)

Tipologia progetto: tecnologie abilitanti

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Background

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

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

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

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

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

Impatto assistenziale certo o potenziale

Non si prevede un impatto assistenziale a breve termine.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Risultati e prodotti 2010

Lo sviluppo del software US-SOMO (UltraScan SOLUTION Modeler, scaricabile dal sito <http://www.ultrascan.uthscsa.edu/>) è ulteriormente proseguito nel 2010. E' stato implementato un modulo per il caricamento di strutture o modelli in modo batch, che permette di analizzare una grande mole di dati e di produrre come output sia i valori di ciascuna struttura/modello che i valori medi dell'intero ensemble. Abbiamo incominciato lo sviluppo di un modulo per introdurre variabilità conformazionale/flessibilità utilizzando la Discrete Molecular Dynamics (DMD), e per il calcolo dei parametri idrodinamici tramite simulazione di Brownian Dynamics (BD).

Nuovi modelli sono stati completati per l'integrina alfa-IIb beta3, basati su dati cristallografici, NMR e di microscopia elettronica dopo solubilizzazione in "nanodischi". I parametri in soluzione di questi modelli sono stati calcolati con US-SOMO e confrontati con i dati storici e con nuovi dati SANS e di velocità di sedimentazione all'ultracentrifuga, permettendo di discriminare ulteriormente tra vari modelli proposti. Un lavoro basato su questi nuovi dati è stato accettato e pubblicato su FEBS Journal.

Per quanto riguarda il fibrinogeno, abbiamo eseguito misure al sincrotrone SOLEIL di Parigi sia su campioni "statici", dopo separazione HPLC on-line, che in fase di polimerizzazione, utilizzando una tecnica stopped-flow accoppiata anche con un detector di diffusione della luce multi-angolo. Questi dati verranno utilizzati sia per raffinare ulteriormente i modelli per il fibrinogeno nativo attualmente in fase di sviluppo molto avanzato, che per determinare il meccanismo di formazione delle fibre di fibrina.

Pubblicazioni

Brookes E.-Demeler B.-Rocco M.

Developments in the US/SOMO bead modeling suite: new features in the direct residue to bead method, improved grid routines, and influence of accessible surface area screening.
Macromol. Biosci. 10:746/753, 2010

Rosano C.-Rocco M.

Solution properties of full length integrin alpha(IIb)beta(3) refined models suggest environment dependent induction of alternative bent extended resting states.
FEBS J. 277:3190/3202, 2010

Presentazioni a congressi

Cardinali C.-Aprile A.-Profumo A.-Vachette P.-England P.-Raynal B.-Roessle M.-Perez J.-Volkman N.-Lord S.T.-Rocco M.

Fibrinogen structure in solution: a multi-resolution study.

XXIth International Fibrinogen Workshop, Abstract P-03, Rotterdam/Amsterdam, NL, August 23-25, 2010

Pacini D.-Aprile A.-Cardinali B.-Rocco M.-Salis A.-Profumo A

Kinetics of FpA and FpB release from fibrinogen isoforms and fractions. A re-evaluation

Fibrinogen structure in solution: a multi-resolution study.

XXIth International Fibrinogen Workshop, Abstract P-05, Rotterdam/Amsterdam, NL, August 23-25, 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Verrà ulteriormente proseguito lo sviluppo del software US SOMO. Tra gli sviluppi previsti vi sono la capacità di simulare direttamente le curve derivate da misure di SAXS e SANS, e il completamento del modulo per le simulazioni DMD/BD. Questi nuovi moduli verranno descritti in pubblicazioni dedicate.

Per quanto riguarda lo studio del fibrinogeno, prosegue l'elaborazione dei dati SAXS e idrodinamici raccolti a maggio 2010. Nuovi modelli sono stati preparati per il corpo centrale del fibrinogeno, con un ottimo accordo con i dati sperimentali. Genereremo quindi modelli anche per le parti mancanti non risolte. Un manoscritto che descrive in dettaglio questo sforzo pluriennale è già in fase di stesura.

Nuove classi di nanoparticelle per il delivery intelligente di agenti diagnostici e terapeutici in oncologia

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

Responsabile scientifico: Camillo Rosano

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Marco Ponassi

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: drug delivery; dendrimeri; macrocicli; polimeri; nanotecnologie

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Terapia immunologica (M. Fabbi)

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Altri Enti coinvolti: Dipartimento di Chimica Organica, Università di Messina (F.H. Kohnke); Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova (S. Cafaggi); Dipartimento di Fisica, Università di Genova (U. Valbusa); Istituto G. Gaslini, Genova (M. Ponzoni); Dipartimento Farmaco-Biologico, Università della Calabria (M. Maggiolini); Polish Academy of Sciences, Lodz, PL (C. Cierniewski); Imperial College, University of London, UK (A. Miller)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Compagnia di San Paolo

Background

L'applicazione medica delle nanotecnologie viene spesso definita come una disciplina propria: la nanomedicina.. Questa nuova disciplina si occupa di tutte quelle conoscenze e quelle tecnologie che abbiano un utilizzo in medicina e che abbiano dimensione dell'ordine di grandezza dei nanometri (1 nanometro=1 miliardesimo di metro=1 milionesimo di millimetro). Lavorando a tali dimensioni la nanotecnologia altera la tradizionale distinzione tra biologia, chimica e fisica facendo della nanomedicina una disciplina ad elevato grado di multidisciplinarietà. Gli studi attualmente in corso in nanomedicina vanno dall'uso medico di materiali nanostrutturati, alla formulazione di nuovi sistemi per la somministrazione dei farmaci (è già in sperimentazione clinica il delivery di farmaci altamente tossici quale la doxorubicina attraverso i liposomi), ai nanobiosensori, al possibile utilizzo futuro della nanotecnologia molecolare. Un altro attivo campo di ricerca sono le interfacce neuro-elettroniche. La nanomedicina può costituire un nuovo metodo di applicazione delle molecole scoperte con la genomica e con la proteomica. Infatti tramite opportune nanoparticelle (vettori) è possibile "traghettare" all'interno del corpo umano quelle molecole, ioni o agenti di contrasto ad oggi non utilizzate perché altamente tossiche, idrofobiche o di sfavorevole farmacocinetica e che, per queste caratteristiche negative, vengono attualmente scartate dall'impiego in clinica. Le nanoparticelle possono essere "guidate" verso le cellule tumorali mediante due diverse tipologie di trasporto: il "delivery attivo" ed il "delivery passivo". Nel delivery attivo alle nanoparticelle "vettori" verranno opportunamente coniugati in superficie degli anticorpi diretti verso antigeni specifici delle cellule che si intende bersagliare. Il delivery passivo sfrutta invece l'effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention): Contrariamente all'endotelio normale, quello tumorale presenta ampie "finestrature" le cui dimensioni superano i 100 nm. Nanoparticelle di queste dimensioni quindi sono in grado di extravasare nell'endotelio tumorale mentre vengono trattenute in circolo dall'endotelio normale, in questo modo i farmaci trasportati nelle nanocapsule si accumulano solo nella zona colpita dal tumore.

Attualmente un importante problema della nanomedicina riguarda la comprensione della tossicità e dell'impatto ambientale dei nanomateriali. E' da segnalare come la nanomedicina costituisca una grande industria, il cui fatturato è arrivato a 6,8 miliardi di dollari nel 2004, con oltre 200 compagnie e 38 prodotti già presenti nel mondo. Inoltre ogni anno si investono in questo settore circa 4 miliardi di Euro per lo sviluppo e la ricerca.. In considerazione della crescita dell'industria della nanotecnologia, è ragionevole aspettarsi un impatto significativo anche nell'economia.

Il laboratorio prevede di indirizzare parte della sua attività istituzionale nel settore del "drug delivery"; il presente progetto di ricerca è focalizzato sullo studio e la sintesi di nuovi vettori di dimensioni nanometriche per il trasporto di ioni e agenti di contrasto da utilizzare in diagnostica e di piccole molecole ed altri farmaci, anche "non-classici" (siRNA, peptidi, PNAs etc), da utilizzare per la terapia del cancro. In particolare contiamo di sviluppare, in collaborazione con il Dipartimento di Chimica Organica, Università di Messina (Prof. Franz Heinrich Kohnke) nuove nanoparticelle basate su macrocicli e dendrimeri (molecole altamente ramificate caratterizzate per la loro perfetta simmetria) che possano fungere da vettori per il trasporto attivo (a seguito di funzionalizzazione con anticorpo specifico per il tumore considerato) e/o passivo (sfruttando l'effetto "EPR") diretto verso le cellule tumorali di farmaci. Inizialmente il nostro interesse sarà diretto verso studi di tossicità dei nuovi vettori, successivamente prevediamo di incapsulare farmaci già esistenti ed oggi poco utilizzati per le loro caratteristiche sfavorevoli (elevata idrofobicità o tossicità, farmacocinetica sfavorevole etc.) all'interno delle nostre nanoparticelle, infine utilizzeremo questi vettori per il trasporto di farmaci da noi progettati, siano essi piccole molecole o farmaci non classici. Un'ulteriore collaborazione, con il Dr. Mirco Ponzoni (Istituto Giannina Gaslini di Genova) riguarda il campo di ricerca sui liposomi e lo studio di nuovi materiali (Idrogel) per il rilascio locale controllato di farmaci a seguito della rimozione di tumori tramite operazioni chirurgiche.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo primario del presente progetto è quello di progettare, sintetizzare e rendere disponibile un complesso nanovettore-farmaco (o nanovettore-agente di contrasto) debitamente funzionalizzato (o delle dimensioni idonee per sfruttare l'effetto EPR), pronto per l'utilizzo nella diagnosi e/o nella terapia del cancro. Obiettivi secondari saranno considerati:

1. Lo studio preliminare di tossicità delle nanoparticelle utilizzate come vettori, sia in vitro che in vivo
2. La progettazione e la sintesi di macrocicli e/o dendrimeri (sia in forma monomerica che polimerica)
3. La stesura di protocolli per la realizzazione di vettori nanometrici (liposomi, macrocicli e dendrimeri)
4. La modifica strutturale di farmaci esistenti in modo da renderli incorporabili negli idrogel e nei liposomi. Qualora necessario, provvederemo anche alla bioconiugazione del farmaco con l'idrogel
5. L'incorporazione di nuovi agenti terapeutici in liposomi "stealth" già in uso in clinica
6. L'identificazione del migliore sistema di delivery per ciascun tumore che verrà considerato

Impatto assistenziale certo o potenziale

La possibilità di incorporare composti antitumorali in vettori di dimensioni nanometriche consentirà di agire in maniera selettiva solo sulle cellule malate, risparmiando di colpire con elevati livelli di tossicità le cellule sane. Questo progresso porterà ad una più efficace terapia del cancro e risulterà di enorme beneficio per il paziente cui verranno risparmiati molti effetti collaterali tipici delle attuali chemioterapie. Il poter trasportare gli agenti di contrasto direttamente sul tumore, in maniera analoga, consentirà una definizione migliore dei margini tumorali nella diagnostica. La possibilità

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

teorica di raggiungere e rendere "visibili" anche solo poche decine di cellule malate, renderà possibili diagnosi sempre più precoci aumentando le aspettative di vita dei malati oncologici.

Risultati e prodotti 2010

Durante il 2010 si sono sintetizzati diversi carriers basati su macrocicli e dendrimeri per l'impiego nel settore del drug delivery. La tossicità di 4 di essi è stata valutata in vitro. Successive elaborazioni di questi vettori hanno condotto alla realizzazione di tre macromolecole: un primo macrociclo contenente un agente colorante verrà testato entro breve in vitro, un secondo è stato usato come "blocco di partenza" per costruire un dendrimero. Al terzo macrociclo è stato coniugato con successo un derivato del platino in vista di una successiva funzionalizzazione con anticorpi per il delivery in vivo.

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Proseguendo con gli attuali ritmi di lavoro, prevediamo di compiere ulteriori ed importanti progressi nel corso del 2011. In particolare, oltre a completare gli studi di tossicità su tutti i macrocicli ed i dendrimeri da noi prodotti, prevediamo di sintetizzare un vettore idoneo al trasporto del Tamoxifene ed un secondo coniugato al cis-platino. Tali vettori saranno testati in vitro ed in vivo per valutarne sia la tossicità che l'attività ed efficienza e verranno successivamente funzionalizzati con anticorpi idonei al fine di rendere possibile il trasporto attivo di farmaci da impiegare nei casi di tumore mammario. I complessi supramolecolari "vettore-farmaco" verranno anche testati per valutarne l'efficacia confrontandola con quella dei composti attivi non complessati con il vettore.

Prevediamo inoltre di ampliare gli studi nel settore del drug delivery prendendo in considerazione anche diverse molecole "carga" siano essi farmaci esistenti o da noi modificati opportunamente al fine di renderli più idonei per il trasporto con i nostri vettori. Infine ci proponiamo di iniziare studi al fine di realizzare hydrogels biocompatibili per il delivery locale e controllato di molecole da impiantare in loco dopo interventi chirurgici di rimozione tumorale.

Nel corso del 2011 prevediamo di poter pubblicare i primi risultati riguardo gli studi condotti fino ad oggi sia su riviste specialistiche ad elevato impact factor che mediante la partecipazione a congressi internazionali.

Produzione di tassolo, identificazione di nuove molecole biologiche con attività simile al tassolo e sviluppo di nuove strategie per indirizzare i farmaci verso le cellule tumorali

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

Responsabile scientifico: Camillo Rosano

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: tassolo; microtubuli; tubulina; drug design; bioinformatica

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Anatomia e citoistologia patologica (P. Romano, L. Ottaggio); s.s. Animal facility (M. Cilli)

Altri Enti coinvolti: Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova (M. Miele); Istituto per la Floricoltura di Sanremo (A. Allavena, A. Giovannini); Arkansas University, USA (A. Lorence)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Compagnia di San Paolo

Background

Il Tassolo, molecola naturale scoperta nel 1967 nella corteccia del Tasso del Pacifico (*Taxus brevifolia*), risulta essere in grado di inibire la mitosi cellulare bloccando il processo di depolimerizzazione della tubulina. Commercializzato con il nome di paclitaxel, il Tassolo è un farmaco antineoplastico impiegato nel trattamento di numerose patologie tumorali, quali il carcinoma ovarico e della mammella, il melanoma ed il tumore al colon. Fin da quando il Tassolo venne approvato come farmaco antitumorale dalla FDA nel 1992, esistono problemi di disponibilità di tale composto. Nonostante i numerosi tentativi per rendere il prodotto disponibile su larga scala, la produzione di Tassolo non sembra soddisfare le richieste cliniche, rimanendo inaccessibile a molti pazienti a causa del costo elevato. La maggior parte del Tassolo utilizzato in terapia viene ottenuto per semisintesi, a partire da un precursore biologico (10-deacetilbaccatina III) ottenuto con buona resa dalle foglie di *T. baccata*. Il metodo per la semisintesi del Tassolo viene utilizzato anche per la produzione del Tassotere, un composto di sintesi utilizzato in alternativa al Tassolo. Sebbene il Tassolo sia sempre stato considerato un prodotto peculiare del metabolismo del tasso, recentemente è stato messo a punto dal nostro gruppo di ricerca, un sistema per la produzione di Tassolo e tassani da colture cellulari di specie diverse. Le piante considerate sono largamente diffuse nel nostro Paese e possiedono una velocità di crescita, sia in vitro che in vivo, superiore al tasso. Quindi piante a maggiore diffusione e più facilmente coltivabili in vitro rispetto al tasso potrebbero diventare nuove fonti commerciali di Tassolo e/o tassani da utilizzare come nuovi agenti terapeutici o nuovi precursori per la semisintesi del Tassolo e Tassotere. Il presente progetto si propone principalmente di individuare nuove specie vegetali per la produzione di Tassolo e di tassani. I metaboliti secondari estratti dai tessuti differenziati

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

vegetali saranno caratterizzati mediante indagine spettrometrica ed immunologica. Dagli stessi tessuti, attraverso la coltura in vitro, verranno selezionate linee cellulari in grado di produrre una maggiore quantità di Tassolo e tassani. In particolare, questa parte della ricerca permetterà di sviluppare il brevetto depositato dal gruppo proponente relativo alla definizione di un nuovo metodo per la produzione di Tassolo e tassani da colture cellulari di *Corylus avellana*. Le molecole tassaniche prodotte in maggiore quantità dalle nostre colture cellulari saranno sottoposte a test biologici per individuare analoghi con attività farmacologica simile al Tassolo. In parallelo saranno condotte simulazioni di "docking" e di dinamica molecolare al computer (structure-based drug design) al fine di identificare quegli analoghi che, in silico, dimostrano affinità migliori ai target d'elezione. Esperienze di questo tipo ci consentiranno di modificare chimicamente le molecole identificate al fine di ottimizzarne le caratteristiche farmacologiche (affinità, solubilità, farmacocinetica etc.).

Infine, verranno sintetizzati aptameri per l'antigene tumorale specifico per la prostata (PSMA) e quindi coniugati con Tassolo ed altri eventuali tassani farmacologicamente attivi. Sarà anche presa in considerazione la possibilità di trasportare il Tassolo all'interno delle cellule bersaglio tramite nanoparticelle legate agli aptameri. In termini generici le nanoparticelle terapeutiche (50-200 nanometri) sono veicoli disegnati per il trasporto che possono incapsulare farmaci e rilasciarli in modo predeterminato e regolato che può variare da un rilascio simultaneo ad un lento rilascio fino ad un periodo di diversi anni. Usando il cancro della prostata come modello tumorale è stato sviluppato un sistema di rilascio del farmaco molto specifico ed efficiente: una volta legato alle cellule del tumore prostatico i bioconiugati aptamero/nanoparticella vengono internalizzate rendendo possibile il rilascio della molecola citotossica direttamente all'interno della cellula tumorale. Questo approccio rende possibile una terapia precisa che è più efficace e più sicura di quella utilizzata finora.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

1. Quantificare i singoli tassani contenuti nei tessuti differenziati e nelle colture di cellule indifferenziate delle specie vegetali individuate,
2. selezionare linee cellulari con elevata velocità di crescita e stabilità di produzione,
3. isolare e caratterizzare nuove molecole con meccanismo d'azione simile al Tassolo ed identificare nuovi precursori per la semisintesi del Tassolo e Tassotere,
4. individuare nuovi tassani biologicamente attivi su cellule resistenti al Tassolo,
5. disegnare e sintetizzare analoghi del Tassolo sulla base dell'analisi cristallografica dei complessi target-inibitore,
6. valutare l'attività antimittotica, citotossica e proapoptotica dei composti isolati, su cellule in vitro,
7. valutare la tossicità in vitro/in vivo delle nanoparticelle singole o contenenti tassani, coniugate con aptameri e determinare la DL50,
8. determinare il ciclo di vita del bioconiugato in vivo in animali tumor-free e tumor-bearing tramite monitoraggio MRI,
9. sintetizzare aptameri specifici per PSMA e coniugarli con nanoparticelle contenenti Tassolo e/o tassani e valutare l'attività antitumorale dei coniugati su cellule di carcinoma prostatico,
10. raccogliere ed analizzare con metodi bioinformatici i dati relativi ai diversi organismi procarioti ed eucarioti produttori di tassolo al fine di definire l'evoluzione molecolare dei geni che codificano per gli enzimi-chiave della biosintesi dei tassani.

Impatto assistenziale certo o potenziale

L'iniziativa è rivolta alla preparazione di sostanze che risolverebbero patologie a rilevante impatto sociale quali le malattie tumorali. La possibilità di ottenere tassani in quantità rilevanti e a basso costo e risulterà di enorme beneficio per i pazienti affetti da patologie tumorali i quali avranno un accesso facilitato a questo tipo di farmaco. Il poter incorporare i tassani in vettori nanometrici per un trasporto intelligente risulterà in un sistema di rilascio del farmaco molto specifico ed efficiente e costituirà un valore aggiunto al progetto.

Risultati e prodotti 2010

Nel corso del 2010 l'attività di ricerca è stata prevalentemente finalizzata all'allestimento di colture cellulari ottenute da specie vegetali diverse dal genere *taxus* ed all'analisi dei metaboliti estratti dai loro tessuti differenziati al fine di identificare nuove specie produttrici di tassani/tassolo.

La plasticità e la totipotenza caratterizzano in modo specifico la cellula somatica vegetale e sono alla base della sua capacità di proliferare e differenziarsi, dando origine a nuovi organi o a nuove piante. Il materiale vegetale impiegato per la produzione della coltura in vitro è stato dapprima sterilizzato e successivamente trasferito in piastre di Petri sterili con terreno MS contenente vitamine, saccarosio, agar e fitormoni a diverse concentrazioni. Dopo circa quattro mesi è stato prodotto callo in numerose piastre contenenti diverse concentrazioni ormonali. Il callo friabile, cioè quello maggiormente idoneo alla preparazione delle colture cellulari, è stato ottenuto prevalentemente in piastre contenente due specifici fitormoni. Tale callo è stato periodicamente pesato, trasferito in terreno fresco e mantenuto in coltura al fine di preparare le colture cellulari che verranno periodicamente analizzate per la presenza dei tassani. I risultati preliminari ottenuti dall'analisi mediante ELISA dei terreni delle colture cellulari indicano la presenza di tassani.

In parallelo si sono svolti studi biocomputazionali al fine di caratterizzare strutturalmente i diversi siti di legame della tubulina alfa e della tubulina beta in modo tale da consentire, in futuro, il disegno razionale di molecole simili al tassolo per struttura e/o attività biologica.

Pubblicazioni

Stec-Martyna E.-Ponassi M.-Miele M.-Parodi S.-Felli L.-Rosano C.
Structural Comparison of the Interaction of Tubulin with Various Ligand Affecting Microtubule Dynamics.
Curr. Med. Chem., submitted

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Nel 2011 procederemo con il disegno razionale e la sintesi di piccole molecole ad attività simile a quella del tassolo e prevediamo in questo settore di pubblicare un ulteriore articolo su rivista specialistica "peer-reviewed". In particolare, le attività previste per il futuro sono le seguenti:

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

- Elicitazione delle colture cellulari e/o trasformazione genetica. Nell'ambito della presente ricerca il callo che è stato ottenuto dai tessuti differenziati di *C. avellana* e di altre specie vegetali sarà utilizzato a breve per la produzione di colture cellulari che verranno elicitate con composti chimici quali metiljasmonato e chitosano con lo scopo di verificare l'eventuale incremento della produzione di tassani.

- Isolamento e caratterizzazione di nuove molecole con meccanismo d'azione simile al tassolo ed identificazione di nuovi precursori per la semisintesi del tassolo e tassotere. Mediante tecniche di separazione gas-cromatografica e di cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa e saggi immunologici (ELISA), saranno individuate le molecole correlate alla famiglia dei tassani. Tali molecole verranno caratterizzate in ambito strutturale e chimico-fisico e ne verrà quindi determinato un preliminare profilo biochimico-farmacologico attraverso l'attività integrata di caratterizzazione biochimica, immunologica e citogenetica. Verranno inoltre sviluppati protocolli metodologici per l'analisi qualitativa e quantitativa delle suddette molecole.

- Clonaggio e sequenziamento di geni coinvolti nella biosintesi dei tassani in specie diverse dal tasso. A tale scopo saranno identificate sequenze nella banca dati degli EST (Expressed Sequence Tag) del tasso ed utilizzate come marcatori di ibridazione per il DNA estratto dalle specie da noi individuate.

Studi strutturali e modellazione molecolare di oncoproteine e disegno razionale di farmaci

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

Responsabile scientifico: Camillo Rosano

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Marco Ponassi, Mattia Rocco

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: struttura proteine; modelling; structure based drug design; biocristallografia; bioinformatica; diffrazione di raggi X

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Terapia immunologica (S. Ferrini, M. Viale)

Altri Enti coinvolti: Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Pavia (L.A. Stivala, C. Scotti); DISCAFF, Facoltà di Farmacia, Università del Piemonte Orientale (F. Condorelli); Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino (M. Magnani), Dipartimento di Ingegneria Elettronica, Laboratorio di Visione Artificiale, Università di Pavia (Ing. M. Piastra); Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova (A. Spallarossa); Istituto G. Gaslini, Genova (M. Filocamo); Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Udine (A. Corazza); Dipartimento Farmaco-Biologico, Università della Calabria (M. Maggiolini); Max-Planck Institute Tuebingen, D, (K. Zeth); Polish Academy of Sciences, Lodz, PL (C. Cierniewski, E. Stec); MRC, University of Cambridge, UK (E. Gherardi)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Background

In questi ultimi anni, anche grazie al progetto genoma, sono stati identificati numerosi geni responsabili di malattie genetiche e/o associate alla trasformazione neoplastica. La caratterizzazione strutturale dei prodotti genici corrispondenti, rappresenta l'ovvia fase scientifica successiva. In questo contesto, la biologia strutturale è una delle discipline più informative unendo studi computazionali e tecnologie di analisi "a bassa risoluzione" a studi ad alta risoluzione che possono rivelare dettagli a livello atomico delle macromolecole biologiche. Una tale precisione è necessaria al fine di apprendere processi fondamentali quali la traduzione del segnale, l'attivazione di un cammino metabolico, l'azione di un inibitore o le conseguenze di una mutazione sul funzionamento di un enzima. La biologia strutturale è altresì cruciale per la caratterizzazione molecolare di molte malattie tra cui il cancro ed è in grado di offrire una base di partenza per lo studio di terapie mirate quali il disegno razionale di farmaci. Nell'ambito dell'attività proposta saranno studiate e caratterizzate diverse proteine (e loro mutanti patogeni) utilizzando tecniche quali la diffrazione di raggi X da cristalli proteici, la risonanza magnetica nucleare (NMR), lo scattering di raggi X a basso angolo, le diverse tecniche di microscopia elettronica (TEM, SEM, cryoEM etc.), il dynamic light scattering ed il modelling molecolare. Le informazioni strutturali ottenute potranno consentire, in alcuni casi, il disegno razionale di inibitori ed una prima validazione e caratterizzazione di queste molecole utilizzando lo screening virtuale "in silico" tramite simulazioni di docking e di dinamica molecolare. Infine sarà possibile identificare alcuni meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza di stati patogeni e procedere ad una loro più dettagliata caratterizzazione.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Il presente progetto di ricerca ha come obiettivo primario lo studio e la determinazione delle strutture tridimensionali di alcune oncoproteine ed enzimi mediante analisi dei dati di diffrazione di raggi X da cristalli e mediante modelling molecolare, al fine di rendere possibile un disegno razionale di inibitori con elevato grado di specificità e selettività.

Obiettivi secondari del progetto saranno:

1. la determinazione dei meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza di alcune patologie
2. la stesura di protocolli per il cloning, l'espressione e la purificazione di proteine coinvolte in processi patogeni

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

3. il disegno razionale di piccole molecole (lead compounds) che potranno dimostrare una potenziale capacità di interazione con i targets di interesse oncologico e che, in un prossimo futuro, potrebbero essere ottimizzati per un eventuale uso farmacologico
4. lo studio conoscitivo dei meccanismi di attivazione di proteine e complessi proteici (ad esempio le integrine) che sarà possibile grazie all'integrazione di studi strutturali ad alta e bassa risoluzione con i dati di proteomica e di modellistica molecolare
5. lo studio strutturale di proteine tirosine chinasi
6. lo studio strutturale del complesso HK:VDAC1
7. lo studio strutturale di proteine coinvolte in processi oncogenici.
8. la realizzazione di software dedicato per il "de novo" design di farmaci

Impatto assistenziale certo o potenziale

La possibilità di realizzare nuovi composti antitumorali più selettivi ed efficaci di quelli oggi in commercio, costituirà un enorme beneficio per la popolazione. La completa descrizione dei siti attivi di enzimi e di oncoproteine renderà possibile un disegno razionale di farmaci "molecolari" ad altissima specificità per il target di elezione; molti dei farmaci attualmente in uso in oncologia, infatti, sono stati disegnati e sintetizzati grazie a questo tipo di indagini (es. Gleevec®). La conoscenza dei meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza di alcune patologie, inoltre, potrà essere utilizzata in fase di prevenzione e di diagnosi precoce di tumori. Le industrie chimico-farmaceutiche presenti sul territorio potranno avere giovamento dai risultati di questa ricerca in quanto saranno anche in grado di sviluppare terapie personalizzate, poco interessanti per le grandi multinazionali, ma essenziali per la cura di alcuni tumori considerati "rari".

Risultati e prodotti 2010

Durante lo scorso anno sono stati condotti i seguenti studi:

- c-Fes: abbiamo clonato, espresso, risolubilizzato e purificato il dominio N-terminale "FCH" della proteina Fes per nuove prove di cristallizzazione che si sono concluse recentemente con successo.
- GPR30: durante questo anno di attività abbiamo clonato in batteri la proteina per una successiva espressione in quantità sufficienti da poter permettere esperimenti di cristallizzazione. Sulla base del modello molecolare da noi realizzato nell'anno precedente abbiamo disegnato e sintetizzato alcuni ligandi (agonisti ed antagonisti) e abbiamo identificato alcuni ligandi endogeni precedentemente non noti.
- ERalfa: nell'anno in considerazione abbiamo effettuato diversi screening virtuali "in silico" di possibili ligandi, evidenziato gli effetti di molecole di origine naturale e disegnato e sintetizzato ligandi potenzialmente attivi che sono attualmente in corso di validazione in vitro.
- Modelling: in questo settore, siamo stati impegnati nello studio dei cambiamenti conformazionali dell'integrina AlfaIIbBeta3 in seguito alla sua attivazione, abbiamo svolto simulazioni di docking molecolare su diverse strutture tridimensionali di proteine, tra cui la Multidrug Resistance protein 1 (MDR1 o ABCB1) determinando alcuni possibili inibitori ed, infine, abbiamo mantenuto attiva la collaborazione con l'Istituto G. Gaslini di Genova (dr.ssa M. Filocamo) nell'analisi degli effetti a livello proteico di mutazioni genetiche patogene.

Pubblicazioni

Brookes E.-Demeler B.-Rosano C.-Rocco M.

The implementation of SOMO (SOLUTION MODeller) in the UltraScan analytical ultracentrifugation data analysis suite: enhanced capabilities allow the reliable hydrodynamic modeling of virtually any kind of biomacromolecule.
Eur. Biophys. J. 39:423/435, 2010

Lappano R.-Rosano C.-De Marco P.-De Francesco E.-Pezzi V.- Maggiolini M.

Estril acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor negative breast cancer cells.
Mol. Cell. Endocrinol. 320:162/170, 2010

Ponassi M.-Felli L.-Parodi S.-Valbusa-U. Rosano C.

Crystals of the hydrogenase maturation factor HypF terminal domain grown in microgravity, display improved internal order.
J. Cryst. Growth Epub Dec 9, 2010

Rosano C.-Rocco M.

Solution properties of full length integrin alpha(IIb)beta(3) refined models suggest environment dependent induction of alternative bent extended resting states.
FEBS J. 277:3190/3202, 2010

Rosano C.

A molecular model of hexokinase binding to the outer mitochondrial membrane porin VDAC1 indicates a potential novel target for cancer therapy.
Mitochondrion, in press

Bertola F.-Filocamo M.-Casati G.-Mort M.-Rosano C.-Tylki-Szymanska A.-Tüysüz B.-Gabrielli O.-Grossi S.-Scarpa M.-Antuzzi D.-Dalmau J.-Di Rocco M.-Dionisi Vici C.-Okur I.-Rosell J.-Rovelli A.-Furlan F.-Rigoldi M.-Biondi A.-Cooper D.N.-Parini R.

Mutational profiling of a cohort of 102 European patients with mucopolysaccharidosis type i: identification and characterization of 35 novel α -L-iduronidase (IDUA) alleles.
Human Mutat., submitted

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Nel corso del 2011 prevediamo le seguenti attività:

- c-FES: determinazione della struttura cristallografica del dominio FCH e sua caratterizzazione tramite NMR. Purificazione e cristallizzazione del dominio chinasi in forma apo e in presenza di inibitori di tirosine chinasi noti e da noi prodotti. Espressione e purificazione della proteina "full-length".

- GPR30: procederemo lungo due linee principali: da un lato cercheremo di clonare e purificare la proteina di membrana per successivi esperimenti di cristallizzazione. Parallelamente, utilizzando il modello tridimensionale da noi costruito e validato in precedenza, disegneremo e sintetizzeremo nuovi ligandi (agonisti ed antagonisti) di questo recettore.

- ERalfa: si procederà nelle valutazioni in silico di nuovi ligandi di origine naturale e sintetica anche procedendo in base ai risultati derivati dagli esperimenti su GPR30, in modo tale da determinare una molecola che sia antagonista di entrambe queste proteine, possibile "lead" per la realizzazione di un farmaco da impiegare nei tumori mammari.

- Modelling di proteine e simulazioni di dinamica molecolare: proseguiremo la collaborazione con il Laboratorio di Diagnosi pre-postnatale e Malattie Metaboliche dell'Istituto G. Gaslini di Genova (Prof.ssa. M. Filocamo), al fine di analizzare gli effetti di mutazioni singole di aminoacidi su diverse proteine. Le nostre analisi biocomputazionali potranno infatti contribuire a chiarire alcuni meccanismi molecolari che sono alla base dell'insorgenza di diverse malattie metaboliche. Inoltre proseguiremo l'attività sul complesso Esochinasi:VDAC1, un possibile nuovo target nella terapia dei tumori.

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

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

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

Responsabile scientifico: Aldo Profumo

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

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

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

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Oncologia medica B (F. Boccardo, R. Mangerini); s.c. Patologia molecolare integrata (U. Pfeffer, G. Angelini); s.c. Anatomia e citoistologia patologica (M. Truini, P. Romano); s.s. Oncologia molecolare e angiogenesi (F. Tosetti)

Altri Enti coinvolti: DIMES, Università degli Studi di Genova (G. Damonte); Ospedali Galliera, Genova (G. Forni, A. Decensi, C. Mosci); CNR, Genova (M. Muselli); CNR, Avellino (A. Facchiano)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica sperimentale

Area di interesse: prevenzione primaria/secondaria

Background

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

E' in quest'ottica che si inquadra la necessità di disporre di tecnologie in grado di valutare, in maniera rapida e precisa, la complessa componente proteica di un organismo. Lo sviluppo e l'affinamento delle tecniche di spettrometria di massa ha reso possibile l'identificazione di una proteina ignota attraverso la determinazione della massa esatta dei peptidi che la costituiscono. Questa operazione, che prende il nome di peptide mass fingerprinting (PMF), prevede la digestione con tripsina della proteina da identificare ed il successivo confronto tra le masse dei frammenti triptici ottenuti con quelle dei frammenti ottenibili dalla teorica digestione delle proteine la cui sequenza è contenuta in una banca dati. Per garantire una attendibile analisi spettrometrica di massa di una proteina è di importanza fondamentale una riduzione della complessità del campione quanto più efficace possibile. A tale scopo, risulta essere particolarmente utile la cromatografia multidimensionale, costituita da due, o più, separazioni cromatografiche successive (solitamente viene realizzata una prima separazione con un meccanismo a scambio ionico seguita da una seconda separazione secondo modalità a fase inversa). Questo tipo di approccio verrà impiegato in uno studio, condotto in collaborazione con la Dr.ssa Tosetti (s.c. Biologia cellulare, IST) e i Dr. Forni e Decensi (Ospedali Galliera di Genova), nel corso del quale, accanto al dosaggio di biomarcatori di elezione dello stress ossidativo quali malondialdeide (MDA), formaldeide (FA) e isoprostani, si mirerà all'individuazione qualitativa di derivati proteici ottenuti in seguito a stress ossidativo e alla misura quantitativa di proteine direttamente o indirettamente coinvolte nella generazione di ROS e nell'oncogenesi. Un altro studio, realizzato questa volta in collaborazione con la s.c. Patologia molecolare integrata e con la s.c. Chirurgia toracica dell'IST, utilizzerà la tecnologia della 2D-HPLC/MS nell'identificazione di nuovi marcatori

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

proteici associati alla progressione del melanoma uveale. In questo ambito l'attenzione della nostra struttura sarà rivolta anche all'analisi comparativa MALDI/TOF del peptidoma del siero/plasma ottenuto da pazienti affetti da melanoma uveale metastatico e non-metastatico. Il nostro gruppo ha inoltre da tempo realizzato una collaborazione con la s.c. Oncologia medica B dell'IST, diretta dal Prof. Boccardo, nel corso della quale è stato messo a punto un valido protocollo per l'analisi del profilo peptidomico del siero di pazienti afferenti al nostro centro a seguito dell'insorgenza di una mastopatia fibrocistica a grosse cisti. Lo studio, che si avvale della disponibilità del materiale biologico raccolto nel corso di molti anni di attività del centro, ha come obiettivo la valutazione, mediante l'analisi dell'insieme dei peptidi presenti nel siero, del rischio di sviluppo del carcinoma mammario nelle pazienti portatrici di questa patologia mammaria relativamente comune.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

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

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

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

Impatto assistenziale certo o potenziale

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

Risultati e prodotti 2010

Nel corso dell'anno 2010 è stato messo a punto un sistema di analisi 2D-HPLC utilizzando il cromatografo Agilent serie 1200 presente presso la s.s. Biopolimeri e proteomica. Il set-up dello strumento prevede una prima separazione cromatografica realizzata mediante una colonna a scambio cationico debole seguita da una seconda separazione realizzata in fase inversa. L'operazione è resa possibile dalla disponibilità di una "switching valve" multicanale all'interno del compartimento termostato delle colonne in grado di selezionare il flusso della fase liquida in maniera opportuna. Questa metodologia potrà essere impiegata nel corso di esperimenti, realizzati in collaborazione con la s.c. Patologia molecolare integrata diretta dal Dr. Pfeffer, finalizzati all'individuazione di nuovi marcatori proteici associati alla progressione del melanoma uveale.

Abbiamo inoltre messo a punto un metodo per il dosaggio della malondialdeide (MDA) nel siero che potrà essere impiegato nell'ambito di uno studio, condotto in collaborazione con la Dr.ssa Tosetti dell'IST e il Dr. Forni del Galliera di Genova, sui livelli di stress ossidativo in pazienti caratterizzati da alti livelli di ferritina.

La maggior parte del lavoro condotto nel corso del 2010 è stata, tuttavia, dedicata allo studio del profilo peptidomico nel siero di pazienti affette da mastopatia fibrocistica a grosse cisti (MFCGC), patologia mammaria relativamente comune. Scopo dello studio, realizzato in collaborazione con il Prof. Boccardo e la Dr.ssa Mangerini dell'IST, era l'individuazione di eventuali pattern in grado di stabilire il livello di rischio di insorgenza di un carcinoma mammario nelle pazienti portatrici della patologia. L'acquisizione degli spettri MALDI-TOF/MS dei campioni di siero disponibili è stata ormai completata ed è in fase molto avanzata l'elaborazione dei dati ottenuti. I dati sono processati grazie alla disponibilità di alcuni strumenti bioinformatici sviluppati all'uopo sia presso il nostro Istituto (Dr. Romano) che presso altre istituzioni (Dr. Facchiano del CNR di Avellino e Dr. Muselli del CNR di Genova).

I dati preliminari molto promettenti, ottenuti da un training set di campioni, sono stati già oggetto di presentazione ad alcuni convegni. Parallelamente, lo stesso approccio è stato utilizzato per un'indagine sullo stato di conservazione dei sieri crio-conservati per lungo tempo. I risultati hanno delineato un effetto molto marcato dell'invecchiamento del campione sui profili peptidomici ottenuti dal siero. Sono stati inoltre acquisiti gli spettri MALDI-TOF/MS del siero di un buon numero di pazienti affette da fibroadenoma o da carcinoma mammario.

Presentazioni a congressi

Guglielmini P.-Mangerini R.-Profumo A.-Rubagotti A.-Schiavone G.-Romano P.-Facchiano A.-Muselli M.-Damonte G.-Rocco M.-Benatti U.-Boccardo F.
Proteomic signatures as biomarkers of breast cancer risk in women with gross cystic disease of the breast (GCDB).
AIOM, Roma, 2010

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Mangerini R.-Profumo A.-Guglielmini P.-Rubagotti A.-Schiavone G.-Romano P.-Facchiano A.-Muselli M.-Damonte G.-Rocco M.-Benatti U.-Boccardo F.
Serum peptide profiling by MALDI-TOF mass spectrometry in women with gross cystic disease of the breast (GCDB). AIOM, Roma, 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Nel corso del 2011 verrà completata l'analisi dei dati di spettrometria di massa necessari alla realizzazione dei profili peptidomici nel siero delle pazienti affette da MFCGC, corredando gli stessi con informazioni di tipo clinico. In questo modo dovrebbe essere possibile la costruzione di profili di rischio utili per la prognosi e per la scelta della migliore strategia terapeutica. Grazie alla collaborazione con il Dr. Damonte del DIMES di Genova, saranno identificate, con esperimenti MS/MS, le proteine responsabili dei segnali più interessanti.

Verranno poi processati tutti i dati relativi agli spettri di massa ottenuti dai sieri delle pazienti portatrici di fibroadenoma e di carcinoma mammario.

Saranno acquisiti nuovi spettri MALDI-TOF/MS dei liquidi cistici delle stesse pazienti, affette da MFCGC, delle quali sono già disponibili i profili serici. L'analisi del contenuto delle cisti, se da un lato può confermare i risultati ottenuti sul siero, dall'altra potrebbe fornire informazioni molto interessanti esclusive del microambiente cistico.

Nel prossimo futuro proseguirà anche la raccolta dei dati relativi al contenuto di malondialdeide nel siero dei pazienti con iperferritinemia, con un particolare interesse per la modulazione dei livelli di stress ossidativo in risposta ai diversi trattamenti terapeutici. Verranno infine proseguite le indagini in 2D-HPLC finalizzate all'individuazione di marcatori proteici associabili alla progressione del melanoma uveale, integrando il nostro lavoro con i dati provenienti dall'analisi dell'espressione genica (microarray).

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

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

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

Responsabile scientifico: Mattia Rocco

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

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

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

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Terapia immunologica (M. Viale); s.s. Animal facility (M. Cilli); s.c. Chirurgia plastica e ricostruttiva (P.L. Santi)

Altri Enti coinvolti: Università dell'Insubria, Como (F. Ferri); Università di Genova, DICMI (P.L. Santi); Università di Genova, DICTFA (S. Cafaggi); Università di Genova, DIMES (G. Damonte)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: MIUR

Background

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

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

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo generale del progetto è verificare la fattibilità tecnica e valutare vantaggi e svantaggi della veicolazione locale di agenti chemioterapici utilizzando gel di fibrina in almeno un modello animale di tumore umano. Propedeutica e complementare a questa attività vi è la caratterizzazione cinetica e strutturale dei gel di fibrina, in modo da poter tenere sotto controllo alcuni parametri fondamentali dei gel, quali dimensioni dei pori e delle fibre, loro resistenza,

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

elasticità e degradabilità in vivo. Per ragioni principalmente di budget, solo questa seconda parte del progetto è stata perseguita nel triennio 2006-2008, rimandando lo studio del rilascio di farmaci in vivo e in vitro al presente progetto.

Impatto assistenziale certo o potenziale

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

Risultati e prodotti 2010

Grazie ad un finanziamento MIUR ottenuto dal Prof. P.L. Santi abbiamo potuto iniziare la parte più applicativa del progetto a novembre 2010. Gels di fibrina caricati con cisplatino sia libero che pre-incluso in ialuronato sono stati preparati a due diverse concentrazioni di fibrinogeno (8 e 20 mg/ml) e la cinetica di rilascio del cisplatino è stata studiata mediante misure di assorbimento atomico. I risultati sono ancora in fase di completamento/analisi.

Nel frattempo, abbiamo ulteriormente proseguito lo sviluppo dei metodi che permettono la misura delle dimensioni di maglia, frattalità, e diametro delle fibre di gel di fibrina a partire da misure di microscopia confocale. Un manoscritto, descrivente la validazione dei metodi di analisi tramite simulazioni al computer, è stato sottomesso al Biophysical Journal ed è adesso in fase di preparazione per la risottomissione. Un altro manoscritto è in preparazione.

Infine, sono ripresi i nostri studi sulla cinetica di attivazione della molecola del fibrinogeno, passaggio chiave nella formazione del reticolo di fibrina. Il dosaggio dei fibrinopeptidi rilasciati rappresenta un comodo strumento per la valutazione della velocità di attivazione del fibrinogeno. Abbiamo messo a punto un metodo di attivazione simultanea di campioni in triplicato tramite l'uso di una stazione robotica TECAN Freedom Evo, e studiato il rilascio dei fibrinopeptidi da cinque diverse forme di fibrinogeno (non frazionato, frazionato ad alto peso molecolare, frazionato per la variante gamma/gamma' ad alta affinità per la trombina, ricombinante non degradato, ricombinante privo degli ultimi 400 amino acidi delle catene alfa) in assenza ed in presenza di calcio fisiologico. In collaborazione con il DIMES di Genova, è stato inoltre sintetizzato un marker da aggiungere alla miscela di reazione per standardizzare le aree durante l'analisi cromatografica. Un articolo che descrive questo lavoro è in preparazione.

Attività previste e risultati attesi nel 2011

L'uso dei gel di fibrina come veicolatori locali di farmaci chemioterapici verrà proseguito con studi in vivo in ratti e topi nudi. In una prima fase, verificheremo le caratteristiche di degradazione dei gel di fibrina impiantati sotto cute in ratti, per determinare le concentrazioni di fibrinogeno e le caratteristiche chimico-fisiche (tipo di fibre, reticolazione) ottimali per mantenerli efficienti per un tempo ragionevole. Successivamente, studieremo sempre nel ratto il rilascio in vivo di cisplatino dal tipo di gel prescelto, basandoci sui risultati già ottenuti in vitro ed ottimizzandoli.