

S.S. Traslazionale Polmonare

Identificazione e sviluppo di nuovi composti ad attività antitumorale e chemiopreventiva nel trattamento delle neoplasie polmonari

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

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

Responsabile scientifico: Angela Alama

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Cristina Bruzzo, Zita Cavalieri

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: recettori nicotinici; derivati citisinici; idrossitirosolo; attività antitumorale e chemio preventiva; neoplasie polmonari

Altri Enti coinvolti: Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova (F. Sparatore); Unità Operativa: AC; Analisi & Controlli S.p.A, CBA, Genova (G. Dondo)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Background

Il fumo di sigaretta è fortemente coinvolto, dal punto di vista eziologico, in molte patologie associate alla neovascolarizzazione come tumori e malattie cardiovascolari e degenerative.

Recenti studi hanno evidenziato che i recettori nicotinici rivestono un ruolo significativo nella predisposizione al tumore polmonare. Tali recettori sono funzionalmente presenti sulle cellule epiteliali delle vie polmonari umane, nei carcinomi polmonari (SCLC e NSCLC) e nei mesoteliomi.

La nicotina, uno dei principali componenti del tabacco, esplica un significativo incremento della proliferazione cellulare, angiogenesi e resistenza all'apoptosi tramite il legame con i propri recettori. Infatti, è stato dimostrato che la nicotina è in grado di indurre una up-regulation dell'espressione di svariati fattori di crescita angiogenici quali bFGF, VEGF, PDGF, TGF-beta and TGF-alfa che risultano frequentemente over-espressi nel cancro polmonare.

Allo stesso modo, numerosi studi epidemiologici riportano il ruolo protettivo esercitato dalla dieta mediterranea nei confronti di alcune neoplasie e malattie cardiovascolari i cui diversi effetti biologici sono da attribuirsi ai polifenoli contenuti in vari alimenti quali l'olio d'oliva.

Oltre all'azione antiossidante i fenoli (in particolare idrossitirosolo ed oleuropeina) svolgono anche una azione antiinfiammatoria e una importante attività antitumorale dose dipendente attraverso l'inibizione dell'attività proliferativa cellulare e del processo angiogenico.

Nello specifico, l'idrossitirosolo, è in grado di: inibire l'ossidazione delle lipoproteine umane a bassa densità, eliminare i radicali liberi, conferire protezione cellulare ed essere dotato di una buona biodisponibilità

Inoltre, evidenze dimostrano che l'idrossitirosolo riduce gli effetti tossici (in termini di stress ossidativo) indotti da fumo di sigaretta in animali da laboratorio e che una elevata assunzione di antiossidanti con la dieta svolge un'azione protettiva e chemiopreventiva.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Lo studio si articolerà secondo due principali vie di indagine. La prima prevede la sintesi, identificazione e sviluppo di nuovi composti antagonisti dei recettori nicotinici. In particolare l'interesse si focalizzerà sui derivati della citisina, un alcaloide con caratteristiche strettamente simili alla nicotina. Le sue modifiche chimiche avranno lo scopo di ottenere composti con proprietà antagoniste da impiegare a fini terapeutici.

La seconda linea di ricerca prevederà l'impiego di idrossitirosolo in una serie di esperimenti volti a valutarne gli effetti antiproliferativi e chemiopreventivi in vitro e successivamente in vivo.

Il razionale che sta alla base degli effetti chemiopreventivi degli agenti antiossidanti come l'idrossitirosolo e i fenoli derivati dall'oliva, è soprattutto la capacità di riportare l'equilibrio chimico nei radicali liberi formati durante i processi ossidativi cellulari. Sarà quindi ulteriore motivo di studio anche la quantificazione del danno al DNA che segue l'insulto ai cancerogeni (quali il fumo di sigaretta, nicotina) e la capacità protettiva e/o di riparo cellulari successivi alla somministrazione di agenti chemiopreventivi (idrossitirosolo) e/o ad attività antagonista su nAChR.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Sviluppo di nuovi composti di interesse terapeutico come agenti citotossici e chemiopreventivi nel controllo e trattamento di patologie oncologiche polmonari.

Risultati e prodotti 2009

Nell'ambito del progetto relativo ai composti antagonisti dei recettori nicotinici, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Genova, sono stati sintetizzati e analizzati, ad oggi, sette derivati citisinici denominati IST-CY 1-7. Le linee cellulari impiegate sono state individuate in base all'espressione di recettori nicotinici come evidenziato in saggi di Western Blot. In particolare sono state selezionate due linee di carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC): SK MES 1 (carcinoma squamoso) e A549 (adenocarcinoma) entrambe esprimenti questi

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

recettori. Saggi preliminari di citotossicità hanno riportato fra tutti una efficace attività antiproliferativa del composto IST-CY1 nei confronti delle A549 mentre nella linea SK MES 1, IST-CY3 si è dimostrato superiore rispetto agli altri derivati. Modifiche strutturali volte al miglioramento dell'indice terapeutico sono attualmente in corso.

Le linee cellulari sopraccitate sono state anche impiegate per lo studio riguardante gli effetti antiproliferativi e chemiopreventivi dell'idrossitirosolo. La sostanza, fornita dal Dott. Dondo dell'Unità Operativa: "AC" Analisi & Controlli S.p.A presso il CBA, è stata identificata, isolata e purificata da concentrato di acque di vegetazione reflue provenienti dalla frangitura delle olive. Diverse concentrazioni e tempi di esposizione sono stati presi in considerazione ed i risultati ottenuti fino ad oggi hanno dimostrato un significativo effetto di controllo della crescita cellulare ad una concentrazione massima di 100 μ M somministrata per 3 giorni consecutivi. Per quanto riguarda il potenziale chemopreventivo, sono necessari tempi di osservazione a lungo termine su campioni cellulari "normali" con esposizioni ripetute all'idrossitirosolo.

Pubblicazioni

Alama A.-Tasso B.-Novelli F.-Sparatore F.
Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents.
Drug. Discov. Today 14:500/508, 2009

Alama A.- Viale M.- Cilli M.- Bruzzo C.- Novelli F.- Tasso B.- Sparatore F.
In vitro cytotoxic activity of tri-n-butyltin(IV)lupinylsulfide hydrogen fumarate (IST-FS 35) and preliminary antitumor activity in vivo.
Invest New Drugs.27(2):124-30. 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Le prossime fasi dello studio prevedono la sintesi e modifiche chimiche dei prodotti di derivazione citisinica con maggiore attività quali IST-CY1 e IST-CY nonché la verifica della capacità da parte di questi composti di agire sui recettori nicotinici in linee di NSCLC. Scopo della ricerca sarà anche individuare associazioni farmacologiche tra antagonisti citisinici e agenti antitumorali impiegati in protocolli terapeutici clinici. Il miglioramento dell'indice terapeutico e l'inattivazione di bersagli molecolari coinvolti nel processo di trasformazione dei tumori polmonari, quali i recettori nicotinici e fattori di crescita, riveste infatti un obiettivo primario nell'ambito della S.S. Traslazionale Polmonare.

In associazione agli aspetti più strettamente legati al trattamento e "cura" delle neoplasie polmonari, anche l'impiego di composti ad attività protettiva e chemiopreventiva risulta particolarmente interessante. Come già riportato per altre neoplasie quali quelle del colon e della mammella, gli effetti antiossidanti e citotossici dell'idrossitirosolo sembrano fornire utili indicazioni per una applicazione di questo composto anche nella cancerogenesi polmonare e i risultati preliminari da noi ottenuti avvalorano questa ipotesi, ancora comunque tutta da verificare sia a livello biologico che molecolare.

Va, ad ogni modo, sottolineato che lo svolgimento e la prosecuzione di questo studio è strettamente dipendente dalla possibilità di un finanziamento che è stato richiesto ma in attesa di risposta.

Nuove strategie terapeutiche per NSCLC e mesotelioma: individuazione di nuovi farmaci e di marcatori prognostici e di risposta

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: Angela Alama

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Cristina Bruzzo, Zita Cavalieri

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: NSCLC; mesotelioma; diagnosi precoce; fattori prognostici; fattori di risposta; apoptosi

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Oncologia Medica A (F. Grossi); S.C. Trasferimento Tecnologico e Coordinamento Core Facilities (T. Ruzzon); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini); S.S. Animal Facility (M. Cilli); S.C. Genetica dei Tumori (M. Romani); S.C. Chirurgia Toracica (G.B. Ratto)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica osservazionale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Compagnia di San Paolo; Ministero della Salute

Background

Il tumore del polmone rappresenta nel mondo la prima causa di morte per cancro. La probabilità di sopravvivenza a cinque anni resta inferiore al 15% nella casistica complessiva che comprende anche gli stadi iniziali, chirurgicamente

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

resecabili, in maniera apparentemente radicale. Ciò è dovuto alla natura sistemica della malattia sin dal suo esordio, nella maggior parte dei casi, che comporta una disseminazione a distanza ed una rilevante aggressività biologica. Nonostante gli incoraggianti risultati ottenuti con la chemioterapia neoadiuvante ed adiuvante ed alcuni progressi riscontrati nel trattamento delle lesioni localmente avanzate, la prognosi dei pazienti affetti da tumori del polmone non a piccole cellule (NSCLC) è ancora considerata insoddisfacente.

Per queste ragioni e per le recenti acquisizioni sulla biologia delle cellule tumorali e sulle cascate metaboliche che supportano l'oncogenesi, la metastatizzazione e la progressione neoplastica, abbiamo orientato l'impegno di ricerca alla migliore comprensione dei meccanismi di insorgenza del carcinoma polmonare al fine di individuare nuovi bersagli terapeutici e nuove strategie di diagnosi precoce legate alla quantificazione del rischio individuale.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Il progetto in corso nella Unità Tumori Polmonari è focalizzato sulla identificazione e validazione di marcatori molecolari per la diagnosi precoce e di meccanismi di cancerogenesi polmonare. L'intento di questi studi è la messa a punto di test molecolari altamente sensibili e relativamente semplici per un pannello di biomarcatori potenzialmente utilizzabili in trials su larga scala per la diagnosi precoce e il monitoraggio di pazienti con NSCLC.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Identificazione di nuovi marcatori molecolari di interesse prognostico o diagnostico.

Risultati e prodotti 2009

I cambiamenti avvenuti all'interno della struttura, hanno determinato un avvicendamento riguardante il responsabile scientifico del progetto. La ricerca ha pertanto subito un periodo di arresto per poi riprendere con regolarità da Ottobre 2009.

In collaborazione con la S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica e la S.C. Chirurgia Toracica dell'Istituto, sono stati raccolti circa 30 campioni di tessuto polmonare neoplastico di cui: 7 carcinomi squamosi, 11 adenocarcinomi e 12 neoplasie di diversa origine. Una parte di tessuto è stato immediatamente congelato in azoto liquido per permettere valutazioni molecolari successive. Il restante tessuto è stato sottoposto a dissociazione meccanica al fine di ottenere una sospensione vitale e sufficientemente cellulata. Una parte di tale sospensione è stata coltivata in un terreno selettivo privo di siero bovino fetale (serum-free) ma addizionato con diversi fattori di crescita utili al sostentamento di cellule con caratteristiche di "staminalità". Una parte equivalente di sospensione è stata invece coltivata in semplice terreno contenente 10% siero bovino fetale con lo scopo di ottenere linee cellulari primarie in vitro. In alcuni casi, una quota di cellule veniva inoculata, sottocute o in ortotopico in topi NOD/SCID per verificare eventuali sviluppi tumorali. Circa 20 colture cellulari primarie (alcune coltivate per numerosi passaggi) sono state ottenute e congelate a vari stadi di crescita. Tuttavia le sospensioni coltivate in terreno serum-free, hanno mostrato una crescita molto lenta e non sufficientemente cellulata per poter isolare fino ad oggi una componente "staminale" (presente in circa 1-3% della popolazione cellulare). Inoltre, di 11 animali inoculati con queste cellule tumorali tissutali, 2 hanno sviluppato una piccola neoplasia.

L'isolamento di cellule CD133+ (circa 1-3% della popolazione totale) è stato invece ottenuto impiegando una linea continua di adenocarcinoma polmonare A549 mantenuta in terreno selettivo e non. Inoltre diluizioni variabili di cellule (100-1000-10000) sono state inoculate ortotopicamente in animali immunodepressi per verificarne il potenziale sviluppo tumorale con un limitato numero cellulare.

Pubblicazioni

Gangemi R.-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. 16:1688-1703, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Obiettivo della ricerca in corso sarà l'isolamento e l'identificazione da NSCLC primari della componente cellulare a potenzialità staminale selezionate direttamente dal tumore primario o da colture a breve termine (in terreno serum-free) sulla base: 1) dell'espressione di marcatori fenotipici di "staminalità" (es. CD133/Esa, CD44/Esa) tramite FACS; 2) della capacità di indurre tumore in topi immunodepressi quando trapiantate a bassa densità (<1000 cellule); 3) della farmaco resistenza in relazione alla componente cellulare non "staminale" mediante test di citotossicità e valutazione dell'espressione di proteine trasportatori di membrana (MDR, ABCG etc.) con Western Blot e FACS.

Il progresso di questo progetto è comunque dipendente dal rinnovo dei finanziamenti di ricerca ottenuti per il suo svolgimento.

Studio di fase II randomizzato di terapia neoadiuvante personalizzata verso chemioterapia standard in pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule in stadio IIIA (N2) reseccabile

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: Francesco Grossi

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Carlotta Defferrari, Annalisa Brianti, Carola Massoni, Maria Giovanna Dal Bello

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: tumore polmonare non a piccole cellule; terapia neoadiuvante; chemioterapia; terapie biologiche; fattori predittivi di risposta

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Chirurgia Toracica (G.B. Ratto); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini); S.S. Chirurgia Toracica Universitaria (M. Taviani); S.C. Genetica dei Tumori (M. Romani); S.C. Epidemiologia, Biostatistica e Clinical Trials (D.F. Merlo)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica sperimentale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Background

Il trattamento standard nei pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule in stadio IIIA con interessamento dei linfonodi mediastinici omolaterali al tumore (N2) prevede, nel caso sia possibile un intervento chirurgico, una chemioterapia neoadiuvante che precede l'intervento stesso. Gli schemi di chemioterapia utilizzati nella pratica clinica prevedono una combinazione a due farmaci contenente platino (cisplatino o carboplatino) in associazione ad un farmaco di terza generazione (docetaxel, gemcitabina, paclitaxel o vinorelbina). Nonostante si ottenga una risposta alla chemioterapia in circa il 60% dei pazienti e all'intervento chirurgico il tasso di risposte patologiche complete sia intorno al 10%, la sopravvivenza a 5 anni viene raggiunta solo dal 25% dei pazienti. Studi recenti hanno dimostrato che il maggior beneficio dal trattamento chemioterapico e chirurgico si ha nei pazienti che hanno avuto un downstaging della malattia a livello linfonodale dopo chemioterapia, i pazienti che non hanno ottenuto un downstaging possono beneficiare maggiormente da un trattamento radioterapico al posto della chirurgia dopo la chemioterapia.

Negli ultimi anni l'avanzamento delle conoscenze nel trattamento dei NSCLC ha consentito di personalizzare maggiormente la terapia medica nei pazienti in stadio avanzato. Oggi il trattamento di questa neoplasia è determinato dal tipo istologico. È stato dimostrato che nei pazienti con adenocarcinoma o carcinoma a grandi cellule si ottiene una migliore sopravvivenza se si utilizza una combinazione di cisplatino + pemetrexed rispetto allo standard cisplatino + gemcitabina che al contrario consente di ottenere una migliore sopravvivenza nell'istotipo squamoso. Il perché di questa differenza in efficacia di pemetrexed è dovuta probabilmente ai differenti livelli di espressione di un enzima, la timidilato sintetasi, nei diversi istotipi e che correlano con la risposta al trattamento con pemetrexed. Altre combinazioni come cisplatino + docetaxel sembrano dare risultati simili in tutti gli istotipi. Più recentemente è stato dimostrato come la presenza di mutazioni dell'epidermal growth factor receptor (EGFR) correlino con la risposta agli inibitori di EGFR (erlotinib e gefitinib). Uno studio di fase III randomizzato in pazienti affetti da NSCLC in stadio avanzato ha dimostrato un tasso di risposta a gefitinib del 70% vs 40% alla chemioterapia nei pazienti con mutazione di EGFR dimostrando quindi come, in pazienti selezionati per la positività alla mutazione di EGFR, sia razionale utilizzare un inibitore di EGFR al posto della tradizionale chemioterapia come trattamento di prima linea. Altri fattori predittivi di risposta che hanno dimostrato di poterci aiutare a selezionare meglio lo schema chemioterapico da somministrare nel NSCLC in stadio avanzato sono l'espressione degli enzimi ERCC1 e RRM1. Bassi livelli di ERCC1 correlano con una maggior risposta al cisplatino mentre bassi livelli di RRM1 correlano con una maggior risposta alla gemcitabina. Questi risultati ottenuti nel NSCLC in stadio avanzato sono di grande interesse anche nel setting di terapia neoadiuvante in cui il downstaging quindi la risposta al trattamento condizionano la sopravvivenza nei pazienti operati in stadio IIIA (N2).

Lo studio proposto in questo progetto prevede di reclutare 168 pazienti con NSCLC in stadio IIIA (N2) operabili che saranno randomizzati (2:1) ad un braccio di trattamento standard con cisplatino+docetaxel vs una terapia personalizzata scelta sulla base della presenza o meno di mutazioni di EGFR, dell'espressione di TS, ERCC1 ed RRM1. Nel braccio sperimentale dello studio sulla base della valutazione dei fattori predittivi di risposta il paziente potrà essere trattato con uno dei seguenti schemi: gefitinib, cisplatino+pemetrexed, cisplatino+gemcitabina, cisplatino+docetaxel, docetaxel+ gemcitabina, docetaxel+vinorelbina.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo primario di questo studio è confrontare il tasso di risposte patologiche complete (RPC) che si ottengono con una terapia personalizzata sulla base della valutazione di fattori predittivi di risposta a determinati farmaci verso le RPC che si hanno da un trattamento standard. Secondariamente si valuteranno i tassi di risposta alla terapia neoadiuvante, la sopravvivenza libera da malattia (DFS), la sopravvivenza globale (OS) e la tossicità dei trattamenti studiati.

Impatto assistenziale certo o potenziale

La dimostrazione di una maggiore efficacia della terapia personalizzata ci consentirà di selezionare meglio i trattamenti neoadiuvanti con una potenziale ricaduta sulla sopravvivenza di questi pazienti.

Risultati e prodotti 2009

Lo studio prevede la selezione del trattamento nel braccio sperimentale attraverso un algoritmo decisionale che tiene conto di alcuni marcatori predittivi di risposta a chemioterapici e a farmaci biologici.

Nel corso del 2009 è stato scritto il protocollo, attualmente in fase di approvazione, e sono state messe a punto le metodiche per la determinazione di alcuni marcatori predittivi di risposta che verranno impiegati nello studio clinico, utilizzando tecniche di immunoistochimica e biologia molecolare. In particolare, sono stati valutati retrospettivamente, su una casistica di pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC) in stadio I-II e IIIA, i seguenti marcatori: ERCC1, BRCA1, Timidilato sintetasi (TS), Beta tubulina III (bTubIII), RRM2, p53R2. Per questa valutazione è stata utilizzata la tecnica dei tissue microarray (TMA) che ha consentito una più facile standardizzazione della metodica. Per quanto riguarda la valutazione delle mutazioni di EGFR e K-RAS si sono utilizzati metodi di biologia

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

molecolare su una casistica di pazienti già trattati con inibitori di EGFR e in cui era già nota la presenza o meno di queste mutazioni determinata in precedenza in un altro laboratorio (Prof. Fontanini, Università di Pisa).

I risultati ottenuti nel primo gruppo di pazienti sono in linea con quanto emerso dalla letteratura. La valutazione di ERCC1, BRCA1, TS, bTubIII, RRM2 e p53R2 è stata eseguita su 82 pazienti. In circa il 10% dei casi si sono riscontrati problemi tecnici (prevalentemente per perdita del campione di tessuto, mancanza di un sufficiente numero di cellule tumorali, etc.) che non hanno consentito una corretta valutazione del marcatore. Per quanto riguarda i risultati ottenuti: si è confermato un alto livello di TS nei pazienti con istotipo squamoso, significativamente superiore a quanto riscontrato nei pazienti con adenocarcinoma, al contrario, si è vista una significativa maggiore espressione di p53R2 negli adenocarcinomi rispetto agli squamosi. Si è anche dimostrata una significativa maggiore espressione della bTubIII negli stadi precoci di malattia. Per la parte riguardante le mutazioni di EGFR e K-RAS i risultati del nostro laboratorio sono in linea con quanto visto in altro centro.

Questa prima fase è stata propedeutica all'inizio dello studio in quanto era importante valutare l'attendibilità delle metodiche prima di impiegarle per valutare quale trattamento selezionare. La qualità e l'attendibilità dei risultati ottenuti ci consente di passare alla fase successiva dello studio.

Presentazioni a congressi

Grossi F.-Merlo D.F.-Salvi S.-Bordo D.-Genova C.-Rijavec E.-Taviani M.-Pronzato P.-Ratto G.B.-Truini M.
ERCC1, BRCA1, thymidylate synthase (TS), class III beta tubulin(bTubIII), p53R2, RRM2 immunohistochemical expression in stage I-III non-small cell lung cancer (NSCLC): a tissue microarray (TMA) study
ASCO 2010, submitted

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Per l'anno 2010 è prevista l'approvazione del protocollo da parte dei centri coinvolti nello studio e il reclutamento della metà dei pazienti. Attualmente è in corso di valutazione la possibilità di utilizzare il tessuto disponibile per lo screening iniziale del paziente per eventuali studi ancillari che vadano a valutare fattori prognostici e predittivi di risposta non noti. Queste ultime analisi verranno pianificate nel 2010 ma eseguite retrospettivamente nel 2011 ad accrual ultimato.