

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**PROGRAMMA STRAORDINARIO ONCOLOGIA 2006**  
**Art. 3 “Rete nazionale solidale**  
**e collaborazioni internazionali (ISS per ACC)”**  
**Consuntivo dell’attività scientifica**  
**(2007-2008)**

A cura di

Filippo Belardelli (a), Maria Romero (b) e Franca Moretti (a)

*(a) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Alleanza Contro il Cancro, Roma*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**09/1**

Istituto Superiore di Sanità

**Programma Straordinario Oncologia 2006. Art. 3 “Rete nazionale solidale e collaborazioni internazionali (ISS per ACC)”. Consuntivo dell’attività scientifica (2007-2008).**

A cura di Filippo Belardelli, Maria Romero e Franca Moretti

2009, vi, 158 p. Rapporti ISTISAN 09/1

Con il DM 21 luglio 2006, il Ministero della Salute ha lanciato il “Programma Straordinario Oncologia 2006” e, tramite l’art. 3 (“Rete nazionale solidale e collaborazioni internazionali”), sono state tracciate le linee di un intervento globale per favorire una nuova strategia di collaborazione tra i membri di Alleanza contro in cancro (ACC) attraverso lo sviluppo di progetti coordinati per l’oncologia. L’art. 3 stabilisce, infatti, l’assegnazione all’Istituto Superiore di Sanità (ISS) di 30 milioni di euro per attuare quattro programmi oncologici con finalità diverse ma complementari. Nel corso del primo anno (2007-2008) il programma ha permesso di promuovere nuove sinergie attraverso la condivisione delle migliori competenze, conoscenze e capacità in diversi campi dell’oncologia. Questo volume contiene il consuntivo dell’attività scientifica relativa all’art. 3 del programma (presentate al convegno tenutosi a Roma il 9-10 febbraio 2009) sullo stato di avanzamento dei lavori e testimonia l’ampiezza delle iniziative a livello nazionale e internazionale e la qualità del livello scientifico dei progetti di ricerca avviati.

*Parole chiave:* Oncologia, Ricerca biomedica, Servizio Sanitario Nazionale

Istituto Superiore di Sanità

**2006 Extraordinary Oncology Programme. Art. 3 “National Support Network and International Cooperation (ISS for ACC)”. 2007-2008 Report on Scientific Activity.**

Edited by Filippo Belardelli, Maria Romero and Franca Moretti

2009, vi, 158 p. Rapporti ISTISAN 09/1 (in Italian)

On July 21<sup>st</sup>, 2006, the Ministry of the Health issued a ministerial decree launching a national initiative called the “2006 Extraordinary Oncology Programme”. In particular, the article 3 of the decree (“National Support Network and International Cooperation”) established a national agenda to favour a new strategy of collaboration between the members of ACC. Moreover, the article 3 granted an allocation of 30 million euro to the Istituto Superiore di Sanità (ISS, the National Institute of Health in Italy) to implement four oncology programmes with various but complementary purposes. During the first year (2007-2008), the initiative has allowed to promote new synergies through the sharing of best skills, knowledge and competence in various fields of oncology. This volume reports the main results of the scientific activities carried out by each partner project (presented during a conference held in Rome on 9-10 February 2009) and testifies the quality of the scientific level and the scope of the initiatives at national and international level.

*Key words:* Oncology, Biomedical research, National Health Service

Per informazioni su questo documento scrivere a: [franca.moretti@iss.it](mailto:franca.moretti@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Belardelli F, Romero M, Moretti F (Ed.). *Programma Straordinario Oncologia 2006. Art. 3 “Rete nazionale solidale e collaborazioni internazionali (ISS per ACC)”. Consuntivo dell’attività scientifica (2007-2008)*. Roma: Superiore di Sanità; 2009. (Rapporti ISTISAN 09/1).

---

Presidente dell’Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2009

# INDICE

<b>Lista delle abbreviazioni</b> .....	iii
<b>Presentazione</b> .....	v
<b>Introduzione</b> .....	1

## **PROGRAMMA 1**

### **Riduzione delle disparità nell'accesso dei pazienti ai mezzi diagnostici e alle terapie**

Qualità di vita e ICF in pazienti oncologici <i>Giuseppina Majani, Anna Giardini, Anna Prevedini</i> .....	7
Metastasi ossee: miglioramento della qualità di vita e di assistenza <i>Stefano Liverani</i> .....	10
Modelli interdisciplinari d'intervento per la cura dei pazienti oncologici in età geriatrica <i>Umberto Tirelli</i> .....	12
Database clinico e biobanca per lo studio di pazienti oncologici anziani e delle patologie età-correlate <i>Fiorella Guadagni, Francesco Schittulli</i> .....	15
Approccio socio-assistenziale alle problematiche del paziente oncologico anziano <i>Stefano Vella</i> .....	19
Comunicazione e strutture informative in oncologia <i>Stefano Vella</i> .....	25
Basi scientifiche per la definizione di linee guida in oncologia <i>Rosella Silvestrini</i> .....	29
Portale di Alleanza Contro il Cancro <i>Paolo Roazzi, Claudio Di Benedetto</i> .....	32

## **PROGRAMMA 2**

### **Integrazione delle attività di ricerca attraverso la costruzione di strutture e reti di collaborazione interistituzionali**

Rete nazionale biobanche per l'oncologia <i>Angelo Paradiso, Giovanni Migliaccio</i> .....	37
Rete nazionale per studi clinici e di strutture GMP per le bioterapie dei tumori <i>Giorgio Parmiani, Enrico Proietti</i> .....	41
Rete nazionale "Progetto START": stato dell'arte in oncologia <i>Lisa Licitra, Ruggero De Maria</i> .....	47
Rete nazionale dei registri tumori: indicatori e controllo del cancro in Italia <i>Riccardo Capocaccia, Marina Vercelli, Eugenio Paci, Piero Picci</i> .....	51
Rete nazionale su modelli sperimentali e "facilities" animali <i>Gennaro Citro, Stefano Fais</i> .....	55
Network nazionale italiano Tumori Eredo-Famigliari (InTEF) <i>Paolo Radice, Liliana Varesco, Franca Podo, Margherita Bignami</i> .....	58
Rete Nazionale di Bioinformatica Oncologica (RNBIO) <i>Paolo Romano, Marco Crescenzi</i> .....	63
Rete nazionale telepatologia (TESEO) <i>Antonino Carbone, Claudio Di Benedetto</i> .....	69
Rete nazionale per la cura e la ricerca dei sarcomi muscoloscheletrici <i>Piero Picci, Ferdinando Cornelio</i> .....	72

### PROGRAMMA 3

#### Trasferimento delle conoscenze allo sviluppo di interventi volti a prevenire, diagnosticare e trattare il cancro: presentazione dei progetti

Nuove molecole dell'infiammazione: trasferimento dal laboratorio al letto del paziente <i>Alberto Mantovani</i> .....	77
Base molecolare delle malattie mieloproliferative croniche e sviluppo di nuove terapie <i>Mario Cazzola</i> .....	83
Immunoterapia con il peptide EGFRvII nel Glioblastoma multiforme e in altri tumori solidi <i>Gaetano Finocchiaro</i> .....	89
Sviluppo vaccini idiotipici per studi di fase I-II di immunoterapia "subset specifica" per pazienti con disordini linfoproliferativi a cellule B <i>Riccardo Dolcetti</i> .....	93
Applicazione della chemioterapia alla rimodulazione della risposta immune antitumorale: studio dei meccanismi e "proof of concept" nell'uomo <i>Enrico Proietti</i> .....	100
Identificazione di marcatori per la predizione della risposta a nuovi farmaci antitumorali (inibitori di HDAC, tirosino chinasi e pompe ioniche) <i>Pier Giuseppe Pelicci</i> .....	105
Il microambiente tumorale come bersaglio terapeutico <i>Alessandro Gianni</i> .....	110
Sviluppo di nuovi farmaci capaci di alterare il microambiente tumorale e ripristinare la risposta immune anti-tumorale <i>Vincenzo Bronte</i> .....	115
Recettori per chemochine come marcatori biologici e molecolari di risposta clinica e target diagnostico terapeutico <i>Stefania Scala</i> .....	122
Sviluppo di nuove terapie nei sarcomi muscoloscheletrici: immunoterapia e target terapia a confronto <i>Piero Picci</i> .....	127
Terapie biologiche combinate e personalizzate nei tumori solidi: studi di fase I-II <i>Giorgio Parmiani</i> .....	131
Nuove molecole e peptidi quali farmaci regolatori del ciclo cellulare e della risposta a chemioterapici nei tumori epiteliali e cutanei <i>Gerry Melino</i> .....	136

### PROGRAMMA 4

#### Promozione della collaborazione internazionale con particolare riferimento a quella europea

Programma 4 dell'art. 3 DM 21 luglio 2006: le basi razionali dell'intervento <i>Claudio Lombardo, Francesca d'Alessandro, Franca Moretti, Tania Rondanina, Maria Ferrantini, Filippo Belardelli</i> .....	143
Programma 4 del DM ISS per ACC: Relazione consuntiva 2008 e programmatica 2009 <i>Claudio Lombardo, Filippo Belardelli</i> .....	148
Consuntivo delle attività congressuali, letture plenarie, attività propedeutica alla realizzazione di incontri scientifici, pubblicazioni <i>Claudio Lombardo, Filippo Belardelli</i> .....	156

## LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

ACC	Alleanza contro il Cancro
AIFA	Agenzia Italiana del Farmaco
AIMaC	Associazione Italiana Malati di Cancro, parenti e amici
AIRT	Associazione Italiana Registri Tumori
Besta	Fondazione IRCCS Istituto Neurologico “Carlo Besta”
CNR	Consiglio Nazionale delle Ricerche
CRO	Centro di Riferimento Oncologico, Aviano
FAVO	Federazione italiana delle Associazioni di Volontariato in Oncologia
HSR	Istituto Scientifico Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor
Humanitas	IRCCS Istituto Clinico Humanitas
IDI	Istituto Dermopatico dell’Immacolata
IEO	Istituto Europeo di Oncologia
INT	Fondazione IRCCS “Istituto Nazionale Tumori” Milano
IOR	Istituti Ortopedici Rizzoli
IOV	Istituto Oncologico Veneto (IRCCS)
IRCCS	Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico
IRE	Istituto Nazionale Tumori Regina Elena
IRST	Istituto Romagnolo Scientifico per lo Studio e la Cura dei Tumori
ISO	Istituto Superiore di Oncologia
ISS	Istituto Superiore di Sanità
ISTGE	Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro Genova
ITB	Istituto Tumori Giovanni Paolo II Bari
LILT	Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori
Maugeri	Fondazione Salvatore Maugeri IRCCS
Pascale	Istituto Tumori di Napoli Fondazione G. Pascale
S. Matteo	Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo di Pavia
S. Giovanni Rotondo	IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza - San Giovanni Rotondo



## PRESENTAZIONE

Consapevoli della necessità di sviluppare strategie idonee a tradurre i rapidi progressi delle conoscenze in applicazioni cliniche che soddisfino le aspettative dei pazienti e della società, i governi nazionali incoraggiano e sostengono la costruzione di strutture e reti finalizzate all'ottimizzazione e al coordinamento delle risorse destinate alla ricerca biomedica e agli interventi di sanità pubblica. L'importanza di questa tendenza è dimostrata dalle molteplici iniziative nazionali e internazionali che, spinte dal dibattito aperto dalle Istituzioni europee, sono state messe in atto per promuovere interventi di ricerca traslazionale che possano stimolare la collaborazione tra gli attori coinvolti nella ricerca biomedica al fine di ridurre l'attuale frammentazione e favorire l'attivazione di processi di coordinamento.

Alleanza contro il Cancro (ACC) è il primo esempio di rete monotematica degli istituti di ricerca del Servizio Sanitario Nazionale. ACC rappresenta oggi un modello di iniziativa nazionale indicata come esempio anche in consuntivi di importanti progetti europei (es. EUROCAN+PLUS). L'interesse nazionale e internazionale verso ACC è cresciuto in questi ultimi anni anche grazie agli sviluppi nazionali in tema di politiche e interventi di ricerca che hanno assegnato all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) il compito di sostenere lo sviluppo di progetti funzionali all'implementazione di funzioni tipiche di ACC stessa. In particolare, tramite l'art. 3 del DM 21 luglio 2006, decreto con il quale il Ministero della Salute ha lanciato il "Programma Straordinario Oncologia 2006", sono state tracciate le linee e i contenuti di un piano di intervento globale che potesse favorire la collaborazione tra ACC e ISS per lo sviluppo armonioso della ricerca oncologica italiana. L'articolo 3 intitolato "Rete nazionale solidale e collaborazioni internazionali" stabiliva, infatti, l'assegnazione all'ISS di 30 milioni di euro per attuare quattro programmi oncologici con finalità diverse ma complementari.

I progetti finanziati hanno terminato il primo anno di attività nell'ottobre 2008.

Grazie al sostegno organizzativo dell'ISS, ACC ha già organizzato due convegni di presentazione dei progetti approvati nell'ambito dell'art 3 del DM 21 luglio 2006 ("ISS per ACC").

Il convegno – Sviluppo della rete oncologica nazionale per il progresso della ricerca sanitaria - Programma Straordinario Oncologia 2006 "Rete Nazionale Solidale e Collaborazioni Internazionali" (ISS per ACC) Consuntivo attività scientifica 2007-2008 –, che si tiene a Roma presso l'ISS il 9-10 febbraio 2009, ha una duplice finalità:

- i) sviluppare una riflessione generale sull'importanza delle reti monotematiche degli IRCCS alla luce dell'evoluzione del panorama nazionale e internazionale della ricerca biomedica e della recente esperienza di ACC;
- ii) presentare e monitorare i progressi delle varie attività recentemente intraprese nell'ambito del primo anno di finanziamento promosso con l'art. 3 del DM 21 luglio 2006 ("ISS per ACC").

Il consuntivo scientifico del primo anno di attività, le iniziative promosse e i risultati ottenuti raccolti nel presente volume mostrano la ricchezza di azioni miranti a promuovere la cooperazione e l'interazione tra gli IRCCS e l'impatto delle iniziative di ACC a livello nazionale e internazionale. L'analisi dei risultati ottenuti evidenzia elementi di successo ma anche alcuni aspetti critici relativi all'interazione tra le parti interessate e al controllo e valutazione delle attività svolte. Da questa analisi potranno pertanto scaturire soluzioni convincenti per proseguire un percorso che pone le basi su una programmazione concertata e consapevole della realtà internazionale dalla quale non si può prescindere se si vuole consentire

al Paese di svolgere un ruolo da protagonista nel contesto di sviluppo globale della ricerca biomedica e delle applicazioni industriali. Ridurre gli individualismi a favore della concertazione non significa disconoscere la meritocrazia ma consentire ai migliori scienziati di essere veri leader in un Paese che vuole dimostrare come il rispetto della qualità, l'organizzazione e la conoscenza degli strumenti siano condizioni necessarie a potenziare la competitività, l'integrazione e l'occupazione. Se verranno rispettate queste condizioni, il percorso di crescita di ACC potrà proseguire e essere implementato nelle forme più opportune, aumentando il prestigio dell'associazione nel contesto nazionale e internazionale.

Enrico Garaci

*Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità  
e Presidente di Alleanza Contro il Cancro*



## INTRODUZIONE

L'art. 3 del DM 21 luglio 2006 ha designato l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) quale destinatario dei fondi e coordinatore delle attività di Alleanza Contro il Cancro (ACC) relative alla "Rete nazionale solidale e relazioni internazionali". Tale articolo stabiliva l'assegnazione all'ISS di 30 milioni di euro per attuare quattro programmi oncologici con finalità diverse ma complementari. Tutti i programmi sono stati discussi e approvati dal Comitato Direttivo di ACC. In particolare il 24 gennaio 2007 il Comitato Direttivo di ACC approva la proposta di suddivisione del Programma Straordinario Oncologico 2006 nei 4 programmi di seguito descritti.

Il Programma 1, "Riduzione delle disparità nell'accesso dei pazienti ai mezzi diagnostici e alle terapie" – coordinato da L.G. Spagnoli (ACC), S. Vella (ISS) –, si prefigge di predisporre gli strumenti necessari per migliorare la qualità della vita dei pazienti mediante il coinvolgimento di competenze epidemiologiche, cliniche e assistenziali, attuare modelli organizzativi più adatti di quelli attuali alla gestione del paziente oncologico anziano e migliorare la comunicazione tra ricercatori, medici oncologi, pazienti e società in generale con riferimento particolare alle terapie sperimentali. Per soddisfare quanto indicato dal DM 21 luglio 2006 per il Programma 1, ACC ha individuato e già parzialmente realizzato un'azione concertata che prevede interventi progettuali riferiti ai seguenti argomenti: a) qualità della vita dei pazienti oncologici; b) gestione del paziente oncologico anziano; c) miglioramento della comunicazione a livello nazionale. I sette *Work Package* (WP) (alcuni dei quali hanno subito un'ulteriore articolazione) necessari a raggiungere gli obiettivi (generali e specifici) sono indicati nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del Programma 1 (Finanziamento: 4.000.000 €)**

Titolo dei WP		Coordinatori (ente di appartenenza)	Finanziamento (in euro)
WP1	Coordinamento	Luigi Giusto Spagnoli (ACC)	0,00
WP2	Qualità di vita e ICF in pazienti oncologici	Giuseppina Majani (Maugeri)	940.000,00
	Metastasi ossee: miglioramento della qualità di vita e di assistenza	Stefano Liverani (IOR)	50.000,00
WP3	Modelli interdisciplinari di intervento per la cura dei pazienti oncologici in età geriatrica	Umberto Tirelli (CRO)	500.000,00
	Database clinico e biobanca per lo studio di pazienti oncologici anziani e delle patologie età-correlate	Fiorella Guadagni (LILT)	200.000,00
WP4	Approccio socio-assistenziale alle problematiche del paziente oncologico anziano	Stefano Vella (ISS)	700.000,00
WP5	Comunicazione e strutture informative	Stefano Vella (ISS), Francesco De Lorenzo (AIMaC), Ivana Truccolo (CRO), Stefano Michellini (IEO)	1.080.000,00
WP6	Studio e attività di comunicazione sulle basi scientifiche per la definizione di linee guida in ambito clinico per le diverse patologie oncologiche	Luigi Giusto (ACC) Spagnoli, Rossella Silvestrini (INT)	300.000,00
WP7	Sistema informativo e portale ACC	Claudio Di Benedetto (ISS)	230.000,00

Il Programma 2, “Integrazione delle attività di ricerca attraverso la costruzione di strutture e reti di collaborazione interistituzionali” – coordinato da M. Pierotti (INT) –, ha la finalità di costituire reti nazionali ritenute prioritarie per lo sviluppo della ricerca e la promozione dell’innovazione.

Nell’ambito del Programma 2, sono state considerate prioritarie quelle reti nazionali funzionali a facilitare il lavoro degli IRCCS oncologici e a favorire la realizzazione e l’integrazione di reti regionali e interregionali che possano svilupparsi nel contesto di una progettualità nazionale ispirata al disegno europeo e quindi in sinergia con il Programma 4, il cui obiettivo è la promozione della partecipazione a progetti di coordinamento europeo (ERANET) e alle fasi preparatorie e di costruzione delle Infrastrutture di Ricerca nel settore delle scienze biomediche indicate dalla *roadmap* presentata dal Forum Strategico Europeo (ESFRI) nell’ambito del 7° Programma Quadro della Commissione Europea. I progetti di rete selezionati per il finanziamento, insieme con l’indicazione dei coordinatori e dei referenti istituzionali corrispondenti sono elencati nella Tabella 2.

**Tabella 2. Reti finanziate nell’ambito del Programma 2 (Finanziamento: 5.200.000 €)**

<b>Titolo della rete</b>	<b>Coordinatori (ente di appartenenza)</b>	<b>Finanziamento (in euro)</b>
Rete nazionale biobanche per l’oncologia	Giovanni Migliaccio (ISS) Angelo Paradiso (ICB)	540.000,00
Rete nazionale per studi clinici e di strutture GMP per le bioterapie dei tumori	Enrico Proietti (ISS) Giorgio Parmiani (HSR)	800.000,00
Rete nazionale “Progetto START”: stato dell’arte in oncologia	Ruggero De Maria (ISS) Lisa Licitra (INT)	480.000,00
Rete nazionale dei registri tumori: indicatori e controllo del cancro in Italia	Riccardo Capocaccia (ISS) Eugenio Paci (AIRT) Piero Picci (IOR) Marina Vercelli (ISTGE)	450.000,00
Rete nazionale su modelli sperimentali e “facilities” animali	Stefano Fais (ISS) Gennaro Citro (IFO)	690.000,00
Network nazionale italiano Tumori Eredo-Famigliari (inTEF): creazione di strumenti operativi condivisi per l’assistenza e la ricerca	Franca Podo/Margherita Bignami (ISS) Paolo Radice (INT) Liliana Varesco (ISTGE)	720.000,00
Rete nazionale di Bioinformatica Oncologica (RNBIO)	Mario Crescenzi (ISS) Paolo Romano (IST)	720.000,00
Rete nazionale telepatologia (TESEO)	Antonino Carbone (INT) Claudio Di Benedetto (ISS)	700.000,00
Rete nazionale per la cura e la ricerca dei sarcomi muscoloscheletrici	Piero Picci (IOR) – Ferdinando Cornelio (Besta)	100.000,00

Il Programma 3, “Trasferimento delle conoscenze allo sviluppo di interventi volti a prevenire, diagnosticare e trattare il cancro (trial nazionali in terapie innovative e in prevenzione, e in terapie non d’interesse industriale in collaborazione con AIFA)” – coordinato da F. Belardelli (ISS) e P.G. Pelicci (IEO) –, si prefigge di promuovere lo sviluppo di terapie innovative in oncologia stimolando l’avvio di studi clinici di fase I che in Italia sono sensibilmente inferiori in numero rispetto ad altri Paesi avanzati. Tale ritardo non è da addebitarsi ad una carenza della ricerca oncologica, quanto alla mancanza di finanziamenti specifici a sostegno delle ultime fasi della ricerca pre-clinica, delle

infrastrutture tecnologiche di supporto alla ricerca clinica (piattaforme tecnologiche, laboratori GMP) e della formazione di personale specializzato e del coordinamento di tutti gli “attori” potenzialmente coinvolti, compresi i rappresentanti delle agenzie regolatorie. È risultato quindi prioritario avviare un progetto nazionale (*task force*) che potesse favorire la promozione del trasferimento alla clinica dei risultati della ricerca di base e pre-clinica (con particolare riferimento all’identificazione di marcatori biologici e molecolari di predizione della risposta alle nuove terapie) e lo sviluppo di sperimentazioni di terapie oncologiche innovative (studi di fase I e I-II su nuovi farmaci cellulari e molecolari e sulla combinazione con chemioterapia o radioterapia).

Il Programma 3 sostiene interventi di ricerca finalizzata allo sviluppo di strategie innovative per la terapia e la prevenzione secondaria dei tumori articolandosi su due aree tematiche principali: i) Terapie innovative antitumorali con nuove molecole; ii) Bioterapia dei tumori.

I progetti, selezionati per il finanziamento mediante ricorso a valutazioni di esperti indipendenti, insieme con l’indicazione del destinatario istituzionale proponente e delle unità operative partecipanti, sono elencati nella Tabella 3. Le brevi relazioni del primo anno raccolte in questo volume già dimostrano la produttività in termini sia di pubblicazioni che di studi clinici avviati o in fase di avvio.

**Tabella 3. Progetti finanziati nell’ambito del Programma 3 (Finanziamento: 16.000.000 €)**

<b>Titolo del progetto</b>	<b>Coordinatori (ente di appartenenza)</b>	<b>Finanziamento (in euro)</b>
Nuove molecole dell’infiammazione: trasferimento dal laboratorio al letto del paziente	Alberto Mantovani (Humanitas)	1.100.000,00
Base molecolare delle malattie mieloproliferative croniche e sviluppo di nuove terapie	Mario Cazzola (S. Matteo)	300.000,00
Immunoterapia con il peptide EGFRvII nel Glioblastoma multiforme e in altri tumori solidi	Gaetano Finocchiaro (Besta)	750.000,00
Sviluppo vaccini idiotipici per studi di fase I-II di immunoterapia “subset specifica” per pazienti con disordini lifoproliferatrici a cellule b	Riccardo Dolcetti (CRO)	1.600.000,00
Applicazione della chemioterapia alla rimodulazione della risposta immune antitumorale: studio dei meccanismi e “proof of concept” nell’uomo	Enrico Proietti (ISS)	1.800.000,00
Identificazione di marcatori per la predizione della risposta a nuovi farmaci antitumorali (inibitori di HDAC, tirosino chinasi e pompe ioniche)	Pier Giuseppe Pelicci (IEO)	2.700.000,00
Il microambiente tumorale come bersaglio terapeutico	Alessandro M. Gianni (INT)	2.700.000,00
Sviluppo di nuovi farmaci capaci di alterare il microambiente tumorale e ripristinare la risposta immune anti-tumorale	Vincenzo Bronte (IOV)	1.200.000,00
Recettori per Chemochine come marcatori biologici e molecolari di risposta clinica e target diagnostico terapeutico	Stefania Scala (Pascale)	1.100.000,00
Sviluppo di nuove terapie nei sarcomi muscoloscheletrici: immunoterapia e target terapia a confronto.	Piero Picci (IOR)	500.000,00
Terapie biologiche combinate e personalizzate nei tumori solidi: Studi di fase I-II	Giorgio Parmiani (HSR)	1.400.000,00
Nuove molecole e peptidi quali farmaci regolatori del ciclo cellulare e della risposta a chemioterapici nei tumori epiteliali e cutanei	Gerry Melino (IDI)	850.000,00

Il Programma 4, “Promozione della collaborazione internazionale con particolare riferimento a quella europea” – coordinato da F. Belardelli (ISS) e C. Lombardo (ISTGE) –, ha come obiettivo principale quello di promuovere il processo di internazionalizzazione delle reti individuate nel Programma 2 per potenziare il trasferimento di competenze eccellenti verso programmi trans-nazionali e aumentare l’attrattiva dei nostri centri d’eccellenza tanto per i ricercatori che operano in istituzioni di ricerca estere, in particolare europee, quanto per l’industria.

Il Programma 4 ambisce a creare le condizioni necessarie a sviluppare in maniera sistematica l’abitudine a collaborare stabilendo interfacce formali con le istituzioni omologhe ad ACC presenti in altri Paesi e con i progetti europei d’interesse oncologico in atto o in fase di progettazione. Per sostenere il divenire continuo del Programma è stato istituito un *Focal Point International Affairs* che potesse rendere anche disponibili i servizi necessari a realizzare il processo di internazionalizzazione istituzionale per gli aspetti di informazione, formazione, ricerca e trasferimento, stimolando le reti di eccellenza a partecipare a programmazioni sovranazionali anche tramite piccoli finanziamenti per le attività preparatorie. L’ufficio rappresenta anche il punto di riferimento per raccogliere suggerimenti provenienti dai membri ACC e formulare indicazioni da trasferire al direttivo dell’associazione tramite la supervisione del Segretariato di ACC e dell’ISS.

Il Programma 4 è articolato nelle seguenti attività:

**Tabella 4. Attività nell’ambito del Programma 4 (Finanziamento: 3.200.000 €)\***

<b>Coordinatori (ente di appartenenza)</b>	<b>Titolo dell’attività</b>	<b>Finanziamento (in euro)</b>
Filippo Belardelli (ISS) Claudio Lombardo (ISTGE)	<i>Focal Point</i> e integrazione web site	480.000,00
	Promozione della mobilità in entrata e uscita	500.000,00
	<i>General Assembly &amp; Scientific Conferences OECD 2008</i>	50.000,00
	ERA-NET – registri tumori europei	308.000,00
	<i>European Bio-Banking and Biomolecular Resources</i>	204.000,00
	Programma ECRIN e <i>Infrastructure for Clinical Trials and Biotherapy</i>	402.000,00
	Infrastruttura EATRIS	503.000,00
	Infrastruttura INSTRUCT	104.000,00
	Partecipazione a CoCanGPC	150.000,00
	<i>Accreditation of European Comprehensive Cancer Centres</i>	99.000,00
	Collaborazione con l’America Latina	65.000,00
	Supporto ad iniziative emergenti a seguito di opportunità nella programmazione UE del VII PQ	105.000,00
	Collaborazioni con Paesi extraeuropei	230.000,00

\* I finanziamenti indicati sono stati approvati nel Consiglio Direttivo di ACC del 27 aprile 2007, come prima previsione dei costi per le attività al varo del Programma 4. Nella relazione di consuntivo delle attività del primo anno è riportato lo sviluppo delle 13 attività per l’anno 2009 (vedi pag. 148), con le relative previsioni di costi, così come presentati al Comitato Esecutivo di ACC del 19 dicembre 2008 e approvate dal Comitato stesso.

I progetti finanziati (si veda anche il sito di ACC: <http://www.iss.it/acca/>) hanno terminato il primo anno di attività nel 2008.

Il presente volume riporta il consuntivo dell’attività scientifica e è articolato in quattro sezioni corrispondenti ai programmi approvati dal Consiglio Direttivo di ACC.

**PROGRAMMA 1**

**Riduzione delle disparità nell'accesso dei pazienti  
ai mezzi diagnostici e alle terapie**

*Coordinatori*

Luigi G. Spagnoli, Stefano Vella



# QUALITÀ DI VITA E ICF IN PAZIENTI ONCOLOGICI

Giuseppina Majani, Anna Giardini, Anna Prevedini  
Servizio di Psicologia, Fondazione S. Maugeri IRCCS, Istituto Scientifico di Montescano (PV)

## Base di partenza e razionale

Allo stato attuale delle conoscenze, la valutazione della Qualità della Vita (QdV) in ambito oncologico può contare su un'ampia gamma di strumenti di rilevazione sia generici che specifici. Complessivamente, i dati riportati in letteratura forniscono un quadro esaustivo dell'impatto che la malattia oncologica, nelle sue molteplici declinazioni, ha sulla vita dei pazienti, anche in rapporto alle numerose variabili cliniche e socioanagrafiche considerate. A ciò si aggiunge la più recente attenzione per i correlati psicopatologici della malattia (es. distress emozionale e depressione) che possono significativamente modulare la QdV soggettivamente percepita e interferire con la motivazione alle terapie. Inoltre è noto che il coinvolgimento emotivo del personale sanitario è rilevante nella gestione del paziente oncologico, e ha implicazioni per il benessere dei pazienti oltre che degli operatori stessi.

L'ICF (*International Classification of Functioning disability and health* dell'Organizzazione Mondiale della Sanità del 2001) ha sancito l'importanza di una visione ad ampio spettro della vita di una persona, consentendo di cogliere, descrivere e classificare ciò che può verificarsi in relazione ad una condizione di salute dell'individuo rispetto a se stesso e alla collettività e non soltanto rispetto al quadro funzionale o alla percezione soggettiva di benessere. Il panorama scientifico e clinico richiama l'attenzione sui forti legami concettuali tra QdV e ICF, sottolineando l'utilità che può derivare dalla loro sinergia in termini di qualità assistenziale, valutazione dei bisogni e ottimizzazione delle risorse.

Questo *Work Package* (WP2) si prefigge di offrire una lettura multicomponentiale della condizione dei pazienti oncologici con particolare riferimento all'impatto di malattia e terapie sulla reale vita quotidiana e sulla partecipazione sociale, domini in cui la ricerca deve ancora crescere.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Lo scopo prioritario del WP2 è quello di verificare l'applicabilità del modello ICF in ambito oncologico e il suo valore aggiunto rispetto alle tradizionali valutazioni di QdV.

In secondo luogo si propone di evidenziare aree di benessere e fonti di problematicità con particolare riferimento alle componenti dell'ICF "Attività e Partecipazione" che costituiscono un'importante e innovativa svolta nel panorama delle valutazioni funzionali del paziente. Ad esempio, l'impatto delle diverse diagnosi sui domini della vita sociale, o l'influenza di variabili quali l'età, il sesso e lo stato civile sulla QdV percepita con particolare enfasi su pazienti giovani. Analogamente verrà valutato l'impatto delle procedure chirurgiche sul benessere e sulla partecipazione sociale in pazienti sottoposte ad intervento chirurgico per carcinoma mammario.

Ulteriore oggetto di studio sarà la valutazione dell'impatto di adeguate terapie analgesiche sulla QdV di pazienti con malattia oncologica avanzata.

Lo studio si propone anche di mettere in luce "Barriere e facilitatori" che il paziente incontra nel suo ambiente e tra i quali l'ICF annovera non solo realtà oggettive, ma anche atteggiamenti

legati a norme, valori e convinzioni che influenzano il comportamento individuale e la vita sociale a tutti i livelli. Verranno inoltre valutate le componenti del benessere globale del paziente neoplastico assistito a domicilio e sarà verificato se, in pazienti anziani oncologici con diagnosi di disturbo depressivo maggiore o minore, la qualità della vita migliori in maniera statisticamente significativa durante 18 mesi di follow-up.

Il WP è completato da un approccio valutativo al personale sanitario coinvolto nella cura di pazienti con linfoma o melanoma cutanei e dall'attivo coinvolgimento del volontariato.

Tutti i dati dello studio andranno a costituire il primo dataset ICF QdV italiano su una casistica di pazienti oncologici la cui ampiezza renderà possibili analisi statistiche dettagliate.

In sintesi, obiettivo del WP è ottenere una fotografia stratificata per variabili cliniche e socioanagrafiche del paziente oncologico in varie fasi e tipologie attraverso una chiave di lettura in grado di cogliere l'impatto della malattia e delle terapie sulla vita reale.

Lo studio potrebbe fornire una stima della misura in cui i modelli assistenziali osservati già soddisfano i bisogni connessi alla tutela della qualità della vita, al di là dei criteri di funzionalità fisica e psicologica.

## **Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati**

### **Fase formativo-organizzativa**

Come previsto dal programma del WP, sono stati organizzati due incontri con i responsabili delle diverse Unità Operative (UO), allo scopo di fornire informazioni relative al protocollo di ricerca, ai tempi di svolgimento e ai materiali previsti.

Gli incontri, tenuti presso l'Istituto Scientifico di Montescano, hanno avuto i seguenti programmi:

- *Incontro del 29 febbraio 2008*
  - Informazioni di natura amministrativa e finanziaria sul progetto.
  - Introduzione al modello ICF e al protocollo di ricerca "Qualità di vita e ICF in pazienti oncologici".
  - Focus sulle dimensioni ICF.
  - Metodologia del protocollo di ricerca.
  - Componenti e categorie della *Checklist* ICF: considerazioni ed esempi su elementi di particolare complessità.
- *Incontro del 7 aprile 2008*
  - Modifiche alla Scheda 2.0 socio-anagrafica e informativa sullo stato di salute del paziente, proposte dalle singole UO.
  - Esercitazione sulla compilazione della *Checklist* ICF guidata dalla proiezione di un video didattico.
  - Esercitazione sulla compilazione della *Checklist* ICF svolta attraverso *role playing*.
  - Domande, dubbi, chiarimenti, proposte in merito al protocollo di ricerca.

Al termine dei due incontri sono stati prodotti i rispettivi verbali i quali, inviati a tutte le UO, hanno costituito un documento di riferimento per l'avvio dello studio, a garanzia dell'uniformità nelle procedure di somministrazione dei protocolli.

Inoltre, a tale scopo, l'Unità di coordinamento ha anche curato la realizzazione di apposite dispense operative e la produzione di materiale audiovisivo contenente la simulazione della



somministrazione degli strumenti inclusi nel protocollo di ricerca con particolare riferimento alla *Checklist* ICF. Il video è stato mostrato e commentato nel corso del secondo incontro chiarendo di volta in volta i dubbi riferiti dai partecipanti e una copia dello stesso è stata consegnata ai rappresentanti di ogni UO.

Nei mesi seguenti, l'Unità di Coordinamento ha curato rapporti telefonici e telematici con le diverse UO allo scopo di risolvere eventuali perplessità o fornire i necessari chiarimenti.

È stato inoltre prodotto dall'Unità di Coordinamento il database per l'inserimento dei dati raccolti ed è stato successivamente inviato ad ogni singola UO coinvolta.

Infine, è stata avviata da parte dell'Unità di Coordinamento la procedura di controllo di qualità della somministrazione dei protocolli sui primi 5 casi compilati da ogni UO e dell'inserimento degli stessi nel *data entry*, attraverso il controllo incrociato sia dei protocolli cartacei fotocopiati e spediti via posta ordinaria sia del loro inserimento in ogni singolo database inviato via email.

Al momento attuale, sulla base di quanto pervenuto dalle singole UO invitate secondo il condiviso piano di lavoro a fornire un aggiornamento relativo al primo anno di attività, è emerso che diverse UO hanno già avviato la fase di raccolta dati (prevista come da cronogramma del WP dal 1° maggio 2008 al 31 giugno 2009). Altre UO stanno tuttora ultimando la fase di organizzazione operativa, il cui protrarsi è talora riconducibile alla necessità di estendere il know-how applicativo a collaboratori di diversa estrazione professionale o collocazione territoriale.

In sintesi, ad oggi sono stati completati circa 50 protocolli, di cui le relative UO hanno provveduto a inserire i dati nell'apposito database.

Poche e sporadiche le segnalazioni di problemi riguardanti la somministrazione del protocollo, e principalmente dovute alla particolare fragilità clinica della popolazione in esame. Gli sforzi finora dedicati alla selezione dei soggetti in base ai criteri concordati hanno permesso di portare a termine la maggior parte delle interviste iniziate, malgrado la non breve durata complessiva dell'interazione testistica.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del WP2 è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del WP2 - Qualità di vita e iCF in pazienti oncologici**

<b>Proponente</b> ( <i>Responsabile scientifico del WP</i> )	<b>Ente di appartenenza dell'UO</b>	<b>Responsabile scientifico delle UO</b>
Maugeri ( <i>Giuseppina Majani</i> )	IOR	Stefano Ferrari
	Humanitas	Armando Santoro
	IDI	Damiano Abeni
	Azienda Sanitaria Locale Pavia	Pietro Perotti
	Fondazione Santa Lucia	Carlo Caltagirone
	Maugeri	Ines Giorgi
	Maugeri	Danilo Miotti
	Maugeri	Pietro Preti
	Maugeri	Giuseppina Majani
	ISS	Raffaella Bucciardini
FAVO	Elisabetta Iannelli	

## **METASTASI OSSEE: MIGLIORAMENTO DELLA QUALITÀ DI VITA E DI ASSISTENZA**

Stefano Liverani

*Direzione Sanitaria, IRCCS Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna*

### **Base di partenza e razionale**

Le metastasi ossee da carcinoma rappresentano una patologia estremamente invalidante e ad elevato impatto sociale. Inoltre, sono in continuo aumento, dovuto al prolungamento della vita per i sempre più efficaci trattamenti delle neoplasie sia localizzate che già avanzate. Non esistono registri dedicati, e l'incidenza è variabile sulla prevalenza delle diverse neoplasie.

Le modalità di presentazione possono essere le più varie, non esclusa anche la prima manifestazione di malattia neoplastica, e questo fa sì che i primi ad intervenire possano essere specialisti delle diverse branche (ortopedici, oncologi, radioterapisti) spesso in assenza di collegamenti tra di loro.

La molteplicità delle modalità di presentazione (in fase terminale o in apparente benessere, singole o multiple, localizzazioni allo scheletro portante o a sedi non sottoposte al carico, il coinvolgimento o meno di strutture nobili quali nervi, midollo e vasi) rende il loro trattamento assai complicato e spesso multidisciplinare, con necessità di un coordinamento tra le diverse specialità che attualmente è carente. Anche qualora non vi siano possibilità di guarigione, rimane estremamente importante un trattamento adeguato al fine di migliorare la qualità di vita attesa, specialmente al fine di prevenire le fratture patologiche che obbligherebbero all'allettamento del paziente. Non vanno dimenticati gli sforzi dell'assistenza domiciliare nel seguire e trattare questi pazienti, senza la collaborazione di strutture dedicate.

### **Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto**

L'obiettivo principale è quello della costituzione di una rete nazionale per il trattamento delle metastasi ossee da carcinoma, mediante il coordinamento delle strutture già esistenti, principalmente le strutture che aderiscono ad Alleanza Contro il Cancro, con elaborazione congiunta di percorsi e protocolli diagnostici, terapeutici e linee guida. Il coinvolgimento delle regioni sarà progressivo, a partire da un nucleo di regioni sperimentatrici che attualmente comprendono Emilia-Romagna, Piemonte e Toscana in base alle adesioni volontarie delle altre regioni.

Un secondo obiettivo è quello della costituzione di un registro per le metastasi ossee.

Per la Regione Emilia-Romagna viene individuato un centro di riferimento presso gli Istituti Ortopedici Rizzoli che, collaborando con le reti regionali oncologica, ortopedica e radioterapica, sperimenteranno un servizio di consulenza mediante ambulatorio dedicato (*day service*), per la valutazione di questa patologia, fornendo inoltre la possibilità di effettuare agobiopsie TAC-guidate con diagnosi istologica entro 24-48 ore. Analogamente il progetto verrà sviluppato presso le regioni Piemonte e Toscana; in seguito si proporrà l'estensione della metodica organizzativa sperimentata alle altre regioni.

Sulla base delle linee guida che verranno definite, la rete si farà promotrice della formazione per l'effettuazione di trattamenti innovativi di radiologia interventistica o chirurgia mini-invasiva, attuabili su base di *day surgery*, quali l'embolizzazione selettiva, la termoablazione, l'osteoplastica, la vertebroplastica.

I protocolli e le linee guida dovranno indicare l'iter terapeutico più idoneo per ogni singolo caso anche qualora non venissero ravvisate indicazioni chirurgico-ortopediche.

Tale attività sarà svolta in collegamento con le strutture deputate all'assistenza domiciliare, per la loro capillarità sul territorio, che seguiranno i pazienti a domicilio garantendo un servizio assistenziale di 24 ore su 24, garantendo anche l'adeguato follow-up.

Oltre agli aspetti clinico-assistenziali del progetto, non vanno dimenticate le possibilità che si aprirebbero nel campo della ricerca, essendo già attive agli Istituti Rizzoli strutture che si occupano sia del riassorbimento osseo, anche da malattia neoplastica, come anche degli aspetti biologici legati al processo di metastatizzazione.

## **Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati**

È stato costituito il gruppo di lavoro interno all'Istituto Ortopedico Rizzoli, che comprende 4 ortopedici afferenti alle 2 divisioni che sono maggiormente coinvolte nella patologia oncologica ortopedica, sotto la diretta supervisione dei direttori delle stesse due divisioni e del Direttore Sanitario.

È stata svolta un'indagine sui pazienti trattati per questa patologia nel corso dell'anno 2007, rilevando 122 casi. I dati verranno utilizzati per la pianificazione degli ulteriori interventi.

Il gruppo di lavoro ha già prodotto un documento, attualmente in fase di approvazione da parte del gruppo stesso di lavoro, che costituirà la base dell'attività futura. Il documento affronta le problematiche relative ai percorsi diagnostici e terapeutici da approntare e condividere.

È in fase avanzata di finalizzazione l'ambulatorio multidisciplinare specifico per la malattia metastatica ossea. Si stanno contattando strutture oncologiche e radioterapiche con cui stabilire le necessarie collaborazioni. Tale ambulatorio sarà attivato all'inizio del 2009.

Contestualmente all'apertura dell'ambulatorio, saranno attivati i percorsi diagnostici e terapeutici concordati, anche con la collaborazione di organizzazioni di assistenza domiciliare.

# MODELLI INTERDISCIPLINARI D'INTERVENTO PER LA CURA DEI PAZIENTI ONCOLOGICI IN ETÀ GERIATRICA

Umberto Tirelli

*Dipartimento di Oncologia Medica, Centro di Riferimento Oncologico, Aviano*

## Base di partenza e razionale

L'approccio diagnostico terapeutico tradizionale non può più essere considerato sufficiente per garantire al paziente anziano l'accesso ai mezzi diagnostici e alle terapie oncologiche più innovative in grado di garantire equità di trattamento. L'IRCCS Centro di Riferimento Oncologico di Aviano ha, sin dalla fine degli anni '80, promosso l'integrazione delle metodologie proprie della geriatria con quelle più innovative della diagnosi e cura in campo oncologico per la realizzazione di programmi terapeutici nell'ambito dell'oncologia geriatrica. In particolare, è stato creato un gruppo di studio multicentrico collaborativo che ha realizzato e validato uno strumento di Valutazione Geriatrica Multidimensionale (VGM) in oncologia. La VGM è considerata un processo diagnostico interdisciplinare che ha l'intento di individuare le condizioni mediche, psicosociali, funzionali di tutti i pazienti anziani fragili permettendo uno screening indispensabile per l'organizzazione del programma di cure e per l'ingresso in protocolli specificamente studiati per l'anziano anche fragile e vulnerabile e per il monitoraggio delle modificazioni cliniche nel tempo sottraendo la cura dell'anziano con cancro da un pericoloso empirismo che spesso si risolve in un sovra o sottotrattamento.

Il numero di persone anziane arruolate in protocolli clinici di ricerca, fonte necessaria per l'evidence based medicine, non sono rappresentative della reale popolazione anziana, considerati i dati demografici attuali. I dati disponibili attualmente dalla letteratura internazionale sembrano suggerire che se da un lato solo persone anziane particolarmente selezionate possono avere accesso alle terapie più innovative, dall'altra gli eventi avversi correlati alla terapia aumentano con l'aumentare dell'età e non sono correlabili a variabili note.

Non sono attualmente disponibili dati conclusivi per definire linee guida nazionali di terapia per le più diffuse neoplasie della persona anziana.

Attraverso l'inclusione in protocolli di ricerca clinica pazienti anziani in un numero che ne garantisca la rappresentatività, il progetto intende contribuire a:

- definire l'età biologica dell'anziano e individuare fattori predittivi delle tossicità e di risposta alla terapia farmacologica;
- identificare le aree di criticità che impediscono ai pazienti anziani con cancro il pieno accesso ad efficaci ed efficienti procedure di diagnosi, cura e assistenza;
- standardizzare percorsi diagnostici e terapeutici;
- ottimizzare il rapporto rischio/beneficio della chemioterapia, con miglioramento dell'outcome e riduzione delle tossicità.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

L'obiettivo principale di questo programma mirato al paziente oncologico anziano è identificare e quantificare i problemi legati all'invecchiamento ed elaborare un piano di cura e assistenza personalizzato.

Obiettivi principali del programma includono:

- screening di tutti i pazienti eleggibili attraverso valutazione clinico funzionale secondo i parametri della VGM da parte di una Unità di Valutazione Geriatrica (UVG);
- inclusione dei pazienti anziani affetti da neoplasia (carcinoma della mammella, carcinoma del colon-retto, tumori testa-collo, carcinoma del rene metastatico, carcinoma del polmone, linfomi non-Hodgkin e mieloma multiplo) in protocolli sperimentali di ricerca clinica;
- inclusioni in protocolli di terapia anche di pazienti fragili e vulnerabili;
- studio dei fattori predittivi di tossicità correlata al trattamento;
- studio dei fattori predittivi biomolecolari (determinanti farmacogenetici e farmacocinetici) di tossicità correlata al trattamento;
- definizione di parametri farmacocinetici/biochimici con l'obiettivo primario della comprensione del risultato fenotipico delle varianti genetiche stabilire canali efficaci di comunicazione;
- individuazione di predittori di risposta/resistenza ai farmaci molecolari, neoplasie sottoposte a trattamento con inibitori di EGFR.

Obiettivi secondari includono:

- integrare l'assistenza e cura fornita in regime di ricovero con l'assistenza domiciliare e i servizi territoriali (Assistenza Domiciliare Integrata, ADI; Residenza Sanitaria Assistenziale, RSA);
- facilitare l'accesso alle cure delle persone non autosufficienti;
- definire i rapporti e le sinergie fra le figure professionali coinvolte nell'assistenza (l'oncologo, il chirurgo, il geriatra, l'infermiere, il medico di medicina generale);
- stabilire vie preferenziali di dimissione e ammissione protette dal e verso il reparto per acuti e la rete assistenziale territoriale per i pazienti anziani in trattamento che presentano segni di tossicità conseguente alla chemioterapia;
- mettere a punto di un database e di una banca di materiale biologico (cellule, DNA, siero, plasma).

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Durante il periodo indicato si sono raggiunti gli obiettivi indicati nel progetto come in dettaglio descritto di seguito:

### 1. Costituzione di una UVG

Si tratta di un team multidisciplinare, nel cui ambito le singole figure professionali interagiscono, ciascuno con la propria competenza, per delineare il profilo clinico funzionale della persona anziana. L'UVG di I livello è formata da un medico esperto in onco-geriatria, un infermiere di ricerca, uno psicologo.

L'UVG si riunisce una volta alla settimana presso l'ambulatorio dedicato di Oncologia Geriatrica.

La valutazione prevede:

- accoglimento del paziente e del/i *caregiver*
- intestazione di cartella geriatrica
- prelievi ematochimici per lo studio delle anemie, delle patologie croniche associate, delle riserve d'organo e per la creazione di una banca di materiale biologico (vedi punto 5)
- colloquio psicologico-clinico
- valutazione infermieristica
- valutazione clinico-strumentale cardiologica (vedi punto 2)
- somministrazione dei test
- scale di *performance*.

Dal febbraio 2007, data di attivazione dell'UVG, a ottobre 2008 sono stati valutati 199 pazienti anziani.

2. *Valutazione clinico funzionale cardiologica*

Ogni paziente entrato nel protocollo è stato valutato con visita cardiologica, elettrocardiogramma ed ecocardiogramma di base.

3. *Attivazione di percorsi terapeutici*

La finalità di questo programma mirato al paziente oncologico anziano è elaborare un piano di cura e assistenza personalizzato. In particolare gli obiettivi principali prevedono:

- l'inclusione dei pazienti anziani in protocolli sperimentali di ricerca clinica;
- facilitare l'accesso alle cure anche degli anziani fragili rappresentativi della popolazione anziana.

4. *Creazione di una scheda informatica per la raccolta e gestione dei dati a cura dell'Unità di biostatistica del CRO per la raccolta di dati e messa a punto di un database*

In collaborazione con l'Unità di Biostatistica si è creato una scheda informatica per la raccolta ed elaborazioni dati dell'attività del progetto. Il supporto informatico è un progetto originale dell'Istituto creato specificamente con la finalità di creare un database per l'anziano oncologico.

5. *Raccolta di dati e messa a punto di una banca di materiale biologico (cellule, DNA, siero, plasma)*

Sono stati create due bio banche parallele presso la SOS di Microbiologia e presso la SOS di Patologia Clinica per lo studio di biomarker associati a tumori nell'anziano. Attualmente le due sieroteche conservano materiale congelato di tutti i pazienti entrati in studio. Sono in corso le prime valutazioni sulla quota di pazienti trattati con farmaci biologici.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del WP3 è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del WP3 - Modelli interdisciplinari d'intervento per la cura dei pazienti oncologici in età geriatrica**

<b>Proponente</b> <i>(Responsabile scientifico del WP)</i>	<b>Ente di appartenenza dell'UO</b>	<b>Responsabile scientifico delle UO</b>
CRO (Umberto Tirelli)	IOV	Silvio Monfardini
	CRO	Lucia Fratino
	CRO	Diana Crivellari

# **DATABASE CLINICO E BIOBANCA PER LO STUDIO DI PAZIENTI ONCOLOGICI ANZIANI E DELLE PATOLOGIE ETÀ-CORRELATE**

Fiorella Guadagni (a), Francesco Schittulli (b)

(a) *Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Biotecnologie Avanzate, San Raffaele della Pisana, Roma*

(b) *Lega Italiana per la lotta contro i Tumori, Roma*

## **Base di partenza e razionale**

Considerato il drammatico cambiamento demografico oggi in atto nei Paesi industrializzati, la comunità medica, e in particolare gli oncologi e i geriatri, sono sempre più coinvolti nella crescente problematica della gestione del paziente anziano oncologico. La costituzione di un database clinico che includa le informazioni cliniche di casistiche rilevanti di pazienti oncologici anziani, affetti e non, da patologie associate all'età, rappresenta uno strumento essenziale per studi basati sull'evidenza clinico-scientifica ed efficace per la valutazione dei bisogni reali di salute di una popolazione di pazienti sempre più in aumento. Inoltre, l'aggiunta di informazioni biomolecolari ad un database clinico potrebbe permettere di programmare interventi socio-assistenziali sulla popolazione generale, soprattutto in quelle patologie con predisposizione ereditaria multifattoriale. L'identificazione di geni e vie metaboliche in grado di alterare la durata di vita ha permesso di approfondire le nostre conoscenze sui legami molecolari tra invecchiamento e patologie correlate all'età, quali le neurodegenerazioni, il cancro, e i disturbi cardiovascolari. Ad esempio, la sensibilità all'insulina, il controllo glicemico, e il grasso viscerale sono non solo una caratteristica delle maggiori malattie metaboliche, ma rappresentano anche fattori di rischio significativi per lo sviluppo di malattia di Alzheimer o altri disturbi cognitivi dell'anziano. Un ulteriore "legame molecolare" tra invecchiamento, alterazioni metaboliche e cancro sarebbe rappresentato da alcune adipochine, le cui capacità regolatorie nella via di trasduzione del segnale all'insulina le rende di potenziale interesse per lo studio di numerose patologie correlate all'invecchiamento.

Attraverso la costituzione di una biobanca inter-istituzionale e la strutturazione di una piattaforma informatica in grado di gestire non solo la storia clinica ma che includa anche informazioni biomolecolari di pazienti oncologici anziani, affetti e non, da patologie associate all'età, si ritiene di poter aggiungere informazioni di rilievo alla programmazione di interventi socio-assistenziali rivolti alla prevenzione di patologie neoplastiche in individui con predisposizione ereditaria multifattoriale. Tutto ciò non può che determinare un vantaggio per il Servizio Sanitario Nazionale (SSN) e per la qualità di vita del paziente anziano attraverso la standardizzazione di percorsi terapeutici differenziati. Ulteriore vantaggio sarebbe quello di poter meglio definire e sviluppare criteri di classificazione clinica che permettano un inquadramento più accurato delle caratteristiche biologiche di ogni paziente.

La possibilità di poter stratificare un gruppo di soggetti anziani affetti da sindrome metabolica e/o diabete mellito/iperinsulinemia a maggiore rischio di predisposizione al cancro potrà permettere di anticipare e/o intensificare un programma di sorveglianza oncologica mirata.

In un progetto di così grande rilevanza, la costituzione di una Biobanca di riferimento per la raccolta di prelievi biologici sui quali poter effettuare indagini diagnostiche tradizionali, e, soprattutto, innovative, rappresenta un sicuro investimento non solo per una migliore

comprensione dei dati che saranno ottenuti nello studio attuale, ma, soprattutto, per il futuro della ricerca clinica e biomedica. La disponibilità di una biobanca di riferimento appositamente allestita rappresenterebbe un momento di sicura innovazione per la valutazione diagnostica e/o prognostica di questa popolazione e dovrebbe permettere lo svolgimento di studi di diagnostica molecolare auspicabile nella cosiddetta era “postgenomica”.

## **Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto**

La disponibilità di un database clinico implementato dalla costituzione di una biobanca e dell'analisi molecolare con metodiche di genomica e proteomica in grado di caratterizzare una serie di profili genici e pattern proteici, in associazione a biomarcatori tradizionali, potrà permettere il raggiungimento dei seguenti obiettivi:

- costituzione di un database clinico e di una biobanca;
- sviluppo e validazione di percorsi diagnostico-terapeutici per pazienti oncologici anziani basati sulla evidenza clinico-sperimentale;
- conferma e validazione dei dati scientifici, ad oggi ancora contrastanti e non univoci, sui processi biologici che sono alla base delle intercorrelazioni esistenti tra sindrome metabolica/ diabete/ipersulinemia e neoplasie;
- caratterizzazione di una serie di profili genici in associazione a biomarcatori classici da utilizzare quale strumento utile non solo alla determinazione, diagnosi e prevenzione del rischio neoplastico in pazienti diabetici, ma anche come indici predittivi di responsabilità alla terapia per entrambe le patologie.

## **Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati**

Gli obiettivi previsti nel corso del primo anno di attività, come rappresentato nel cronoprogramma, prevedevano l'attivazione e implementazione di una BioBanca Interistituzionale Multidisciplinare (BioBIM) presso l'IRCCS San Raffaele Pisana, l'inizio del reclutamento della casistica e relativo campionamento biologico e la messa a punto delle metodiche di valutazione biomolecolare. Tali obiettivi si possono considerare raggiunti. Infatti, al momento attuale è attiva presso l'IRCCS San Raffaele Pisana una BioBIM completamente integrata con il settore diagnostico e con una piattaforma informatica in grado di gestire non solo la storia clinica ma anche la terapia e gli outcomes dei pazienti. Passaggio fondamentale per l'apertura ufficiale della BioBIM a Enti terzi quali Università, centri di ricerca pubblici e/o privati e altre Istituzioni sanitarie territoriali pubbliche e/o private è stato rappresentato dall'approvazione da parte del Comitato Etico dell'IRCCS San Raffaele Pisana del progetto e del relativo consenso informato da somministrare ai pazienti afferenti alle varie Istituzioni. Lo stesso Consenso è stato approvato anche dal Comitato Etico dell'ACISMOM (Associazione dei Cavalieri Italiani del Sovrano Militare Ordine di Malta) accordando per la collaborazione di alcune Strutture Sanitarie Nazionali di ricovero e ambulatoriali afferenti al Sovrano Ordine Militare dei cavalieri di Malta con la BioBIM.

Al momento attuale sono presenti nella BioBIM dell'IRCCS San Raffaele Pisana campioni biologici ottenuti da circa 1000 soggetti, inclusi pazienti affetti da carcinoma della mammella, del tratto gastrointestinale, dell'apparato genito-urinario, del polmone, nonché soggetti sani e



pazienti affetti da dismetabolismi. Di particolare interesse, 127 pazienti affetti da patologie oncologiche sono attualmente seguiti in follow-up.

Contemporaneamente all'avvio del reclutamento dei soggetti e alla preservazione dei relativi campioni presso la BioBIM, obiettivo del progetto era la messa a punto delle metodiche per l'analisi molecolare pre- e post-trascrizionale dei geni codificanti proteine coinvolte nel *pathway* metabolico responsabile della suscettibilità al cancro in relazione all'alterato controllo glucidico. Mediante l'utilizzo di specifici software, quali MacVector e GeneWork, è stato effettuato da banche dati, quali Entrez ed EMBL, il download delle sequenze geniche dei geni principalmente coinvolti nei *pathway* di correlazione tra cancro, invecchiamento e alterazioni metaboliche. In particolare, sono state messe a punto le metodiche per la valutazione di alcuni geni correlati al metabolismo dell'insulina (IGF-1, IGFBP, IGFBP proteasi, IRS1 e IRS2, SHC1), implicati nel *pathway* WNT e coinvolti nei principali processi di iniziazione e progressione neoplastica (APC,  $\beta$ -catenina/CTNNB1, LKB1/STK11) o deputati alla regolazione dei processi infiammatori nella sindrome metabolica e correlati con l'insorgenza dell'insulino resistenza e del carcinoma del colon retto (adiponectina, TNF-alfa).

In una prima fase dello studio sono stati analizzati sieri di pazienti con Carcinoma del Colon Retto (CRC) in vario stadio di malattia al fine di verificare l'eventuale associazione tra alcune adipochine e la patologia neoplastica. In particolare, sono state valutate le possibili associazioni tra adipochine, il TNF-alfa e le variabili clinicopatologiche di pazienti con CRC al momento della diagnosi del tumore primitivo. Inoltre, uno studio di follow-up è stato eseguito per analizzare l'eventuale valore prognostico dei livelli pre-chirurgici di adipochine in pazienti con CRC.

Il razionale scientifico alla base di questo studio si basa su alcune osservazioni epidemiologiche riportate in letteratura che suggerivano un'associazione tra la presenza di livelli circolanti alterati di adiponectina o leptina e rischio di CRC, a fronte di una mancanza di dati clinico-sperimentali per la patologia in studio. Tale associazione sarebbe inoltre indipendente da misure antropometriche quali l'indice di massa corporea (*Body Mass Index*, BMI) o la circonferenza vita e dall'attività fisica. Del tutto recentemente è stato, inoltre, dimostrato che la somministrazione di TNF-alfa induce un aumento rapido e dose-dipendente dei livelli sierici di leptina e una riduzione dei livelli di adiponectina. È noto che le cellule tumorali e/o i macrofagi tumore-associati possono produrre citochine infiammatorie, in particolare il TNF-alfa, e livelli circolanti elevati di questa citochina sono stati associati con lo stato di malattia di pazienti con CRC.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che i livelli mediani di adiponectina erano più bassi in pazienti con CRC in paragone a soggetti sani ( $p < 0,0001$ ), e che i livelli mediani di leptina erano superiori in pazienti con CRC rispetto a soggetti di controllo ( $p < 0,0001$ ). Infine, i risultati ottenuti nello studio di follow-up hanno messo in evidenza che basse concentrazioni pre-chirurgiche di adiponectina hanno valore prognostico negativo per la sopravvivenza libera da malattia (*Recurrence-Free Survival*, RFS), mentre un alterato rapporto leptina/adiponectina ha un valore prognostico negativo non solo per la RFS, ma anche per la sopravvivenza globale. Questi risultati mentre da una parte sono in accordo con l'ipotesi attuale che riconosce a tali adipochine un'azione sulla crescita cellulare e l'angiogenesi, dall'altra suggeriscono che un alterato rapporto leptina/adiponectina potrebbe essere considerato come un utile indicatore prognostico nei pazienti con CRC. Tale studio è stato presentato all'VIII Congresso Internazionale dell'*Anticancer Research* e il relativo manoscritto è stato sottoposto per la pubblicazione.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del WP3 è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del WP3 - Database clinico e biobanca per lo studio di pazienti oncologici anziani e delle patologie età-correlate**

<b>Proponente</b> <i>(Responsabile scientifico del WP)</i>	<b>Ente di appartenenza dell'UO</b>	<b>Responsabile scientifico delle UO</b>
LILT <i>(Fiorella Guadagni)</i>	ACISMOM	Luciano Caprino
	LILT	Fiorella Guadagni
	Università di Roma "Tor Vergata"	Mario Roselli

## Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Guadagni F, Roselli M, Spila A, D'Alessandro R, Lucci I, Polce L, Formica V, Laudisi A, Portarena I, Palmirota R, Ferroni P. Serum leptin levels in colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 2008, 28(5C):3304

# APPROCCIO SOCIO-ASSISTENZIALE ALLE PROBLEMATICHE DEL PAZIENTE ONCOLOGICO ANZIANO

Stefano Vella

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

## Base di partenza e razionale

È un dato ampiamente noto che la popolazione anziana è in notevole aumento; il 15% della popolazione europea è ultrasettantacinquenne e il 55% dei casi di tumore si riscontra in questo gruppo di età. L'età è, infatti, un importante fattore di rischio per la malattia neoplastica e il suo impatto è particolarmente evidente quando si considerano alcuni specifici tumori. In contraddizione con il fatto che il rischio di cancro aumenta con l'età, vi è uno scarso interesse clinico al problema dimostrato sia dall'elevata percentuale di casi non studiati, sia dalla frequente esclusione dagli studi clinici. Per contro la scelta diagnostico-terapeutica nel paziente anziano è complicata dall'estrema eterogeneità di questa popolazione, dal frequente riscontro di patologie associate, di problemi cognitivi e di perdita dell'autosufficienza; tali aspetti possono condizionare la spettanza di vita e la mortalità più del tumore stesso. Mentre in letteratura sono ormai reperibili molti dati per quanto riguarda i trattamenti oncologici, mancano informazioni in merito al management di questa fascia di pazienti, in particolare per quanto riguarda gli aspetti socio-assistenziali. L'approccio diagnostico terapeutico tradizionale non può più essere considerato sufficiente per garantire al paziente anziano l'accesso ai mezzi diagnostici e alle terapie oncologiche più innovative in grado di garantire equità di trattamento. È necessaria quindi una programmazione e uno sviluppo di interventi *ad hoc* a favore dei pazienti oncologici anziani al fine di rendere più razionale e, nello stesso tempo efficace, la presa in carico di tale tipo di pazienti.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Il WP4 è articolato in 5 sottoprogetti, i cui obiettivi sono di seguito descritti:

### *1. Approcci innovativi alla gestione socio-assistenziale del paziente oncologico anziano*

Il sottoprogetto intende mettere a punto di un piano di cura e di assistenza personalizzato per migliorare la gestione del paziente oncologico anziano sia dal punto di vista clinico che socio-assistenziale.

Intende inoltre sviluppare una modalità di sorveglianza clinico-epidemiologica nel paziente oncologico anziano al fine di descrivere:

- il carico assistenziale legato alle patologie oncologiche nei soggetti di età superiore ai 65 anni;
- i profili di cura riguardanti tali pazienti;
- la gestione sintomatologica e assistenziale dei pazienti oncologici geriatrici.

2. *Sperimentazione di un modello di gestione assistenziale integrata del paziente oncologico anziano*

Con questo studio si intende sperimentare una modalità di gestione del paziente oncologico anziano secondo un nuovo modello organizzativo di tipo integrato. Questo modello ha al centro la valutazione globale del paziente attraverso l'analisi dei bisogni non solo clinici ma anche socio-assistenziali e prevede la stesura di un percorso personalizzato e l'integrazione dell'assistenza nelle sue diverse formulazioni: ospedaliera e territoriale. La gestione di tali pazienti deve anche rispondere all'obiettivo del migliore rapporto costo-beneficio e presentare caratteri di riproducibilità.

In dettaglio gli obiettivi dello studio sono:

- identificare e quantificare i problemi legati alla gestione e alla storia clinica del paziente anziano con tumore soprattutto in relazione alle criticità più frequenti (es. ritardo nella diagnosi, difficoltà di presa in carico, ecc.);
- fare uno screening della quota di pazienti anziani con *performance* e condizioni generali/funzionali buone, tali da considerarli simili alla popolazione oncologica adulta in relazione ai percorsi di diagnosi e cura;
- creare percorsi differenziati e applicare il modello di presa in carico proposta per la quota di pazienti problematici (es. presenza di patologie concomitanti, disabilità, fragilità psicologica e psicosociale, difficoltà logistiche) attraverso una migliore conoscenza delle condizioni cliniche, degli strumenti di valutazione delle funzioni, del grado di collaborazione alle proposte terapeutiche e delle facilitazioni per metterle in atto;
- garantire la continuità della cura e l'integrazione ospedale/territorio;
- caratterizzare i costi sanitari diretti (procedure di diagnosi e cura), quelli diretti non sanitari (es. spese di trasporto) e quelli indiretti (es. perdita di produttività dei familiari dedicati all'assistenza);
- misurare il grado di soddisfazione del paziente e del *caregiver* nel corso della malattia.

3. *Studio prospettico sulla gestione integrata socio-assistenziale del soggetto oncologico, in pazienti di età superiore ai 70 anni, al fine di elaborare un nuovo modello organizzativo per l'integrazione tra assistenza ospedaliera ed extra-ospedaliera*

Lo studio proposto si prefigge di aggiungere alle conoscenze già disponibili:

- informazioni sulla tipologia socio-assistenziale dell'accesso di pazienti anziani oncologici ai servizi specialistici ospedalieri e grado di soddisfazione rispetto all'assistenza ricevuta dei pazienti e della famiglia;
- informazioni sulla capacità di integrazione delle singole unità operative ad interagire fra loro e con le strutture territoriali (distretti socio-sanitari, comune, strutture intermedie, hospice, medico di medicina generale, ecc.);
- validazione di supporti informatici che permettano un continuo contatto tra tutti i partecipanti (es. apparecchiature di telemedicina);
- stesura e validazione operativa di un modello organizzativo integrato tra assistenza ospedaliera ed extra-ospedaliera.

4. *Identificazione e quantificazione dei problemi legati all'invecchiamento ed elaborazione di un piano di cura e assistenza personalizzato.*

Il sottoprogetto intende raggiungere i seguenti obiettivi:

- inclusione dei pazienti anziani in protocolli sperimentali di ricerca clinica;
- studio dei fattori predittivi di tossicità correlata al trattamento;
- studio dei fattori predittivi biomolecolari di tossicità correlata al trattamento;

- raccolta di dati e messa a punto di un database e di una banca di materiale biologico (cellule, DNA, siero, plasma);
- integrazione dell'assistenza e cura fornita in regime di ricovero con l'assistenza domiciliare e i servizi territoriali (Assistenza Domiciliare Integrata, ADI; Residenza Sanitaria Assistenziale, RSA);
- accesso alle cure delle persone non autosufficienti.

5. *Bisogni assistenziali in adulti senior. Le variabili confondenti nella relazione paziente/caregiver*

Lo studio proposto si prefigge di misurare il grado di soddisfazione del paziente rispetto all'assistenza ricevuta, attraverso un'attenta valutazione delle condizioni globali dell'anziano e di alcuni aspetti del funzionamento (*coping*) del familiare *caregiver* e della loro relazione (inclusa la gestione dell'informazione clinica), al fine di una migliore programmazione ed efficacia, degli interventi socio-assistenziali a lui destinati.

## **Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati**

L'obiettivo principale di tutti gli studi proposti che afferiscono al progetto "Approccio socio-sanitario alle problematiche del paziente oncologico anziano" passa attraverso la valutazione delle condizioni globali dell'anziano al fine di una migliore programmazione degli interventi socio-assistenziali a lui destinati. Tale scopo viene raggiunto mediante una serie di interventi che mirano al monitoraggio dei bisogni espressi dal paziente con la successiva elaborazione di strategie idonee al raggiungimento di soddisfazione delle istanze raccolte. Ogni sottoprogetto presenta un particolare punto di vista che permette di osservare e valutare i bisogni del paziente oncologico anziano.

Per quanto riguarda il sottoprogetto 1, lo scopo della ricerca è quello di valutare, mediante interviste semi-strutturate secondo l'approccio della medicina della narrazione a pazienti ricoverati e dimessi dall'ospedale, la possibilità di integrare e implementare un programma di valutazione multidimensionale geriatrica con l'approccio tradizionale fatto di ricovero in Unità Operative (UO) di Medicina e follow-up del medico di medicina generale.

Mediante questo approccio sarà possibile evidenziare i bisogni e le preferenze del paziente oncologico anziano e comprendere in modo più completo il vissuto di malattia del paziente per individuare le aree critiche su cui eventualmente costruire disegni di studio futuri e strategie per il miglioramento della qualità dell'assistenza.

Per questo studio è previsto l'arruolamento dei 100 pazienti che presentino le seguenti caratteristiche:

- età superiore ai 65 anni;
- durata prevista del ricovero ospedaliero di almeno 2 giorni;
- diagnosi di patologia oncologica.

Nei primi mesi di attività sono stati decisi i criteri di valutazione, è stata preparata la cartella di valutazione e successivamente è stata elaborata la griglia valutativa che verrà utilizzata per le interviste semi-strutturate.

È attualmente in fase di preparazione la modalità di elezione e di arruolamento dei pazienti per procedere alla raccolta dati mediante le interviste.

Il sottoprogetto 2 nasce dalla necessità di identificare modelli organizzativi specifici per il paziente anziano che presenta caratteristiche del tutto peculiari, a partire dall'analisi dei bisogni socio-assistenziali fino ai percorsi di diagnosi e cura personalizzati.

I modelli devono tenere conto di tutte le fasi della cura ponendosi anche come forte supporto nei momenti più critici come quelli dell'acuzie, degli esiti, della ricaduta, della tossicità dei trattamenti, delle condizioni ospedaliere e domiciliari.

Il modello proposto è di tipo integrato perché non si rivolge solo agli aspetti prettamente clinici della malattia, ma anche a tutti i bisogni psicologici e sociali così fortemente impattanti sulla qualità di vita di questa specifica quota di pazienti.

Gli obiettivi dello studio brevemente riassunti sono:

- descrivere le difficoltà della presa in carico;
- screenare la quota di pazienti anziani in buone condizioni generali e cliniche in grado di seguire i percorsi della popolazione adulta non anziana;
- applicare il modello della presa in carico globale;
- garantire la continuità di cura sul territorio identificando metodi procedurali ripetibili;
- testare strumenti di valutazione funzionale;
- caratterizzare, ove possibile, i costi;
- valutare il grado di soddisfazione del paziente.

Le UO partecipanti hanno avuto il compito di valutare determinate specificità e hanno concluso il lavoro programmato per la prima annualità.

In particolare, la prima fase del progetto ha visto complessivamente le UO lavorare per:

- identificare i dati epidemiologici di riferimento;
- studiare le caratteristiche della popolazione in esame nei suoi diversi aspetti inerenti la malattia oncologica e le problematiche di tipo assistenziale;
- dotarsi degli strumenti di valutazione e gli indicatori di risultato per avviare e procedere in linea con le finalità del progetto.

Il sottoprogetto 3 intende elaborare un nuovo modello organizzativo per l'integrazione tra assistenza ospedaliera ed extra-ospedaliera. Questo studio ha portato alla preparazione di schede per la raccolta di dati che rivelano i bisogni sanitari, socio-assistenziali, la condizione organica, lo stato cognitivo, nonché gli indici di outcome sia nel paziente anziano oncologico che nei *caregiver*. Successivamente, sono stati organizzati due incontri per addestrare opportunamente gli operatori coinvolti in questo studio. Un'ultima fase propedeutica è stata l'analisi e la valutazione delle schede e dei test previsti per un corretto inserimento nel database informatico.

Il reclutamento ha finora registrato la valutazione completa di 33 pazienti e altri 25 sono attualmente in fasi diverse di valutazione.

La finalità del sottoprogetto 4 è quella di elaborare un piano di cura e assistenza personalizzato del paziente oncologico anziano, A tal fine, presso il CRO di Aviano, è stata costituita una Unità di Valutazione Geriatrica (UVG).

Si tratta di un team multidisciplinare, nel cui ambito le singole figure professionali interagiscono, ciascuno con la propria competenza, per delineare il profilo clinico funzionale della persona anziana. Questa unità è formata da un medico esperto in onco-geriatria, un infermiere di ricerca, uno psicologo.

La valutazione del paziente prevede:

- colloquio psicologico-clinico;
- valutazione infermieristica;
- prelievi ematochimici e valutazione clinico-strumentale cardiologica;
- somministrazione dei test;
- scale di *performance*.

Il reclutamento ha registrato ad oggi la valutazione di 199 pazienti anziani con diverse patologie tumorali.

Inoltre, è stata creata una scheda informatica per la raccolta ed elaborazioni dati dell'attività del progetto, con la finalità di ottenere un database per l'anziano oncologico.

La finalità del sottoprogetto 5 è quella di misurare il grado di soddisfazione del paziente rispetto all'assistenza che ha ricevuto. Per effettuare tale studio, sono stati prescelte sia la scheda per VGM (Valutazione Geriatrica Multidimensionale) che il questionario elaborato nell'ambito del progetto europeo EUROFAMCARE (*Services for supporting family carers of elderly people in europe: characteristics, coverage and usage*) per il *caregiver* familiare e sono stati elaborati i consensi informati per la partecipazione allo studio sia del paziente che del *caregiver*.

È stato inoltre elaborato un apposito database elettronico per l'inserimento dei dati che sarà a disposizione di tutti i centri che svolgeranno la stessa ricerca.

Nel primo anno di attività sono state arruolate 32 coppie paziente anziano-*caregiver* presso l'Unità Operativa Radioterapia 1 dell'INT di Milano e 14 coppie paziente-*caregiver* presso l'Unità Operativa Oncologia INRCA- IRCCS di Roma.

Per ogni coppia arruolata sono stati raccolti:

- il consenso informato sia del paziente che del *caregiver*;
- la scheda VGM per il paziente. Questa scheda prevede una valutazione complessiva delle condizioni dell'anziano: stato demografico, socio-economico, psico-sociale, cognitivo, affettivo e funzionale, il grado di disabilità e le caratteristiche tumorali;
- il questionario EUROFAMECARE per il familiare. Il questionario viene compilato per indagare le caratteristiche e le conseguenze della relazione di assistenza.

È importante sottolineare che al sottoprogetto 5 afferiscono anche Associazioni, come la FAVO (Federazione italiana delle Associazioni di Volontariato in Oncologia) e l'AIMaC (Associazione Italiana Malati di cancro, parenti e amici), impegnate da anni nella tutela dei diritti dei malati oncologici e nella realizzazione di opportune strategie informative.

Queste associazioni sono coinvolte in tale studio nella valutazione delle condizioni globali dell'anziano al fine di una migliore programmazione degli interventi socio-assistenziali a lui destinati. Si intende perseguire tale scopo mediante una serie di interventi miranti al monitoraggio dei bisogni espressi dal paziente oncologico anziano e dal *caregiver*, con la successiva elaborazione di strategie idonee al raggiungimento di un maggior grado di soddisfazione delle istanze raccolte.

Per quanto riguarda l'attività svolta dalla FAVO è in via d'approvazione la formulazione di un questionario esplorativo per sondare il vissuto del personale medico e i possibili bisogni degli operatori nella prestazione di cura del paziente oncologico anziano; inoltre è stata predisposta una fase di valutazione delle competenze dei volontari attraverso l'utilizzo di questionari e focus-group; tale fase sarà propedeutica alla successiva fase di formazione.

Per personalizzare i percorsi riabilitativi e di cura sono state avviate le seguenti azioni:

- è stata avviata l'elaborazione di una scheda per la raccolta delle informazioni relative al numero di richieste di assistenza domiciliare afferenti alle associazioni confederate alla FAVO. Tale scheda verrà sottoposta agli operatori di quelle associazioni che si renderanno disponibili alla raccolta dati;
- è in via di definizione una collaborazione con l'unità operativa dell'oncologia medica dell'INRCA di Roma, per la somministrazione di un questionario esplorativo che valuti il vissuto del *caregiver* del paziente oncologico anziano.

Per quanto riguarda l'AIMaC, questa associazione partecipa al raggiungimento degli obiettivi previsti dal progetto attraverso la rilevazione dei bisogni informativi del paziente oncologico anziano con particolare attenzione alla relazione che stabilisce con il *caregiver*.

Nella prima fase progettuale, AIMaC ha realizzato le seguenti attività:

- individuazione di strumenti informativi più adatti al malato oncologico anziano e ai *caregiver*;
- predisposizione di una campagna di distribuzione del materiale informativo;
- formazione e aggiornamento dei volontari dell'help-line;
- predisposizione dell'aggiornamento del sito AIMaC.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del WP4 è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del WP4 - Approccio socio-assistenziale alle problematiche del paziente oncologico anziano**

<b>Proponente</b> <i>(Responsabile scientifico del WP)</i>	<b>Titolo del sottoprogetto</b>	<b>Ente di appartenenza</b> <i>(responsabile scientifico dei sottoprogetti)</i>
ISS <i>(Stefano Vella, coordinatore)</i>	1. Approcci innovativi alla gestione socio-assistenziale del paziente oncologico anziano	ISS <i>(Loredana Falzano)</i>
	2. Sperimentazione di un modello di gestione assistenziale integrata del paziente oncologico anziano	Maugeri <i>(Maria Rosa Strada)</i>
	3. Studio prospettico sulla gestione integrata socio-assistenziale del soggetto oncologico, in pazienti di età superiore ai 70 anni, al fine di elaborare un nuovo modello organizzativo per l'integrazione tra assistenza ospedaliera ed extra-ospedaliera	IOV <i>(Oreste Terranova)</i>
	4. Identificazione e quantificazione dei problemi legati all'invecchiamento ed elaborazione di un piano di cura e assistenza personalizzato	CRO <i>(Lucia Fratino)</i>
	5. Bisogni assistenziali in adulti senior. Le variabili confondenti nella relazione paziente/caregiver	INT <i>(Patrizia Olmi)</i>



# COMUNICAZIONE E STRUTTURE INFOMATIVE IN ONCOLOGIA

Stefano Vella

*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Base di partenza e rationale

È oggi ritenuto di fondamentale importanza promuovere un miglioramento della comunicazione tra addetti alla ricerca, medici oncologi, pazienti e pubblico in generale. In Italia, si sperimenta la mancanza di strutture di comunicazione adeguate in grado di rispondere efficacemente alle esigenze di informazione corretta del pubblico e del paziente, soprattutto riguardo alle nuove terapie sperimentali. La necessità di colmare una lacuna esistente nel settore dell'informazione organizzata ai pazienti è testimoniata anche dall'esistenza di iniziative spontanee promosse da associazioni pazienti in Italia e in Europa.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Gli obiettivi del *Work Package* (WP) 5 sono:

- migliorare l'informazione ai malati e alla loro rete di assistenza e relazione;
- migliorare la comunicazione tra ricercatori, medici oncologi e pazienti e pubblico in generale;
- migliorare la qualità di vita dei malati oncologici garantendo loro accoglienza e orientamento costanti e documentati ai servizi disponibili;
- costituire un modello unitario su tutto il territorio nazionale di struttura informativa per malati di cancro e realizzare un "telefono verde" nazionale di informazione e supporto ai cittadini su prevenzione, diagnosi e terapia dei tumori e sulle modalità di accesso alle stesse.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

### Fase 1- Azione preparatoria

Per uniformare e armonizzare le numerose proposte progettuali pervenute è stata necessaria un'azione preparatoria di 4 mesi, coordinata da Stefano Vella. Al fine di evitare la frammentazione di iniziative e sovrapposizioni di contenuto, estrapolando solo le componenti dei progetti in linea con gli obiettivi del programma, garantendone la stabilità economica e accorpare attività e obiettivi progettuali sovrapponibili, le proposte sono state uniformate e armonizzate valorizzando prodotti realizzati in progetti, già finanziati dal Ministero, accomunati dall'obiettivo di costituire un modello di accoglienza, comunicazione e assistenza alle persone che affrontano patologie tumorali, con particolare attenzione agli aspetti psicologici.

Le proposte di attività presentate sono state valutate valorizzandone i punti di forza coi seguenti criteri: sostenibilità dei prodotti nel tempo, creazione di modelli trasferibili in ambito sociosanitario, valenza nazionale attraverso coinvolgimento di strutture distribuite sull'intero territorio e competenza acquisita dell'ente proponente nell'ambito degli obiettivi programmatici.

Le proposte selezionate sono suddivise in 6 sottoprogetti principali:

- Servizio Nazionale di Informazione in Oncologia (ISS, AIMaC, INT, CRO, IEO, FAVO).
- Studio dell'impatto di un programma formativo sugli skill comunicativi dei medici nel ridurre il distress dei pazienti (IRE).
- Prevenzione Oncologica primaria e secondaria: azioni educative e d'intervento (INT, ITB).
- Ruolo degli infermieri nella ricerca clinica negli IRCCS oncologici: censimento e progetto di formazione (Pascale).
- Rispondere all'esigenza di informazione del paziente oncologico e dei *caregiver* (UO Oncologia IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo).
- L'umanizzazione in oncologia: un modello che collega gli aspetti strutturali organizzativi e relazionali in gioco (HSR).

## Fase 2 - Gruppi di lavoro

Si sono costituiti 3 gruppi lavoro per l'ottimizzazione dei risultati ed evitare frammentazione di iniziative e sovrapposizioni:

### – Gruppo di lavoro 1: informazione

L'attività prevede la raccolta e censimento del materiale informativo disponibile sul territorio nazionale, valutazione etica, integrazione ed elaborazione del materiale, aggiornamento e valutazione di qualità del materiale informativo. L'attività svolta è stata:

1. Preparazione della bozza del "Documento-guida alla valutazione di qualità del materiale informativo ad uso dei pazienti, familiari e cittadini": contiene i principi e le griglie per effettuare la valutazione di qualità delle risorse da recensire e diffondere in rete.
2. Realizzazione del sito [www.cignoweb.it](http://www.cignoweb.it): in fase avanzata di realizzazione sia riguardo al prototipo software sia al lavoro di raccolta del materiale attraverso il contatto con Associazioni e Organizzazioni produttrici di materiale, al censimento delle help-line, al lavoro sulle griglie di valutazione.
3. Le UO di progetto INT e UO CRO hanno delineato le Procedure di Qualificazione che stabiliscono le caratteristiche organizzative e di attività per Punti di Informazione e Accoglienza (PI) operanti in strutture sanitarie ove sia presente l'ambito oncologico per diagnosi e cura e quindi per i PI del Servizio Nazionale Informativo Sul Cancro che sul piano scientifico e metodologico, si baserà sulle esperienze dei suddetti progetti precedenti e sulla collaborazione tra i PI già esistenti sul territorio nazionale.

### – Gruppo di lavoro 2: formazione

L'attività prevista è rivolta ai medici, infermieri e operatori dei PI afferenti al Servizio Nazionale di Accoglienza e Informazione. L'attività svolta è stata:

1. Valutazione dello stile comunicativo di materiale informativo – forma, termini, comprensibilità – per ridurre l'impatto emotivo negativo sul lettore. Predisposizione di una Scheda di Valutazione dello Stile Comunicativo tesa a rilevare gli aspetti indicativi della buona qualità del materiale attraverso: comprensibilità, relatività dell'informazione, impatto emotivo. Sono stati valutati i seguenti libretti AIMaC:

- Cosa dico ai miei figli
- Il cancro avanzato
- Il cancro della mammella
- Il cancro dell'ovaio
- Il cancro della tiroide
- La chemioterapia

La valutazione ha richiesto il lavoro di un team di psicologi che hanno analizzato individualmente il testo sulla base della Scheda di Valutazione, passando poi a un lavoro di confronto-discussione delle singole osservazioni e all'individuazione dello stile adeguato, nel rispetto dei contenuti.

2. Realizzazione del Programma di Formazione degli operatori dei PI, per prepararli adeguatamente all'"Accoglienza" e all'"Informazione" previste nel Programma del Servizio Nazionale, con contenuti e metodologie condivisi da un gruppo di esperti. Contestualmente, è stato organizzato, per la prima volta, un Corso di Formazione rivolto ai Volontari del Servizio Civile del Progetto "Informa Cancro" di AIMaC (Roma, centro Congressi Raffaele Bastianelli dell'IRCCS IRE, 11-13 dicembre 2008), con obiettivo di fornire conoscenze, competenze e indicazioni sulle norme comportamentali da tenere nello svolgimento della loro attività nell'ambito del Servizio Nazionale di Accoglienza e Informazione in Oncologia. Hanno partecipato: 33 Volontari del SCN che dal 7 gennaio 2009 saranno impegnati nei PI degli IRCCS di Aviano, Roma, Bari, Napoli, Genova, Milano, Pavia e in altre strutture ospedaliere e universitarie di Roma e Napoli; 8 Uditori: Operatori Locali di Progetto, documentalisti e psicologi. Tutti i partecipanti saranno chiamati a confrontarsi con pazienti oncologici e loro familiari in momenti delicati del percorso di cura, sia per le scelte da operare – per le quali conoscenze e informazione rivestono un ruolo fondamentale – sia per lo stato emotivo che caratterizza il confrontarsi con una malattia potenzialmente mortale: in considerazione della rilevanza dei fattori psicologici implicati nella richiesta di informazioni, si è ritenuto necessario sviluppare l'aspetto dell'Accoglienza come prima e imprescindibile fase della risposta alla domanda informativa.

– *Gruppo di lavoro 3: organizzazione e messa in rete dei risultati*

L'attività prevista consiste nell'individuazione e diffusione di un modello per la costituzione di punti di informazione sul territorio nazionale, nella definizione della loro operatività e interazione tra loro e con altre realtà attive nel campo. L'attività svolta è stata: Lo sforzo organizzativo del corso di formazione ha prodotto un importante materiale didattico utilizzabile per la formazione generale di psicologi, documentalisti e medici che opereranno nell'ambito del Servizio Nazionale di Accoglienza e Informazione in Oncologia. Il modello formativo univoco realizzato costituisce un prerequisito per impostare i PI sul territorio nazionale con modalità organizzative e operative condivise nel progetto e descritte nelle Procedure di Qualità, costituendo i nodi della Rete del Servizio Nazionale. È in fase di organizzazione un organismo, all'interno del progetto, con funzioni di Cabina di Regia (coordinamento, controllo, gestione della Rete) per:

- elaborare strategie, direttive, linee-guida riguardanti le attività e iniziative utili al funzionamento del Servizio Nazionale;
- ideare e realizzare strumenti che garantiscano il funzionamento ideale della Rete, *in primis* un sito web della Rete contenente ambienti dedicati all'attività e comunicazione degli operatori dei PI;
- garantire l'omogeneità nell'erogazione del servizio dei PI e la loro modulazione sulla base delle specificità delle utenze;

- vigilare su efficienza del servizio e efficacia della risposta al bisogno nei PI (servizio all'utenza, formazione degli operatori, raccolta e gestione dei dati del bisogno e della risposta e dei dati della User satisfaction);
- valutare la bontà di proposte avanzate dai singoli componenti della Rete, che modifichino significativamente le attività del Servizio;
- essere referente per eventuali allargamenti della Rete (proposte di adesione da parte di altre Strutture, apertura di altri PI anche in ambiti diversi da quello ospedaliero: biblioteche pubbliche e scolastiche, attività informative nelle scuole);
- essere soggetto proponente/referente per collaborazioni, convenzioni, progetti finanziati con altri soggetti (Istituzioni, Associazioni, Fondazioni, Aziende Ospedaliere);
- gestire in modalità uniforme la promozione e pubblicizzazione del Servizio Nazionale e dei PI.

La Fondazione INT ha elaborato un database di rilevazione dati dell'attività dei PI (condiviso sul piano dei contenuti con gli altri IRCCS oncologici partecipanti), già testato e operante in alcuni di essi, che verrà distribuito a tutti i PI sul territorio nazionale. Esso raccoglie i dati in modo univoco dal punto di vista semantico e informatico per analisi statistiche rispetto ai bisogni informativi e alle risposte date da parte dei PI e permette una verifica di attività della messa in rete dei PI.

## Articolazione del progetto

L'articolazione (oltre alla distribuzione dei finanziamenti, per un totale di 900.000 €) del WP5 è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del WP5 - Comunicazione e strutture informative in oncologia**

<b>Proponente</b> <i>(Responsabile scientifico del WP)</i>	<b>Titolo del sottoprogetto</b> <i>(finanziamento)</i>	<b>Ente di appartenenza</b> <i>(responsabile scientifico dei sottoprogetti)</i>
ISS <i>(Stefano Vella, coordinatore)</i>	Servizio Nazionale di Informazione in Oncologia <i>(590.000 €)</i>	ISS <i>(Stefano Vella)</i> AlMaC <i>(Francesco De Lorenzo)</i> INT <i>(Rosaria Bufalino)</i> CRO <i>(Ivana Truccolo, Maria Antonietta Annunziata)</i> IEO <i>(Flavio Nascè)</i> FAVO <i>(Francesco De Lorenzo)</i>
	Studio dell'impatto di un programma formativo sugli skill comunicativi dei medici nel ridurre il distress dei pazienti <i>(80.000 €)</i>	IRE <i>(Anita Caruso)</i>
	Prevenzione oncologica primaria e secondaria: azioni educative e d'intervento <i>(40.000 €)</i>	ITB <i>(Francesco Schittulli)</i>
	Ruolo degli infermieri nella ricerca clinica negli IRCCS oncologici: censimento e progetto di formazione <i>(110.000 €)</i>	Pascale <i>(Franco Perrone)</i>
	Rispondere all'esigenza di informazione del paziente oncologico e dei caregiver <i>(30.000 €)</i>	S.Giovanni Rotondo <i>(Evaristo Maiello)</i>
	L'umanizzazione in oncologia: un modello che collega gli aspetti strutturali organizzativi e relazionali in gioco <i>(50.000 €)</i>	HSR <i>(Gianna Zoppei)</i>

# BASI SCIENTIFICHE PER LA DEFINIZIONE DI LINEE GUIDA IN ONCOLOGIA

Rosella Silvestrini  
Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Milano

## Base di partenza e razionale

Il progetto prende origine da una pregressa e consolidata esperienza avviata nel 1996 nell'ambito dei Progetti Finalizzati e successivamente di quelli Strategici sponsorizzati dal CNR-MIUR nel settore dell'oncologia sulla formulazione e pubblicazione di volumi sulle "Basi Scientifiche per la definizione di Linee Guida (BSLG) in ambito clinico per le diverse patologie oncologiche". Questa iniziativa ha portato alla pubblicazione di diversi volumi (alcuni aggiornati nel tempo) sui seguenti argomenti:

- tumori di mammella, utero e ovaio (1996);
- tumori dell'età pediatrica (1996) ;
- tumori testa e collo (1999);
- melanoma cutaneo (2000);
- sarcomi dei tessuti molli (2002);
- tumori rari (2002);
- osteosarcoma (2003);
- tumore del colon-retto (2004);
- tumore della prostata (2004);
- epatocarcinoma (2005);
- terapie loco-regionali (2005);
- tumore della vescica (2005);
- tumori della tiroide. (2006);
- tumori del polmone (2007).

Queste pubblicazioni (accessibili in passato dal sito *ad hoc* [www.progettooncologia.cnr.it](http://www.progettooncologia.cnr.it) e attualmente anche dal sito di ACC, <http://www.alleanzacontroilcancro.it>) hanno suscitato un notevole interesse nella comunità clinico-scientifica.

I testi redatti da qualificati esperti interdisciplinari hanno lo scopo di raccogliere informazioni aggiornate sui principali aspetti biologici e clinici relativi alle varie patologie, evitando dispersione di conoscenze e risorse, di fornire gli elementi utili per costruire percorsi diagnostico-terapeutici in linea con i più attuali standard, nonché di identificare spunti per sviluppi futuri della ricerca. Si tratta di compendi facilmente consultabili, destinati ad un pubblico costituito sia da ricercatori, clinici e operatori sanitari in genere, ma anche da Comunità di pazienti e Associazioni di volontariato, nell'ottica di favorire e migliorare la diffusione delle conoscenze via via emergenti.

La pregressa esperienza, consistente nella formulazione di testi per numerose patologie, ha dimostrato come questa iniziativa abbia favorito lo scambio di informazioni e idee e consentito di realizzare un'importante interazione tra ricercatori e clinici e, nell'ambito di questi ultimi, tra specialisti interdisciplinari.

I volumi pubblicati vengono distribuiti ad una vasta Comunità clinico-scientifica, in occasione degli eventi congressuali, e i testi sono accessibili online a tutti gli operatori del

Servizio Sanitario Nazionale in accordo con la crescente richiesta di informazione e di aggiornamento per via informatica.

## **Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto**

Il progetto proposto ha come obiettivo finale la formulazione di volumi contenenti le “Basi Scientifiche per la definizione di Linee Guida in ambito clinico (BSLG)” per le diverse patologie oncologiche; e si propone di:

- estendere l’iniziativa ad altre patologie, finora non considerate,
- provvedere all’aggiornamento di volumi, già pubblicati, relativi ad alcune patologie qualora se ne ravvedesse l’opportunità o la necessità.

## **Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati**

In linea con il Progetto supportato da ACC, e in particolare con gli obiettivi previsti per il primo anno di attività, è stata portata a termine la formulazione dei testi delle BSLG relativamente ai tumori dell’età pediatrica e al carcinoma renale:

### *– Tumori dell’età pediatrica*

Questo primo volume, pubblicato nel settembre 2008, rappresenta in realtà una rivisitazione aggiornata, sollecitata vivamente dalla Comunità Clinico-Scientifica e dai Medici Specialisti, di quello già pubblicato nel 1996 nell’ambito del Progetto Finalizzato “Applicazione Clinica della Ricerca Oncologica” (PF ACRO) con la sponsorizzazione del Consiglio Nazionale delle Ricerche e di cui era già stata proposta una parziale revisione nel 2003, limitatamente agli Osteosarcomi.

L’iniziativa, dedicata al Prof. Guido Paolucci, fondatore dell’Oncologia Pediatrica in Italia, è stata coordinata dal Prof. Giuseppe Basso e dalla Prof.ssa Rosella Silvestrini.

Considerata l’eterogeneità dei tumori dell’età pediatrica, sono stati trattati separatamente i singoli istotipi: leucemie linfoblastiche e mieloidi, linfomi, neuroblastomi, sarcomi, tumori cerebrali, tumori di Wilms e renali, tumori rari e istiocitosi, mentre l’ultimo capitolo è stato dedicato al trapianto di cellule staminali emopoietiche e a terapie cellulari innovative.

I testi relativi alle varie patologie sono stati formulati da 10 esperti, facenti parte del Gruppo di Studio, scelti tra i più qualificati del settore a livello nazionale e affiancati da altri collaboratori.

Il testo è stato poi sottoposto per approvazione ad un Gruppo di Consenso composto da membri afferenti ai più importanti Enti Nazionali, Università, Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico e Ospedali.

Alcuni capitoli sono corredati di flow-chart diagnostico-terapeutiche di immediata consultazione e propedeutiche alla formulazione di Linee Guida cliniche operative.

Questi volumi sono in corso di distribuzione presso i Centri afferenti all’Associazione Italiana di Ematologia Oncologica Pediatrica (AIEOP) distribuiti su tutto il territorio nazionale e, limitatamente al numero di volumi disponibili, presso le Scuole di Specialità e tra i giovani Pediatri.

Ancora, e importante, grazie alla validissima collaborazione di ACC, tutto il testo è già accessibile online sul sito [www.alleanzacontroilcancro.it](http://www.alleanzacontroilcancro.it), assieme agli analoghi volumi pubblicati precedentemente per le altre patologie oncologiche.

– *Carcinoma renale*

Questa patologia non è mai stata trattata nell'ambito dell'iniziativa BSLG, pertanto il volume recentemente pubblicato nell'ottobre 2008, rappresenta una prima e unica documentazione.

Coordinata dal Prof. Francesco Boccardo e dalla Prof.ssa Rosella Silvestrini, l'opera ha coinvolto ben 17 esperti interdisciplinari, quali componenti del Gruppo di Studio, per la stesura del testo coadiuvati da numerosi e validi collaboratori.

Per la validazione del documento ci si è avvalsi di un Gruppo di Consenso composto da 13 componenti scelti, per la prima volta, tra i Presidenti, o loro rappresentanti ufficiali, delle più importanti Società/Associazioni Nazionali Scientifiche del settore, per garantire una più diffusa condivisione dei contenuti in tutta la Comunità Clinica Nazionale.

L'opera pubblicata rappresenta una rivisitazione aggiornata della letteratura più recente, frutto di una ricerca sistematica attraverso la consultazione delle banche dati più accreditate, e raccoglie anche l'interpretazione degli esperti che sono stati coinvolti nell'estensione del testo e nella condivisione delle principali conclusioni.

Si tratta di un testo consultabile da parte degli Specialisti, dai Medici di Medicina Generale e dagli altri Operatori Sanitari. La forma pur rigorosa ha un taglio sufficientemente divulgativo da permettere la lettura, se non la consultazione, anche da parte degli utenti del Sistema Sanitario. I volumi sono stati e saranno distribuiti tempestivamente nei prossimi Congressi Nazionali del settore.

Anche questo testo, grazie all'efficienza del personale addetto nell'ambito di ACC, è già reperibile online, sempre sul sito [www.alleanzacontroilcancro.it](http://www.alleanzacontroilcancro.it).

Infine, un riconoscimento adeguato va rivolto alla Struttura Segretariale Organizzativo-Scientifica presente stabilmente presso la Prof.ssa Silvestrini all'Istituto Nazionale Tumori di Milano.

## **Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto**

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. *Basi scientifiche per la definizione di linee-guida in ambito clinico per i tumori dell'età pediatrica*. Roma: Alleanza contro il Cancro, Istituto Superiore di Sanità; 2008.
2. *Basi scientifiche per la definizione di linee-guida in ambito clinico per il carcinoma renale*. Roma: Alleanza contro il Cancro, Istituto Superiore di Sanità; 2008.

Sono in corso di stampa volumi sui tumori neuroendocrini del tratto gastro-entero-pancreatico e all'esame del Comitato di Consenso la III edizione quello sui tumori del colon-retto.

## PORTALE DI ALLEANZA CONTRO IL CANCRO

Paolo Roazzi, Claudio Di Benedetto

*Servizio Informatico, Documentazione, Biblioteca e Attività Editoriali, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### Base di partenza e razionale

La tecnologia web dell'informazione ha consentito nell'ultimo quinquennio la divulgazione della conoscenza in molti settori del sapere umano.

Una strategia di comunicazione adeguata consente di valorizzare i servizi che la ricerca nel campo della salute umana offre a comunità diverse (cittadini, pazienti, medici, ecc.).

Lo strumento fondamentale per essere presenti sulla rete è la costruzione di un "sito" la cui parte principale è il contenuto, ma soprattutto, l'utilità che gli utenti ne trarranno nell'accedervi. Queste considerazioni hanno condotto i progettisti dell'Istituto, (specialmente quelli del software), a tenere in debito conto quella che è ritenuta una delle caratteristiche più importanti nella progettazione di un portale: l'usabilità. Requisito che è strettamente correlato ai mezzi usati per comunicare (in modo appropriato) e che si concretizza nella amichevolezza dei programmi e nella appropriatezza del messaggio da veicolare. Questa è la ratio seguita presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) nel pianificare il progetto indirizzato alla riduzione del rischio di fondare i progetti comunicativi su requisiti e presupposti inefficaci.

Altra caratteristica di cui l'ISS ha tenuto conto nella implementazione del progetto è l'accessibilità.

Internet è il protagonista della società dell'informazione, capace di rendere indipendenti e autonomi anche coloro che fino a pochi anni fa non lo erano, come le persone che vivono isolate, i disabili, gli anziani.

Ma è importante sottolineare che l'accessibilità non si rivolge esclusivamente alle persone disabili, ma migliora la fruizione dei siti Internet a tutti gli utenti della rete che sono molto diversi l'uno dall'altro: ognuno ha il proprio browser, che permette di visualizzare le pagine web, ciascuno ha delle preferenze di visualizzazione specifiche. L'accessibilità permette a tutti gli utenti di avere un'esperienza di navigazione e interazione online soddisfacente e senza discriminazioni.

Il Centro Nazionale per l'Informatica nella Pubblica Amministrazione (CNIPA) ha iscritto l'ISS nell'elenco pubblico dei Valutatori ([http://www.cnipa.gov.it/site/it-IT/Attivit%\*c3\*%\*a0\*/Accessibilit%\*c3\*%\*a0\*/Elenco\\_valutatori/](http://www.cnipa.gov.it/site/it-IT/Attivit%c3%a0/Accessibilit%c3%a0/Elenco_valutatori/))

Questo significa che l'ISS ha una struttura organizzativa e tecnologica adeguata per poter valutare se i siti web di altri organismi rispondono ai requisiti di accessibilità, cioè siano fruibili anche da quegli utenti che presentano inabilità fisiche o tecnologiche, secondo quanto prevede la normativa vigente, la cosiddetta legge Stanca (Legge 4/2004). L'iscrizione dell'ISS all'elenco pubblico dei Valutatori rappresenta certamente un riconoscimento importante della capacità di adozione di standard qualitativi elevati. Il CNIPA valuta, infatti, molto attentamente se i soggetti che fanno richiesta di iscrizione all'elenco pubblico dei valutatori hanno le competenze professionali e le dotazioni strumentali adeguate.



## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

L'obiettivo principale del portale di Alleanza è quello di essere strumento di supporto a tutte le attività di comunicazione dei progetti di ACC.

Una strategia di comunicazione adeguata è improntata a valorizzare i servizi che ACC intende offrire a comunità diverse ed è chiaro che Internet offra grandi opportunità. Il Portale ACC vuole sviluppare strumenti idonei per il conseguimento di obiettivi specifici per cui il progetto è stato pensato ed è in via di realizzazione.

Il sito è stato suddiviso per aree e per argomenti e si è cercato di ottimizzare le parole chiavi all'interno dei testi: gli utenti devono trovare sul sito web una logica e immediata rappresentazione delle informazioni e devono facilmente e velocemente capire i contenuti che devono essere "contenuti da leggere sul web" e indicizzabili al meglio sui motori.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Le prime fasi del progetto hanno consentito di pubblicare il portale di ACC il cui indirizzo è <http://www.alleanzacontroilcancro.it>. L'attività è consistita nel:

- disegnare l'infrastruttura logica e fisica del progetto;
- mettere a disposizione l'infrastruttura hardware presso l'Istituto Superiore di Sanità; Le attività ICT di detto progetto, ivi compresi l'hosting e la gestione delle pagine web del portale, sono state svolte dal personale dell'Istituto Superiore di Sanità;
- raccogliere le informazioni e i dati di tutti i partecipanti ai progetti di ACC;
- recuperare i dati dal vecchio sito di Alleanza denominato *e-oncology*;
- creare una sorta di condivisione federata delle responsabilità relative ai contenuti con la partecipazione del team del Direttore Generale di ACC che opera da remoto (Università di Tor Vergata) da estendere ai componenti di tutti i progetti ACC;
- mettere a disposizione il prototipo di portale, effettuare aggiustamenti e correzioni a fronte delle osservazioni finalizzate ad una migliore lettura del portale.

Le prime attività svolte sono state presentate il 21 aprile 2008 al "Convegno di presentazione delle attività iniziate nell'ambito dei programmi 1, 2, 3, 4" svolto presso l'Istituto Superiore di Sanità a Roma.

Relativamente all'infrastruttura applicativa, è stata completata la prima fase, gli obiettivi futuri saranno quelli di implementare un sistema di "comunicazione unificata" per lo scambio di dati e informazioni tra membri di ACC.



**PROGRAMMA 2**  
**Integrazione delle attività di ricerca  
attraverso la costruzione di strutture  
e reti di collaborazione interistituzionali**

*Coordinatore*  
Marco Pierotti



## RETE NAZIONALE BIOBANCHE PER L'ONCOLOGIA

Angelo Paradiso (a), Giovanni Migliaccio (b)

(a) Direzione Scientifica, Istituto Tumori Giovanni Paolo II, Bari

(b) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

### Base di partenza e razionale

Le biobanche sono una risorsa essenziale per identificare le basi molecolari delle malattie e nuovi bersagli per i farmaci, ridurre i costi dello sviluppo degli stessi. Numerosi organismi internazionali e nazionali concordano sulla necessità di:

- costruire una rete nazionale delle biobanche, partendo dalle infrastrutture esistenti, razionalizzando, nel nostro caso, i siti di deposito;
- assicurare l'armonizzazione, la standardizzazione e l'integrazione di queste risorse individuali in una infrastruttura di ricerca nazionale che, nel rispetto del principio di sussidiarietà con le Regioni, dia ai ricercatori italiani gli stessi vantaggi che si stanno realizzando a livello europeo.

La ricerca oncologica di base e clinica, negli ultimi decenni, ha utilizzato sempre di più i tessuti oncologici umani rispetto alle linee cellulari e ai modelli animali. Questa tendenza è sostenuta sia dallo sviluppo degli studi molecolari e citogenetici, sia dal concetto che nel processo neoplastico giochino un ruolo fondamentale la cellula neoplastica e anche l'ambiente che la circonda. Nella raccolta dei tessuti umani neoplastici si osserva una notevole variabilità sperimentale, legata ai diversi procedimenti di manipolazione, ai diversi ambienti clinici, al fatto che l'utilizzazione del materiale è sempre condizionata dal fine primario della diagnosi anatomopatologica. Tuttavia gli studi sui campioni umani sono insostituibili per la comprensione dei meccanismi di cancerogenesi, della progressione del tumore, della resistenza al trattamento e dell'esito dello stesso. Per questo motivo vi è un forte interesse a collezionare tessuti umani clinicamente caratterizzati. La rete italiana delle banche di tessuti per la ricerca sul cancro vuole rispondere a questa necessità mediante la creazione di una rete che favorisca la standardizzazione di tutti i procedimenti riguardanti i campioni che possano minimizzare la variabilità delle manipolazioni associate agli stessi.

La rete nazionale potrà collegarsi all'infrastruttura europea *European Bio-banking and Biomolecular Resources* (BBMRI) alla cui fase preparatoria partecipano ISS e ACC.

### Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

La costruzione di una rete di biobanche deve passare attraverso il riconoscimento dell'importanza di questo servizio che non può essere separata da una sua chiara definizione in termini di compiti e doveri verso la comunità allargata, sia degli utenti che dei cittadini.

L'obiettivo principale di questo progetto è la formazione di un network italiano delle biobanche per l'oncologia da collegare con l'infrastruttura virtuale delle biobanche europee in costruzione, mediante l'identificazione delle risorse disponibili, delle metodologie di lavoro e degli investimenti necessari.

A tale scopo risulta necessario:

- sviluppare un piano di integrazione delle biobanche esistenti in una rete nazionale;
- provvedere un codice di condotta consensuale per il suo funzionamento;
- valutare l’impatto della legislazione corrente sulla raccolta, analisi e messa a disposizione dei dati genetici e clinici raccolti a scopo diagnostico;
- elaborare un piano per un finanziamento sostenibile delle strutture coinvolte.

Inoltre, allo scopo di identificare le potenzialità di raccordo con le infrastrutture europee in costruzione è necessario procedere ad un inventario delle risorse esistenti in termini di campioni biologici raccolti, delle loro caratteristiche e della loro disponibilità per l’uso da parte di una comunità scientifica allargata.

Allo stesso tempo, occorre identificare quali sono i bacini di raccolta e le loro potenzialità in termini di patologie, di stili di vita o disponibilità accidentali. L’identificazione di popolazioni preferenziali per la raccolta legate a specializzazioni terapeutiche da parte degli IRRCS oncologici dovrebbe essere usata per favorire la specializzazione e la standardizzazione della raccolta.

Altro obiettivo consiste nell’identificazione dei mezzi necessari per l’integrazione dei database esistenti mediante un sistema operativo di raccordo, possibilmente da identificare fra le risorse libere da restrizioni di tipo commerciale, e il suo adattamento alle necessità italiane. La necessità di utilizzare una lingua e una terminologia comune per la conversione dei dati nel database europeo dovrà essere tenuta in considerazione.

Infine, occorre identificare l’entità istituzionale che faccia da interfaccia con le altre entità europee all’interno delle infrastrutture europee. Tale richiesta sembra essere essenziale alla partecipazione, in quanto le barriere linguistiche e organizzative, incluse quelle legate a sistemi legislativi diversi, richiederanno un sistema del tipo mozzo-ruota che raccolga le comunicazioni fra le Biobanche di stati diversi attraverso un centro di riferimento.

## **Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati**

Il progetto, iniziato il 5/10/07, vanta la partecipazione dei centri oncologici di maggiore rilevanza nazionale, ai quali si sono aggiunti altre Unità Operative (UO) collaboranti che svolgono attività parallele nel medesimo ambito. Le attività hanno avuto inizio con un incontro ufficiale, dei coordinatori del progetto “Network Virtuale Biobanca Oncologica Nazionale”, presso l’Istituto Superiore di Sanità in data 8/10/07, al quale hanno partecipato le UO coinvolte nel progetto, in cui i coordinatori hanno illustrato gli obiettivi da perseguire durante la prima fase. Tali obiettivi si possono riassumere in:

- identificazione delle risorse disponibili;
- definizione di metodologie di lavoro;
- definizione degli investimenti necessari.

L’intenso dibattito scaturito ha portato alla definizione dei criteri operativi della prima fase, volti ad individuare un modello organizzativo e il livello e potenzialità del gruppo. A tal fine i coordinatori hanno ipotizzato una ricognizione capace di fornire informazioni dettagliate sulla situazione delle singole biobanche dei centri partecipanti, attraverso la compilazione di un questionario. Questo ha dato una chiara indicazione sullo stato delle biobanche delle UO partecipanti. I punti salienti sono rappresentati dalla prevalenza degli enti pubblici e del personale utilizzato a tempo parziale per le attività delle biobanche oncologiche.

Dal risultato del questionario risulta inoltre il problema critico della mancanza di un supporto informatico per la gestione delle biobanche, sia nella fase di gestione che nella messa in rete dei

contenuti. Il problema è stato affrontato in primis dall'ISS, che ha avviato una collaborazione con il *Canadian Tumor Repository Network* (CTRnet), sviluppatore del software *open source* ATiM (*Advanced Tissue Management*), per la gestione informatica delle biobanche. Sono stati organizzati diversi incontri, anche in video conferenza, ai quali i responsabili delle UO del progetto hanno partecipato con vivo interesse. Allo stato attuale il software, installato su server dell'ISS, è in fase di ottimizzazione e, a breve, sarà disponibile per chiunque volesse utilizzarlo. Un questionario aggiuntivo sulle caratteristiche IT dei database utilizzati dalle UO è stato sviluppato da Gregorio Mercurio del CNR, il quale ha potuto evidenziare alcuni aspetti rilevanti quali la classificazione dei dati, le tipologie dell'eventuale software costruito *ad hoc*, il tipo di collegamento del database (se isolato, se collegato solo con gli ospedali da dove provengono i campioni, se raggiungibile su rete RUPAR - Rete Unitaria della Pubblica Amministrazione Regionale), tutti aspetti che possono consentire di valutare il "change management" per un sistema in rete.

Ulteriormente rilevanti sono le informazioni sulle schede gestite per valutare anche un eventuale sistema con caricamento manuale via web. L'analisi ha messo in evidenza la necessità di approfondire le domande sul tipo di vocabolario semplice e/o complesso utilizzato (tutti hanno praticamente risposto di averne uno semplice e non ridondante), sul tipo di connessione e con chi (si può dedurre se sono all'interno di un ospedale o meno).

In occasione del *Third EORTC Pathobiology Group Annual Meeting* tenutosi a Milano il 26-27 settembre 2008 sono stati illustrate i punti salienti scaturiti dai risultati del questionario.

Successivamente, in un incontro dello staff di coordinamento, tenutosi a Bari il 5 giugno 2008, si è discusso:

- della necessità di una proroga della scadenza del progetto,
- dei criteri di inclusione delle UO "esterne" che hanno richiesto l'aggregazione pur non essendo specificamente Cancer Oriented, con la decisione di includere le stesse a costo zero.
- della necessità di realizzare una pagina web dedicata alla Rete Italiana BioBanche per l'Oncologia sul sito di ACC, al fine di diffondere le attività del gruppo e le pubblicazioni inerenti. A tal fine è stato costituito il gruppo di lavoro che si riunirà per un primo incontro in dicembre a Roma.

Nell'incontro si è discusso, inoltre, dell'opportunità di redigere un documento in grado di fornire criteri razionali per l'adozione di un consenso informato per la conservazione e utilizzo di materiale biologico residuale umano.

Rappresentanti della rete hanno partecipato, nel corso del primo anno di attività, a diversi incontri nazionali ed europei ed, in particolare, ai lavori per la creazione dell'infrastruttura europea BBMRI, avente come finalità la creazione di un network europeo di centri di risorse biologiche condivisibili.

Tali eventi sono di seguito elencati:

1. *EORTC Pathobiology Group Annual Meeting* – 26-27 settembre 2008, Milano.
2. *Biorepositories Networking Software Workshop* – 17-17 ottobre 2008, Milano.
3. *Joint Meeting of BBMRI Participants and Associated Members* – 17-18 aprile, Firenze.
4. *Joint Meeting of BBMRI Participants and Associated Members* – 29 maggio 2008, Barcellona (Spagna).
5. *Workshop on "Biorepositories Networking Software"* – 8 ottobre 2008, Milano.
6. *Workshop on "International Biorepositories Initiatives"* – 9 ottobre 2008, Milano.
7. *Meeting of BBMRI-WorkingProject* – 4 novembre 2008, San Feliu de Guixols (Spagna).
8. *OEI Pathobiology workshop* – 24-25 ottobre 2008, Cluj Napoca (Romania).

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del progetto Rete nazionale biobanche per l'oncologia**

<b>Proponente</b> ( <i>Cordinatori della rete</i> )	<b>Ente di appartenenza dell'UO</b>	<b>Responsabile scientifico delle UO</b>
ITB ( <i>Angelo Paradiso</i> ) ISS ( <i>Giovanni Migliaccio</i> )	ISS	Paolo Roazzi
	ITB	Giuseppe Pelagio
	IRE	Marcella Mottolese
	Pascale	Gerardo Botti
	INT	Maria Grazia Daidone
	CRO	Agostino Steffan
	ISTGE	Mauro Truini
	IEO	Salvatore Pece
	IOV	Massimo Ruge
	IDI	Tullio Faraggiana
	IOR	Marco Alberghini
	Multimedica	Adriana Albini
	Besta	Serena Pellegatta
	HSR	Fabio Ciceri

## Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Mangia A, *et al.* Touch-imprints in tumour tissue bank for confirmation of neoplastic cellularity and DNA extration. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2008;132:974-8.
2. Paradiso A, Pelagio G, Tirelli V, Migliaccio G, on behalf of RIBBO participating Institutions. Cancer oriented biobanks: networking activities in Italy. (inviato per la pubblicazione)



## **RETE NAZIONALE PER STUDI CLINICI E DI STRUTTURE GMP PER LE BIOTERAPIE DEI TUMORI**

Giorgio Parmiani (a), Enrico Proietti (b)

(a) *Unità Immuno-Bioterapia Tumori Solidi Fondazione S. Raffaele del Monte Tabor, Milano*

(b) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### **Base di partenza e razionale**

Di recente, in editoriali su riviste internazionali di grande prestigio, è stata sottolineata l'importanza di promuovere le terapie sperimentali antitumorali su base biologica come disciplina specifica, evidenziandone le potenzialità di ricaduta e le caratteristiche peculiari, e suggerendo iniziative idonee a garantirne il pieno sviluppo. Il trasferimento alla sperimentazione clinica dei risultati della ricerca nel settore delle bioterapie innovative contro i tumori è stato rilevante in alcuni Paesi europei, in Giappone e, in modo particolare, negli Stati Uniti, mentre in Italia si registrano notevoli ritardi e carenze in questo processo. Tale situazione ha motivato il riconoscimento della necessità della creazione in Italia di una rete nazionale per la promozione della ricerca clinica/traslazionale nel settore delle bioterapie e dell'immunoterapia dei tumori e per la realizzazione di infrastrutture a supporto di tale sperimentazione. A tale riguardo, è interessante sottolineare, che proprio ricercatori americani leader nel settore dell'immunoterapia hanno recentemente evidenziato i problemi specifici (carenza di coordinamento e cooperazione sia tra le diverse istituzioni pubbliche che operano nel campo, sia tra enti pubblici e privati; complessità della regolamentazione riguardo alle procedure per la preparazione di prodotti cellulari per uso clinico) che limitano il trasferimento di approcci sperimentali bioterapeutici in applicazioni cliniche, identificando nello sviluppo di collaborazioni strategiche tra le diverse istituzioni operanti in questo settore la base di partenza per superare le barriere che ostacolano il pieno sviluppo delle grandi potenzialità applicative di questi approcci terapeutici. Infatti, per il loro ottimale sviluppo clinico, queste nuove modalità terapeutiche devono prevedere il coinvolgimento di più figure professionali che operano in ambito clinico e pre-clinico, regolatorio e industriale, che possano interagire culturalmente e, soprattutto, operativamente. Ciò rende indispensabile uno sforzo unitario per poter portare in clinica nuove modalità terapeutiche valutandone con tempestività, appropriatezza e rigore clinico-scientifico l'efficacia. Infine, la bioterapia dei tumori consolidandosi sempre più come ulteriore strategia clinica "strutturata" nel percorso terapeutico del paziente oncologico, pone nuove e specifiche problematiche di tipo procedurale, etico e medico-legale, sia nella sperimentazione terapeutica che nella pratica clinica. Sulla base di queste considerazioni, gruppi di ricercatori italiani operanti in ambito pre-clinico e clinico hanno costituito nel settembre 2004 un'associazione, il Network Italiano per la Bioterapia dei Tumori (NIBIT) che persegue i seguenti obiettivi: i) promuovere interazioni scientifiche tra figure professionali operanti nel campo delle bioterapie dei tumori (accademia, industria, agenzie regolatorie); ii) sviluppare strategie e studi clinici multicentrici a livello nazionale nel settore delle terapie innovative dei tumori; iii) sviluppare iniziative tese ad informare i pazienti sul potenziale terapeutico delle nuove terapie biologiche antitumorali. In particolare, in seguito al recepimento delle direttive europee sulla sperimentazione clinica e sull'armonizzazione della legislazione dei prodotti farmaceutici, esiste

la necessità di facilitare l'accesso a laboratori in grado di preparare farmaci biologici in condizioni di GMP (*Good Manufacturing Practice*), come imposto dalle direttive europee. Tale esigenza appare particolarmente urgente per quanto riguarda i prodotti medicinali avanzati, basati su cellule. Inoltre, lo sviluppo e la standardizzazione di metodiche per il monitoraggio della risposta alle bioterapie e all'immunoterapia sono particolarmente cogenti per l'identificazione di biomarcatori predittivi della risposta biologica e clinica. Si ritiene quindi opportuna la realizzazione di una rete nazionale per la promozione della ricerca clinica e di strutture di produzione GMP nel settore delle bioterapie dei tumori, che veda la partecipazione di tutti gli "attori" potenzialmente coinvolti, compresi i rappresentanti di agenzie regolatorie in grado di svolgere un ruolo di consulenza e orientamento per il trasferimento alla clinica dei risultati generati dagli IRCCS e altri istituti di ricerca pubblici.

Gli studi clinici di bioterapie, e in particolare di immunoterapia, devono però essere sostenuti da un accurato e dettagliato monitoraggio della risposta biologica che il trattamento innesca *in vivo*, finalizzato all'identificazione di parametri che si associno all'efficacia terapeutica del trattamento. Per quanto diverse metodiche siano attualmente disponibili per l'identificazione e la caratterizzazione di tale risposta, non esiste, al momento, un consenso riguardo all'approccio tecnologico ottimale di monitoraggio, che peraltro dipende strettamente dalla tipologica di terapia biologica (vaccini, anticorpi, immunoterapia cellulare, ecc.) in valutazione. Inoltre, alcune delle metodologie di monitoraggio soffrono di variabilità tecnica molto ampia, che richiede quindi una competente standardizzazione e validazione. Un accurato monitoraggio immuno-biologico richiede infine competenze specifiche non facilmente istituibili a livello capillare nei diversi centri coinvolti nella sperimentazione clinica di bio-immunoterapie.

Nel complesso risulta quindi cruciale poter costituire una rete che permetta, anche in stretta cooperazione con il NIBIT, lo sbocco verso la clinica delle notevoli esperienze in ambito preclinico maturate in Italia nel campo delle bioterapie dei tumori.

## **Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto**

L'obiettivo principale del presente progetto è quello di realizzare in Italia una rete nazionale per la promozione della ricerca clinica nel settore delle bioterapie e dell'immunoterapia dei tumori e per la realizzazione di infrastrutture a supporto di tale sperimentazione clinica. Tale obiettivo sarà perseguito attraverso lo sviluppo di iniziative a molteplici livelli che hanno i seguenti scopi:

1. Promozione della ricerca italiana sulle bioterapie dei tumori attraverso organizzazione di meeting e workshop, al fine di generare documenti consensus e iniziative specifiche su temi di particolare cogenza per favorire la competitività della ricerca clinica nazionale e la sua integrazione nel contesto internazionale. Il coinvolgimento di giovani medici e ricercatori con esperienza in ricerca traslazionale e protocolli clinici sarà indispensabile per attuare una fase di educazione ai metodi da utilizzare per il disegno e la conduzione di studi clinici nel settore delle nuove bioterapie antitumorali.
2. Sviluppo e standardizzazione di metodi e tecnologie per la definizione di marcatori di risposta biologica e clinica e per il monitoraggio delle risposte biologiche e immunologiche a trattamenti di bioterapia e/o immunoterapia.
3. Definizione di un documento consensus e preparazione di linee guida su nuovi piani di sviluppo clinico e farmaceutico per prodotti da utilizzare per la bioterapia dei tumori, con particolare riferimento ai prodotti medicinali avanzati. Tali obiettivi verranno realizzati attraverso: i) organizzazione di incontri, workshop, e conferenze; ii) attività di formazione e informazione per gli aspetti tecnici e regolatori sullo sviluppo di medicinali per

bioterapia e sulle procedure autorizzative, mediante la creazione di un ufficio di riferimento (*contact point-help desk*) e collegamento con AIFA.

4. Sviluppo di un network di strutture GMP, identificando le risorse disponibili in termini di metodologie, programmi attualmente in corso, autorizzazioni esistenti o programmate, competenze e potenziale di attrazione di finanziamenti e di offerta di servizi.
5. Realizzazione di studi di fattibilità e di convalida per metodiche, materiali e standard di riferimento, relativamente alla produzione, caratterizzazione/controllo di qualità, e conservazione GMP di prodotti medicinali avanzati.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Nel primo anno di attività tutte le UO coinvolte nello sviluppo dei diversi WP hanno collaborato attivamente alle iniziative indicate.

Il presente progetto comprende 5 *Work Package* (WP):

- WP1. Promozione della ricerca sulle bioterapie dei tumori attraverso la promozione della comunicazione. Responsabili: Maria Ferrantini (ISS), Michele Maio (NIBIT);
- WP 2. Definizione e divulgazione di metodi per il disegno e la conduzione di trias clinici di bioterapia dei tumori attraverso convegni, workshops tematici e corsi di formazione. Responsabili: G. Parmiani (HSR/NIBIT), C. Pintus (AIFA);
- WP3. Costruzione di una rete per lo sviluppo e la standardizzazione di metodiche per il monitoraggio immunologico e l'identificazione di biomarcatori della risposta alla bioterapia dei tumori. Responsabili: P. Nisticò (IFO/NIBIT), L. Rivoltini (INT Milano/NIBIT);
- WP4. Sviluppo di documenti consensus, di linee guida e documenti divulgativi degli aspetti regolatori. Informazioni sulla normativa (Help Desk). Responsabili: A.R. Meneguz (ISS), P. Ascierio (Pascale/NIBIT);
- WP5. Supporto alla realizzazione di una rete di laboratori GMP per la produzione di prodotti medicinali avanzati. Responsabile: Giovanni Migliaccio (ISS).

Nell'ambito del WP1 e in collaborazione con altre UO afferenti al Progetto e al Network Italiano per la Bioterapia dei Tumori (NIBIT) sono state realizzate le seguenti iniziative:

1. Costruzione del sito web del NIBIT ([www.nibit.org](http://www.nibit.org)) che è ormai in fase finale di organizzazione;
2. Pubblicazione, anche grazie al contributo della Fondazione Federico Calabresi, della guida "Utilizzo dei vaccini in oncologia" indirizzata ai pazienti affetti da neoplasia e agli operatori sanitari non del settore;
3. Organizzazione dell'evento internazionale "International clinical trials' day on biotherapy of cancer", nel contesto della "2008 Scientific Conference and General Assembly of the Organization of European Cancer Institutes" (Genova, 20-24 maggio 2008);
4. Organizzazione del VI Convegno nazionale del NIBIT durante il quale, in aggiunta a specifiche tematiche scientifiche, si è tenuta la Tavola Rotonda "Cancer Immuno-Biotherapy: A shared strategic goal in the international competitiveness of Italy?" che ha visto la partecipazione attiva di rappresentanti di differenti Istituzioni nazionali.

Le UO impegnate alla realizzazione del WP2 hanno pianificato l'organizzazione di master educazionali per la divulgazione degli elementi regolatori basilari e alla creazione di un contatto diretto con esperti del settore per soddisfare esigenze specifiche dei singoli ricercatori che vogliono intraprendere studi di bioterapia antitumorale. Sono state individuate 4 sedi dove

organizzare tali corsi: Milano, Siena o Roma, Napoli e Bari. Nel luglio 2008 è stato organizzato, presso l'Istituto San Raffaele di Milano, il primo dei suddetti master dal titolo "Razionale pre-clinico della bioterapia dei tumori" (vedi sopra). Il secondo master si svolgerà a Napoli, presso l'Istituto Tumori Fondazione "Pascale", nei giorni 11 e 12 dicembre 2008. Tale corso è in fase di registrazione ECM e prevede la partecipazione di 100 medici, 50 biologi e 50 infermieri.

Nell'ambito del WP3, con il concorso di tutte le UO coinvolte, si è dato inizio allo sviluppo e alla standardizzazione di protocolli per le varie metodiche di monitoraggio (Elispot, colorazione con HLA-tetrameri, mobilizzazione CD107a, ecc.) mediante una verifica comparativa di diversi metodi di indagine che verranno a breve resi disponibili all'interno del sito NIBIT. Le due unità coordinatrici della rete hanno organizzato il 1° Workshop NIBIT/ACC che ha visto la partecipazione di numerosi gruppi di ricerca. Nell'ambito del workshop si è proceduto alla definizione di linee guida per il monitoraggio immunologico e sono state concordati dalle unità di INT/Milano e di Roma alcuni protocolli unificati, allo scopo di trasferire le competenze tecnico-scientifiche nei diversi campi di studio sia ai diversi centri del Network che a laboratori esterni interessati.

Inoltre sono state generate librerie fagiche di anticorpi a singolo dominio VHH per identificare anticorpi tumore specifici per screening precoce di malattia. Si è valutata la risposta spontanea di linfociti T CD4+ verso antigeni tumorali (proteine trasformanti E6 ed E7 di virus del papilloma umano, l'antigene tumorale MAGE-A3 e il CEA) rispettivamente in pazienti con lesioni della cervice uterina ad alto grado, con melanoma avanzato e con carcinoma del pancreas. I risultati hanno dimostrato che, nelle lesioni della cervice uterina, la quantità di IFN- $\gamma$  prodotto è in grado di predire l'andamento clinico dopo trattamento chirurgico. Nel melanoma la risposta CD4+ verso MAGE-A3 è presente in un'alta percentuale di pazienti e le citochine prodotte sono sia di tipo Th1 che Th2. Nel carcinoma del pancreas la percentuale di linfociti T CD4+ specifici per CEA è inferiore a quella dei donatori normali e la polarizzazione è deviata verso Th2. È stata ulteriormente sviluppata la banca biologica dell'Unità che comprende sieri e plasmi, prelevati prima del trattamento e a varie fasi della terapia, di pazienti affetti da neoplasie inseriti in sperimentazioni cliniche di immunoterapia. È stata programmata la messa a punto della tecnologia dei protoarray che permette di valutare contestualmente la presenza qualitativa e quantitativa di anticorpi circolanti diretti contro circa 8000 proteine umane.

Gli obiettivi relativi al WP 4 sono stati affrontati con la preparazione di un sito web, collegato al sito dell'Autorità Competente nazionale per l'autorizzazione alla sperimentazione di fase I, già esistente nel Dipartimento del Farmaco dell'Istituto Superiore di Sanità. Il modello ha previsto uno strumento guida per il Navigatore e documenti di dettaglio per allinearsi alle richieste normative attuali per la conduzione di una sperimentazione clinica FIM (*First in Man*). La presentazione di questo strumento informatico verrà effettuata durante i corsi di cui al WP2 che saranno tenuti a Napoli, Siena o Roma e Bari. Durante il primo anno è stata, inoltre, formulata per tutti i partecipanti al progetto, una nota informativa sull'applicazione dell'articolo 15 del DL.vo 200/2007 relativo alla formulazione di farmaci sperimentali presso le farmacie ospedaliere.

Nel primo anno di attivazione dei progetti afferenti al WP5, sono stati organizzati, in collaborazione tra ISS e AIFA, tre corsi di formazione destinati prioritariamente agli operatori degli IRCCS, dal titolo "Fabbricazione e caratterizzazione dei medicinali sperimentali per terapie avanzate". Tali corsi sono stati effettuati presso l'ISS dal 4 al 5 febbraio 2008, dal 10 al 11 marzo 2008, dal 3 al 4 luglio 2008 e sono stati accreditati per ECM dal Ministero della Salute. Il programma ha coperto sia aspetti regolatori sia tecnico-scientifici.

Per organizzare e facilitare l'accesso dei pazienti all'utilizzo dei prodotti medicinali basati su cellule CBMP) bisognava procedere ad una ricognizione delle strutture attive o potenzialmente attivabili in Italia. A tal scopo l'ISS, in collaborazione con NIBIT, ha diffuso un questionario

per il censimento di tali strutture. La distribuzione delle 17 strutture mostra una differenza fra le differenti aree geografiche, con 13 strutture al nord, 3 in centro e una sola nel sud.

È stato preparato un sito web in collaborazione tra AIFA e CNT per sostenere le attività del network tra laboratori GMP ([http://www.terapiecellulari.it/index.php?option=com\\_content&task=view&id=214&Itemid=381](http://www.terapiecellulari.it/index.php?option=com_content&task=view&id=214&Itemid=381)).

È stata ultimata la preparazione di un manuale di istruzioni per l'applicazione all'autorizzazione delle fasi I.

È stato predisposto il protocollo di convalida del metodo di individuazione di contaminazione da micoplasma mediante PCR, che prevede l'uso di un pool di 9 *primer* capaci di riconoscere oltre 25 specie di micoplasma, tra cui le cinque responsabili di oltre il 95% delle contaminazioni di colture cellulari.

In Italia il Ministero della Salute ha pubblicato Circolari sulle "Raccomandazioni per la sicurezza del trasporto di materiali infettivi e di campioni diagnostici". A livello europeo il trasporto di merci pericolose è regolamentato dalla normativa ADR, secondo cui per la spedizione di materie infettanti si deve utilizzare un triplo imballaggio formato da imballo esterno, un secondario e da contenitori primari. Si sono inoltre analizzate le procedure doganali di esportazione.

Sono stati elaborati i risultati di due studi relativi alla valutazione della suscettibilità alla trasformazione neoplastica delle cellule staminali mesenchimali umane da midollo osseo (MO-MSC), propagate *in vitro*. Le MO-MSC sono state testate per l'espressione di Attività Telomerasica (AT), dei trascritti di hTERT e dei meccanismi alternativi di allungamento dei telomeri (ALT). Tra i diversi donatori è stata osservata variabilità della capacità proliferativa e durata dell'espansione *in vitro*. È stata eseguita la valutazione della predisposizione alla trasformazione neoplastica di: 1) MO-MSC, ottenute da pazienti affetti da malattia di Crohn e propagate *in vitro* con LP; 2) MSC derivate da due diverse unità di sangue di cordone ombelicale e propagate *in vitro* con LP. I risultati ottenuti non hanno evidenziato predisposizione alla trasformazione neoplastica.

Sono stati condotti studi preliminari per verificare l'assenza di cellule proliferanti in campioni di cellule apoptotiche e lisati tumorali. I dati ottenuti hanno mostrato assenza di proliferazione nelle colture allestite con le cellule irradiate.

## **Publicazioni conseguite nell'ambito del progetto**

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Maio M, Nicolay HJM, Ascierio P, Belardelli F, Camerini R, Colombo MP, Queirolo P, Ridolfi R, Russo V, Anzalone L, Fonsatti E, Parmiani G. The Italian Network for Tumor Biotherapy (NIBIT): getting together to push the field forward. *Journal of Translational Medicine* 2008;6:8.
2. Tassi E, Gavazzi F, Albarello L, Senyukov V, Longhi R, Dellabona P, Doglioni C, Braga M, Di Carlo V, Protti MP. Carcinoembryonic antigen-specific but not antiviral CD4+ T cell immunity is impaired in pancreatic carcinoma patients. *J Immunology* 2008;181:6595-6603.

## **Articolazione del progetto**

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1:

**Tabella 1. Articolazione della Rete nazionale per studi clinici e di strutture GMP per le bioterapie dei tumori**

<b>Proponente</b> <i>(Coordinatori della rete)</i>	<b>Ente di appartenenza dell'UO</b>	<b>Responsabile scientifico delle UO</b>
ISS ( <i>Enrico Proietti</i> ) HSR ( <i>Giorgio Parmiani</i> )	Azienda Ospedaliera Universitaria Senese	Michele Maio
	ISS	Maria Ferrantini
	HSR	Giorgio Parmiani
	AIFA	Cristina Pintus
	INT	Licia Rivoltini
	IRE	Paola Nisticò
	IEO	Maria Rescigno
	ISS	Enrico Proietti
	HSR	Maria Pia Protti
	CRO	Michele Maio
	ISS	Annarita Meneguz
	Pascale	Paolo Ascierto
	ISS	Giovanni Migliaccio
	ISS	Maria Cristina Galli
	IRST	Ruggero Ridolfi
	ISTGE	Barbara Parodi
	Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena	Paolo Rebutta
	San Matteo	Rita Maccario
ISS	Carmen Rozera	

## RETE NAZIONALE “PROGETTO START”: STATO DELL’ARTE IN ONCOLOGIA

Lisa Licitra (a), Ruggero De Maria (b)

(a) *Struttura semplice Trattamento medico dei tumori della testa e del collo – Oncologia medica 3, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano*

(b) *Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### Base di partenza e razionale

START, acronimo di “STate of the ART oncology in Europe”, è un programma di Alleanza Contro il Cancro per la definizione, diffusione e aggiornamento dello stato dell’arte del trattamento oncologico in una prospettiva europea.

START è prodotto in collaborazione con i maggiori esperti europei. Esso nacque alcuni anni fa e si sviluppò nell’ambito della *European School of Oncology*. Il prodotto finale conterà di altrettanti capitoli quanti sono i tumori maligni. Un primo gruppo di capitoli è già disponibile in linea. Questi capitoli sono peraltro da aggiornare sistematicamente, il completamento dell’opera si pone in una prospettiva a lungo termine, ma i capitoli progressivamente posti in linea corrispondono a requisiti di qualità tali da renderli immediatamente utilizzabili.

START è destinato agli specialisti italiani ed europei che operano in campo oncologico, per i quali intende rappresentare un supporto nella prassi oncologica quotidiana.

Formalmente, START è un database contenente un capitolo per ogni neoplasia maligna, oltre a tematiche correlate al trattamento oncologico. I capitoli di START sono liberamente accessibili su Internet, all’indirizzo <http://www.startoncology.net>. Ogni capitolo costituisce un ipertesto, corredato dei link alla Metodologia originale di START, alle referenze bibliografiche con collegamento diretto a PubMed, e da un capitolo all’altro.

Oltre ad essere pubblicato online, ciascun capitolo è anche pubblicato sulla rivista scientifica *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, previa peer-review da parte della rivista stessa.

Fondamentalmente, START è uno strumento “basato sull’evidenza”, cioè formulato in modo da esplicitare la qualità dell’evidenza a supporto delle raccomandazioni cliniche più significative. Viene usata per questo una scala originale in cinque gradazioni. Le raccomandazioni vengono poi formulate in modo da differenziare fra ciò che è propriamente convenzionale, ciò che è sperimentale e ciò che, pur non essendo convenzionale, si ritiene possa essere proposto al singolo paziente nell’ambito di una decisione clinica condivisa in condizioni di incertezza. Questa metodologia sembra apprezzata in particolare dal clinico, essendo nata in ambiente clinico, forse contribuendo a superare la distanza che ancor oggi separa la medicina basata sull’evidenza dalla pratica clinica quotidiana. Naturalmente START è aperto a sviluppi metodologici, sensibili all’evoluzione della stessa medicina basata sull’evidenza.

Più recentemente, è stata avviata la traduzione italiana dei capitoli disponibili nel sito. Inoltre, è stata creata una sezione denominata “Area Pubblica” che contiene sezioni informative rivolte a pazienti, a loro familiari/amici e, più in generale, a tutti coloro che desiderino approfondire le singole neoplasie e altre tematiche oncologiche da “non addetti ai lavori”. Tali sezioni sono basate sui capitoli originali di START, rielaborate anche in collaborazione con un’Agenzia giornalistica specializzata nella divulgazione di tematiche oncologiche.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

START è proposto come uno strumento per la definizione e diffusione dello stato dell'arte, quale percepito dalla comunità oncologica europea. Quando ultimato, esso conterà di altrettanti capitoli quanti sono i tumori maligni. È uno strumento "basato sull'evidenza", destinato agli specialisti che operano in campo oncologico, per i quali intende rappresentare un supporto nella pratica clinica quotidiana.

Parallelamente alla realizzazione e all'aggiornamento dei capitoli destinati agli specialisti del campo oncologico, vengono realizzate anche delle sezioni informative, basate sulle informazioni "evidence-based" degli stessi capitoli, destinate principalmente ai pazienti e, più in generale, a tutti coloro che, pur non essendo specialisti, desiderano approfondire tematiche correlate alle neoplasie oncologiche.

START dovrebbe essere inteso come un servizio reso da Alleanza Contro il Cancro al Sistema Sanitario Nazionale, proprio in quanto si tratta di uno stato dell'arte della diagnosi e del trattamento oncologico già filtrato attraverso un consenso europeo. In questo senso, START non corrisponde a delle linee guida per la pratica clinica, ma si pone immediatamente prima di queste ultime. In pratica, sulla base di START potranno essere prodotte linee guida per la pratica clinica rivolte specificamente alla comunità medica italiana e, quindi, a quella europea.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Nel corso dei primi 12 mesi di contratto, l'attività redazionale di START si è articolata in:

- produzione di nuovi capitoli;
- aggiornamento dei capitoli già disponibili online;
- traduzione italiana dei capitoli redatti in lingua inglese;
- adattamento dei capitoli, in lingua italiana, per il pubblico.

Come previsto, l'UO1 (INT), capofila del Progetto, ha provveduto a coordinare le attività di tutti i *Contributor* coinvolti nell'attività di realizzazione e aggiornamento dei capitoli, compresi quelli affidati alle restanti 8 UO.

La Tabella 1 riporta un riassunto delle suddette attività, suddivise per UO.

Per quanto concerne il sito di START, dal 1° gennaio 2008 ad oggi si sono registrati 601.337 accessi.

Riguardo ai questionari online, attivati nel corso del 2004, con i quali gli utenti dell'Area Pubblica possono segnalare il grado di utilità delle informazioni ricevute, ad oggi sono stati compilati oltre 2.500 questionari: il 73% circa giudica le informazioni trovate sul sito molto utili; il 24 % le ritiene utili; il 2% inutili e l'1% non sa rispondere.

Al fine di aumentare la visibilità del sito START, abbiamo chiesto al gestore del sito di provvedere alla registrazione ai principali motori di ricerca completata, come previsto, per metà aprile 2008, utilizzando un elenco di parole chiave. Inoltre, abbiamo chiesto al gestore del sito di elaborare una nuova piattaforma più dinamica e agevole sia per la navigazione dell'utente sia per la gestione del *backhand*, attraverso cui la segreteria redazionale inserisce i contenuti del sito online. La nuova piattaforma permetterà, inoltre, ai fruitori del sito di registrarsi, in modo da poter ricevere notizia sugli aggiornamenti e, allo stesso tempo, rendendo più trasparente la gestione delle statistiche di accesso; e sarà implementata entro i prossimi tre mesi. Come previsto, tutti i capitoli nuovi e quelli aggiornati sono stati inviati a Elsevier, uno dei maggiori gruppi editoriali in campo scientifico, per essere pubblicati su "Critical Reviews in Oncology and Hematology".



Tabella 1. Articolazione della Rete nazionale “Progetto START”

Unità Operativa (Responsabile)	Area professionale		Area pubblica
	Capitoli in lingua inglese (nuovi – <b>aggiornati</b> )	Capitoli in lingua italiana (nuovi – <b>aggiornati</b> )	Sezioni Informative (nuove – <b>aggiornate</b> )
UO1 INT (Lisa Licitra)	Cholangiocarcinoma Pain Therapy  <i>Antiemetic Therapy</i> AML* Anus Esophagus* Histiocytosis Kidney* Liver* Multiple Myeloma* Pancreas NSCLC* Penis Salivary glands SCLC Unknown primary	Colangiocarcinoma Ghiandole salivari Microcitoma Terapia del dolore  Ano Terapia antiemetica Istiocitosi Microcitoma* Pancreas Pene Sede primitiva ignota	Colangiocarcinoma Microcitoma Pene  <i>Terapia antiemetica</i> Ghiandole salivari Pancreas
UO2 ISS (Ruggero De Maria)	Thyroid		
UO3 CRO (Umberto Tirelli)	AIDS-related tumours (Kaposi sa; NHL)		
UO4 ISTGE (Paolo Pronzato)	Hypopharynx Oral cavity		
UO5 IEO (Filippo De Braud)	<i>Bladder*</i> Colon Melanoma Prostate* Rectus Stomach	Colon Melanoma Retto Stomaco	Colon Melanoma Retto Stomaco
UO6 HSR (Andres Ferreri, Michele Reni)	<i>Lymphomas</i> (AILT, CTCL, FL, WM, MZL, PCNSL, PGL, PMLBCL, PTL) <i>Brain tumours</i> (astrocytoma, ependymoma, GBM, low-grade astrocytoma*, medulloblastoma, meningioma, oligodendroglioma)	<i>Tumori cerebrali</i> (astrocitoma; ependymoma; GBM; oligodendroglioma)	
UO7 IOR (Piero Picci, Stefano Ferrari)	Rare bone tumours Osteosarcoma Ewing's sarcoma		
UO8 IDI (Giandomenico Russo)	Cutaneous T cell lymphoma		

\* Capitoli di prossima pubblicazione, non ancora disponibili online

## Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C. Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;67:139-52.
2. Iannitto E, Ferreri AJ, Minardi V, Tripodo C, Kreipe HH. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;68(3):264-71.
3. Marosi C, Hassler M, Roessler K, Reni M, Sant M, Mazza E, et al. Meningioma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;67:153-71.
4. Martelli M, Ferreri AJ, Johnson P. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;68(3):256-63.
5. Mosconi S, Beretta GD, Labianca R, Zampino MG, Gatta G, Heinemann V. Cholangiocarcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008 Oct 31. [Epub ahead of print]
6. Pavlidis N, Fizazi K. Carcinoma of unknown primary (CUP). *Crit Rev Oncol Hematol* 2008 Oct 31. [Epub ahead of print]
7. Van den Bent MJ, Reni M, Gatta G, Vecht C. Oligodendroglioma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:262-72.
8. Vitolo U, Ferreri AJ, Montoto S. Follicular lymphomas. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:248-61.
9. Vitolo U, Ferreri AJ, Zucca E. Primary testicular lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;65:183-9.
10. Vitolo U, Ferreri AJ, Montoto S. Lymphoplasmacytic lymphoma-Waldenstrom's macroglobulinemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;67:172-85.
11. Zampino MG, Labianca R, Beretta GD, Magni E, Gatta G, Leonardi MC, Chiappa A, Biffi R, de Braud F, Wils J. Rectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008 Dec 5. [Epub ahead of print].
12. Zinzani PL, Ferreri AJ, Cerroni L. Mycosis fungoides. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;65:172-82.

# RETE NAZIONALE DEI REGISTRI TUMORI: INDICATORI E CONTROLLO DEL CANCRO IN ITALIA

Riccardo Capocaccia (a), Marina Vercelli (b), Eugenio Paci (c), Piero Picci (d)

(a) *Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Struttura semplice Epidemiologia Descrittiva, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova*

(c) *Associazione Italiana Registri Tumori*

(d) *Dipartimento di Oncologia Muscoloscheletrica, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna*

## Base di partenza e razionale

I registri tumori sono sorti e si sono diffusi con l'obiettivo principale di raccogliere dati di incidenza e sopravvivenza su base di popolazione e di produrre pertanto gli indicatori epidemiologici di base sulla frequenza (mortalità, incidenza e prevalenza) e l'outcome (sopravvivenza) dei tumori. I registri tumori garantiscono inoltre la diffusione dei dati raccolti e analizzati. Questi indicatori sono indispensabili per valutare l'impatto degli interventi di prevenzione primaria e secondaria, e per la sorveglianza oncologica della popolazione.

I risultati prodotti hanno evidenziato ampie e inattese differenze in termini di outcome, sia a livello nazionale che internazionale. Per interpretare queste differenze sono stati intrapresi studi di "alta risoluzione" che prevedono la raccolta di dati clinici, non rilevati di routine dai registri. Questi studi, al momento limitati a un paio di tumori, si basano però su piccoli campioni e fanno inoltre riferimento a casi diagnosticati nel corso degli anni '90. Pertanto, si presenta l'esigenza di incrementare le informazioni raccolte sistematicamente dai registri includendo dati più dettagliati sul percorso diagnostico terapeutico del paziente oncologico (in particolare su stadio, esami diagnostici, interventi chirurgici, protocolli chemio-radioterapici, ecc.). Questo tipo di informazioni, di interesse strategico per gli IRCCS oncologici, per le reti oncologiche regionali e per il Servizio Sanitario Nazionale (SSN), deve essere ora reso più diffusamente disponibile, standardizzato, e finalmente integrato nell'utilizzo per la valutazione comparativa e le attività di controllo della patologia oncologica negli ambiti regionali e sul territorio nazionale.

Nel nostro Paese la diffusione sul territorio dei registri tumori è sbilanciata verso il nord e il centro, nonostante gli sforzi fatti negli ultimi anni e i nuovi registri sorti al sud. Per questa ragione assume grande rilievo per la sanità pubblica la possibilità di stimare l'incidenza, la sopravvivenza e altri indici epidemiologici sia a livello nazionale che sistematicamente nelle regioni italiane, in particolare nelle regioni del sud del Paese. Tali informazioni sono richieste anche da medici, mezzi di informazione, associazioni di pazienti e pubblico generale. Vanno quindi potenziati i mezzi di diffusione e disseminazione di dati epidemiologici affidabili, particolarmente in rete web.

Il cancro è una malattia largamente socio-economicamente determinata, sia nei determinanti dell'eziologia, sia nei determinanti della presa in carico diagnostico-terapeutica e del risultato in termini prognostici. L'influenza dei fattori socio-economici sul "burden" complessivo della patologia e soprattutto sul risultato in termini di sopravvivenza, già analizzato in diversi studi internazionali, sia a livello macro che a livello individuale, deve essere indagato in una valutazione complessiva condotta a livello nazionale.

Infine, l'importanza potenziale dei dati dei registri comporta la necessità che nei prossimi anni la rete dei registri tumori si evolva in modo sempre più integrato con l'SSN e con la rete

degli Istituti oncologici. Questi ultimi in particolare conducono frequentemente al loro interno raccolte di dati clinici di alta qualità che sono talora sotto-utilizzati in valutazioni di sanità pubblica in mancanza di una precisa popolazione di riferimento. Il collegamento tra registri clinici e registri tumori di popolazione permetterebbe di integrare tali banche dati in un quadro complessivo e in modo metodologicamente corretto.

Tutte queste tematiche richiedono un'attività fortemente integrata tra registri, Istituti oncologici, e gruppi di ricerca coinvolti. La struttura operativa del progetto deve garantire quindi il massimo livello di standardizzazione dei protocolli e di coordinamento delle attività di ricerca e di diffusione dei risultati.

## **Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto**

L'obiettivo generale del progetto è quello di estendere la disponibilità e l'uso dei dati dei Registri Tumori (RT) per la valutazione delle attività dell'SSN sul versante diagnostico-terapeutico, dal punto di vista sia dell'efficacia che dell'equità del servizio offerto ai pazienti oncologici. Tale obiettivo può essere suddiviso in sei punti principali:

- Rafforzamento dell'integrazione dei diversi registri tumori italiani attraverso l'implementazione di un database nazionale dei dati di incidenza e sopravvivenza su base di popolazione.
- Potenziamento dei dati dei registri tumori attinenti alla diagnosi (procedure diagnostiche, classificazioni biologiche EBM, stadiazione), al trattamento e al follow-up clinico (recidive, sequelae).
- Standardizzazione dell'uso delle fonti informative di base (SDO, referti informatizzati di Anatomia patologica, fonti anagrafiche informatizzate, registri di mortalità, altri data-base regionali utili).
- Stima degli indicatori utili a promuovere attività di controllo della patologia oncologica. Proiezione a livello nazionale degli indicatori epidemiologici prodotti dai registri tumori. Stima degli indicatori oncologici su base di popolazione richiesti dalla Commissione Europea. Diffusione degli indicatori attraverso strumenti informativi indirizzati a livello nazionale alla popolazione generale.
- Valutazione dell'ampiezza delle disuguaglianze nella diagnosi e nella cura del cancro a livello territoriale, di gruppi sociali, di fasce di età; individuazione dei determinanti e sorveglianza degli andamenti temporali.
- Integrazione dei registri degli istituti oncologici con i dati dei registri tumori per costruire la base informativa delle reti oncologiche regionali e nazionale.

Il progetto sarà focalizzato soprattutto su sedi tumorali di interesse prioritario (stomaco, mammella, colon-retto, polmone, prostata, melanomi, linfomi, cervice), non trascurando però le altre patologie più rare (HCC, sarcomi).

## **Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati**

Il primo anno di sviluppo del progetto ha comportato un'intensa attività di coordinamento espletata attraverso molte riunioni sia generali che specifiche di Unità Operativa. La fase operativa è comunque ampiamente iniziata in tutte le Unità Operative partecipanti al progetto.

Un protocollo operativo per lo sviluppo presso l'ISS di una banca dati centralizzata dei registri tumori italiani (UO1) è stato messo a punto con una serie di incontri tecnici con i responsabili della banca dati dell'Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM). Sono state quindi implementate le procedure di comunicazione per l'immissione e lo scambio di dati tra banca centrale e singoli registri, e le procedure per il controllo l'analisi della qualità dei dati. Il sistema sarà sperimentato entro il 2008 e diventerà operativo entro i primi mesi del 2009.

L'attività volta ad estendere le rilevazioni dei registri tumori alle più importanti variabili relative a diagnosi e trattamento (UO2) è stata realizzata attraverso workshop dedicati e multidisciplinari. Ad ogni Registro Tumori (RT) accreditato presso l'AIRTUM è stato inoltrato l'invito a partecipare al progetto e alle riunioni nell'ambito dello stesso. Sono state così concordate: la definizione delle sedi tumorali di interesse prioritario da indagare (mammella, polmone, colon, retto, melanoma e linfomi), le informazioni da raccogliere, le fonti informative da utilizzare, i sistemi di codifica e di archiviazione dei dati e le modalità di analisi. Per ogni neoplasia è stato definito un opportuno gruppo di lavoro e predisposto un tracciato record. È stato predisposto uno studio pilota per ogni sede, inviando agli RT aderenti al progetto un campione della casistica della dimensione massima di 50 casi e un opportuno software di raccolta e validazione. La partecipazione allo studio pilota è stata definita come obbligatoria per tutti gli RT aderenti al progetto. La fase di raccolta dati per lo studio pilota si è conclusa per i tumori della mammella e del colon-retto, per cui è in corso il lavoro di analisi e valutazione delle informazioni ottenute. Per le altre sedi, lo studio pilota si concluderà entro dicembre 2008.

L'elaborazione di stime su base nazionale e regionale dei principali indicatori epidemiologici (incidenza, prevalenza e mortalità) per i tumori più frequenti e per tutti i tumori maligni considerati insieme (UO3) è attualmente in corso, dopo una fase preliminare di coordinamento e pianificazione con i ricercatori dei registri tumori e delle altre strutture interessate. È stato costituito un gruppo di lavoro con l'obiettivo di partecipare all'analisi, alla validazione delle stime e alla disseminazione delle informazioni. Sono state organizzate diverse riunioni del gruppo, in cui è stato discusso il piano di lavoro dell'Unità di stime, che prevede l'aggiornamento delle stime di incidenza e prevalenza per le più importanti sedi tumorali (stomaco, colon-retto, mammella, prostata, polmone e melanoma) e tutti i tumori maligni. Tra questi tumori, il melanoma rappresenta una neoplasia mai affrontata con i modelli di stima che si prevede di utilizzare. È stata sollecitata l'inclusione di nuove sedi tumorali, oltre al melanoma, quali la cervice uterina e i tumori di testa collo e si rendono disponibili per questo alcuni ricercatori. Sono stati presentati e discussi i possibili scenari sull'andamento del rischio di ammalarsi per i tumori in studio. Le analisi sono state avviate con l'acquisizione dei file di mortalità da parte dell'ISTAT e la loro predisposizione per l'analisi. La stima della sopravvivenza è un passo preliminare necessario per l'applicazione del metodo, che ha richiesto la scelta del modello appropriato per ciascuna regione. Infine per le stime di incidenza e prevalenza si è resa necessaria l'identificazione del modello più appropriato che stabilisce la relazione tra mortalità, sopravvivenza e incidenza. A tutt'oggi sono terminate le stime dei tumori dello stomaco e del polmone, e sono in corso le elaborazioni per i tumori coloretali.

Il gruppo di lavoro su fattori socio-economici e indici epidemiologici (UO4) ha in primo luogo realizzato un coordinamento con il gruppo di lavoro di G Costa e collaboratori, che conduce un progetto simile ma non specifico della patologia oncologica promosso dal CCM, e con l'ISTAT, sulle tecniche di recupero della Sezione di Censimento (SC) a partire dagli indirizzi dei pazienti. È stata stimata attraverso modelli di regressione lineare la sopravvivenza per tumore a livello regionale a partire da indicatori relativi a fattori sociali, economici e caratteristiche dei sistemi sanitari nazionali. La corrispondenza fra sopravvivenze osservate e stimate in regioni coperte da registrazione dei tumori è risultata impressionante, ma pure interessante appare il risultato della sopravvivenza predetta nelle regioni di cui non si possiede

alcun dato, dove le stime appaiono coerenti con quanto si conosce delle condizioni macroeconomiche e delle risorse sanitarie e del tutto in linea con regioni a caratteristiche simili. Il gruppo di lavoro ha discusso (9-11 aprile 2008) il modello organizzativo di scelta e recupero delle variabili utili allo studio delle diseguaglianze. Ciascun RT deciderà quali indicatori implementare nel proprio database a livello di SC o di medie comunali. La procedura di raccolta delle nuove variabili funzionali alla geocodifica dovrà fare parte dell'estensione e consolidamento delle attività dei Registri. È stata organizzata una sessione del corso AIRTUM "Lo studio dei dati socio-economici: metodologia, definizione degli indici e interpretazione" (moderatori Vercelli-Capocaccia). La rassegna bibliografica prevista nel progetto è terminata (Dott. A. Quaglia, IST Genova). Dato lo sviluppo molto ampio che ha assunto, tale lavoro potrebbe essere destinato a essere strumento di lavoro per il gruppo, fornendo le necessarie informazioni bibliografiche e di critica scientifica, nonché costituire la bozza di una prima pubblicazione nell'ambito del progetto.

L'obiettivo dell'UO5 è quello di creare un linkage tra registri tumori di popolazione, di patologia, e registri degli IRCCS oncologici rafforzando il coordinamento tra le istituzioni che in Italia si occupano di patologia neoplastica. Sono stati definiti, a partire dal database AIRTUM, i protocolli di raccolta dati per il tumore del polmone, della mammella, del colon retto, del melanoma, e dei tumori emopoietici. In seguito all'ultima riunione del 4/11/2008 presso l'ISPO di Firenze, si sono condivisi i primi tre protocolli e si è deciso di fare una estrazione casuale di 50 casi da ogni archivio di patologia per sperimentarne l'effettiva possibilità di utilizzazione ed esplicitare le criticità.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione della Rete nazionale dei registri tumori: indicatori e controllo del cancro in Italia**

<b>Proponente</b> <i>(Coordinatori della rete)</i>	<b>Ente di appartenenza dell'UO</b>	<b>Responsabile scientifico delle UO</b>
ISS ( <i>Riccardo Capocaccia</i> )	ISS	Riccardo Capocaccia
ISTGE ( <i>Marina Vercelli</i> )	AIRTUM	Massimo Federico
AIRTUM ( <i>Eugenio Paci</i> )	INT	Gemma Gatta
IOR ( <i>Piero Picci</i> )	ISTGE, Registro Tumori Regione Liguria	Marina Vercelli
	IRST	Fabio Falcini

## RETE NAZIONALE SU MODELLI SPERIMENTALI E “FACILITIES” ANIMALI

Gennaro Citro (a), Stefano Fais (b)

(a) *Stabilimento Allevatore Fornitore Utilizzatore, Istituto Regina Elena, Roma*

(b) *Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### Base di partenza e razionale

Il panorama italiano è spesso caratterizzato dalla frammentazione delle attività di gruppi dedicati alla ricerca preclinica che utilizzano modelli sia *in vitro* che *in vivo*, per testare la efficacia di nuove strategie terapeutiche anti-tumorali. La dispersione di tali energie ha spesso prodotto cadute di competitività, soprattutto al livello internazionale. Ciò è particolarmente vero per i modelli animali. La sperimentazione pre-clinica in ambito oncologico si avvale di diversi modelli *in vivo* basati per lo più sull'uso di topi. I tre principali gruppi sono basati sull'uso di:

- modelli singenici in cui si segue la crescita di tumori spontanei nei topi di vari ceppi;
- modelli di topi singenici transgenici o *knock-out* per determinati geni e proteine coinvolti nella tumori genesi;
- modelli xenochimerici nei quali cellule di tumore umano vengono inoculate in tipo immunodeficienti (SCID o Nude) dove crescono sottoforma di tumore solido.

Non può però essere trascurato il fatto che tra i modelli sperimentali utilizzati nella ricerca traslazionale sono comprese anche linee cellulari derivate da pazienti con tumore, spesso comparate a cellule derivanti da tessuti normali. È però ormai consolidata la consapevolezza che i modelli *in vitro* hanno più un valore accademico che reale. Le linee cellulari più diffusamente usate hanno spesso caratteristiche istologiche non precise e comunque diverse rispetto alle cellule di origine e lontane dalle caratteristiche del tumore *in vivo*. Un approccio originale e importante in questo ambito potrebbe essere quello di collezionare cellule tumorali ottenute da tumori umani fatti crescere in topi immunodeficienti, caratterizzarle e conservarle per poi utilizzarle come modello pre-clinico.

Un centro di sperimentazione pre-clinica in oncologia dovrebbe contenere almeno questi modelli per essere competitivo. A ciò si possono aggiungere i primati non umani, ormai considerati di unico riferimento per la sperimentazione pre-clinica di farmaci biotecnologici. Sul territorio nazionale i centri di questo tipo sono a tutt'oggi veramente pochi. Risulta di vitale importanza quindi definire e consolidare una rete scientifica e tecnologica nazionale proiettata a livello internazionale e orientata alla ricerca traslazionale in oncologia. Si rende necessaria a tale scopo una ricognizione delle facilities per la sperimentazione preclinica in oncologia presenti sul territorio nazionale, in modo di consentire una ri-organizzazione funzionale e strategica di tali strutture.

### Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Per riassumere gli obiettivi principali di questa rete saranno:

- creare una nuova generazione di tecnici e ricercatori in grado di assicurare affidabilità e continuità alle attività svolte dai centri presenti nella rete, attraverso corsi annuali di

formazione teorico-pratica. Insieme ai corsi di formazione sarà favorita l'aggregazione di giovani ricercatori fra i centri coinvolti nella rete e fra ricercatori interessati alla sperimentazione pre-clinica su tutto il territorio nazionale;

- migliorare e rinnovare i modelli pre-clinici sia *in vitro* che *in vivo*, allo scopo di ottenere modelli che siano quanto più possibile vicini ai tumori presenti nei pazienti;
- stabilire il livello di adeguatezza dei modelli nell'ambito dell'utilizzo pre-clinico, e i costi-benefici dell'utilizzo dei vari modelli;
- attivare connessioni strategiche operative con il mondo dell'industria biomedica in modo da affrontare e possibilmente risolvere le problematiche più attuali e di maggior rilievo;
- prevedere l'uso, lo sviluppo e la diffusione di nuove strumentazioni biomediche sempre più all'avanguardia e la condivisione delle stesse;
- prevedere la costituzione di *spin-off company* la cui *mission* sia di mettere a disposizione servizi di sperimentazione pre-clinica in ambito oncologico per istituzioni pubbliche e private.

## **Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati**

Nel corso del primo anno di attività ci siamo focalizzati nell'allestire una sezione ([www.iss.it/onet](http://www.iss.it/onet)) nell'ambito del sito web di ACC al duplice scopo di mettere a disposizione di chiunque informazione sulle attività della rete e di rendere snella qualsiasi procedura di comunicazione tra le Unità Operative che hanno aderito alla costituzione della rete. La sezione dedicata alle comunicazioni fra i componenti della rete è protetta ed è ancora nello stato di *work in progress*, in quanto le tabelle prodotte sono state discusse durante l'ultima riunione in ISS e saranno definitivamente modificate e rese operative entro la fine dell'anno.

È importante sottolineare come tale strumento darà la possibilità ad altri gruppi di conoscere e possibilmente aderire alla rete, come già è successo lo scorso anno. Il sito è stato strutturato con l'aiuto del personale informatico dell'ISS; nella pagina web sono rappresentate diverse sezioni tra cui un archivio, in continuo aggiornamento, dove è possibile venire a conoscenza di:

- tutti i modelli sperimentali disponibili, sia cellulari che animali, presenti nelle strutture della rete e quindi sul territorio nazionale;
- tutte le *facility* disponibili nell'ambito della sperimentazione pre-clinica in ambito oncologico, l'ubicazione delle stesse, con i nomi dei ricercatori responsabili a cui far riferimento.

Il lavoro di archiviazione ha reso possibile realizzare come, in effetti, in Italia esista un livello di competenza nel campo dei modelli pre-clinica in oncologia, per alcuni versi, sovrapponibile, ma in realtà estremamente varia e, quel che più conta, competitiva, tanto da coprire la gran parte dei modelli le sperimentazioni sia *in vitro* che *in vivo*. Nell'anno che è trascorso sono stati organizzati presso l'ISS due incontri fra i componenti la rete. Durante tali incontri i coordinatori hanno invitato i componenti a presentare le loro strutture, i modelli maggiormente in uso e i progetti nei quali i singoli responsabili delle strutture sono già coinvolti. Durante queste riunioni si è anche tentato di identificare progetti di ricerca che potessero coagulare interessi comuni in modo da lanciare questa rete come strumento importante per ideare e proporre progetti di ricerca basati su idee innovative o per alcuni versi neglette.

Fra le iniziative lanciate durante queste riunioni vi è stata quella di organizzare corsi di formazione per ricercatori e tecnici sulla gestione di modelli pre-clinici in oncologia. A tale



proposito il Dott. Cilli dell'ISTGE sta organizzando un corso di aggiornamento sull'argomento che si svolgerà tra la fine del 2008 e i primi mesi del 2009, al quale parteciperanno come docenti anche alcuni dei responsabili delle unità operative che costituiscono la rete.

La verifica fatta sulle relazioni ricevute dalle varie unità operative ha confermato la validità e l'importanza della rete sui modelli pre-clinici in oncologia. Si evince, infatti, l'estrema validità dei progetti di ricerca nei quali sono coinvolti i responsabili delle unità, ma anche la estrema varietà e nel complesso la possibilità di implementare nella rete un gran numero di modelli pre-clinici. Ciò assicura una veramente alta competitività di questa rete come strumento, che può essere migliorato, ma che già da ora offre molte possibilità a chi, o all'interno di progetti, nazionali od internazionali, od al livello di singole necessità abbia necessità di integrare la propria attività di ricerca e sviluppo di nuove strategie anti-tumorali con l'uso di un modello pre-clinico.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione della Rete nazionale sui modelli sperimentali e "facilities" animali**

<b>Proponente</b> <i>(Coordinatori della rete)</i>	<b>Ente di appartenenza dell'UO</b>	<b>Responsabile scientifico delle UO</b>
IRE (Gennaro Citro) ISS (Stefano Fais)	Humanitas	Alberto Mantovani
	IEO	Giuseppina Bonizzi
	IOR	Lorena Landuzzi
	ISS	Lucia Gabriele
	CRO	Alfonso Colombatti
	ISTGE	Michele Cilli
	IRE	Gennaro Citro
	Pascale	Claudio Arra
	HSR	Paolo Dellabona

## **NETWORK NAZIONALE ITALIANO TUMORI EREDO-FAMILIARI (INTEF)**

Paolo Radice (a), Liliana Varesco (b), Franca Podo (c), Margherita Bignami (d)

*(a) Struttura semplice Suscettibilità genetica al Cancro, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Milano*

*(b) Struttura semplice Centro Tumori Ereditari, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova*

*(c) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(d) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### **Base di partenza e razionale**

Viene stimato che circa il 5-10% di tutti i tumori siano riconducibili ad una predisposizione di tipo ereditario, che conferisce un aumentato rischio di cancro. Per questa ragione, tali neoplasie vengono definite, seppure impropriamente, con il termine di Tumori Eredo-Famigliari (TEF). Tale predisposizione è dovuta alla presenza di mutazioni costitutive in geni specifici, che possono essere identificate mediante analisi molecolari (test genetici), sebbene vada rilevato che una frazione consistente di aggregazioni famigliari di cancro risulti al momento non riconducibile ad alterazioni in geni noti e non sia pertanto caratterizzabile dal punto di vista molecolare.

Gli individui con predisposizione ereditaria al cancro costituiscono un particolare sottogruppo di soggetti che necessitano di specifici programmi di sorveglianza e/o prevenzione. Esistono tuttavia diversi aspetti nella gestione clinica dei soggetti a rischio ereditario di cancro, sia affetti che asintomatici (quali, ad esempio, la possibilità di interpretare in senso funzionale il dato genetico-molecolare o la valutazione della reale efficacia dei programmi di riduzione del rischio o di prevenzione secondaria) riguardo ai quali le evidenze scientifiche oggi disponibili risultano ancora parziali o insufficienti. Oltre che alla relativa novità della materia, ciò è essenzialmente dovuto al fatto che i soggetti a rischio di cancro su base ereditaria, e le loro famiglie, costituiscono una frazione relativamente modesta della popolazione ed è quindi necessario mettere in essere studi collaborativi di ampio respiro, basati sulla costituzione di reti a livello sia nazionale che internazionale, per poter affrontare in modo adeguato le problematiche inerenti.

In questi ultimi anni diversi centri aderenti ad Alleanza contro il Cancro (ACC) hanno maturato una specifica esperienza in questo settore. In molti IRCCS sono, infatti, attivi programmi clinici e/o di ricerca riguardanti l'identificazione, la caratterizzazione e la gestione clinica dei soggetti a rischio di cancro su base ereditaria, in particolare per quanto riguarda le forme di predisposizione genetica associate ai carcinomi del colon-retto e della mammella e/o ovaia. Il presente progetto parte dal presupposto che queste esperienze possano notevolmente aumentare il loro valore, in termini di qualità della ricerca e dell'assistenza, se inserite in una rete che promuova la realizzazione di risorse condivisibili. In particolare, la consistenza in termini numerici delle realtà operanti sul territorio nazionale sulla tematica in oggetto, è indice evidente dell'esistenza di una reale necessità di individuare percorsi assistenziali condivisi. Un bisogno cui queste stesse realtà, che frequentemente operano all'interno di strutture di ricerca, si trovano spesso impreparate a rispondere in maniera adeguata e secondo gli standard di qualità ed efficienza che sono richiesti in ambito sanitario.

Una ricognizione preliminare della situazione attuale ha evidenziato una sostanziale sovrapposizione per quanto riguarda i temi di ricerca che vengono sviluppati dai centri che si occupano di TEF, ciascuno con peculiarità specifiche, e un evidente orientamento per i progetti a valenza cosiddetta traslazionale (vedi a riguardo quanto riportato di seguito dalle singole unità partecipanti). Data la potenziale ricaduta clinica di tali studi, il coordinamento di queste attività è presumibile possa costituire un valore aggiunto a studi su tematiche comuni, consentendo di ridurre in maniera significativa i tempi di trasferimento delle conoscenze acquisite in ambito sanitario, evitando gli sprechi derivanti dalla duplicazione delle stesse analisi e favorendo la condivisione di osservazioni (anche non pubblicate) generate dall'attività di gruppi che si dedicano alla risoluzione di problematiche simili.

Per quanto riguarda le attività più propriamente di tipo assistenziale, le informazioni disponibili indicano una generale tendenza all'adozione di modelli comuni. Tuttavia, come sopra accennato, queste attività si sono sviluppate in assenza di standard di riferimento chiaramente identificati, generando una variabilità di comportamenti tra percorsi apparentemente simili. Un ulteriore elemento di criticità è rappresentato dalla mancanza di un consenso su quegli aspetti della materia che possono essere considerati già rientrare nella sfera assistenziale e quelli che invece sono ancora più propriamente di ricerca.

A fronte di questa situazione, il presente progetto, attraverso la realizzazione di una rete nazionale di centri che si occupano di TEF, rappresenta un'opportunità concreta per arrivare a definire una serie di strumenti informativi che consentano sia di programmare e attuare azioni sanitarie evidence-based, sia di promuovere lo sviluppo di progetti di ricerca su base nazionale e internazionale e favorire la partecipazione agli stessi da parte degli aderenti alla rete.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivo principale del progetto è quello di creare una rete italiana di centri che si occupano di TEF, denominata *Italian Network TEF* (InTEF), che abbia come finalità:

- favorire l'integrazione delle attività di ricerca e assistenziali dei centri che in Italia si occupano della tematica in oggetto, attraverso la realizzazione di strumenti informativi condivisi per la implementazione delle attività inerenti la Consulenza Genetica Oncologica (CGO), la diagnostica molecolare (test genetici) e i programmi di prevenzione primaria e secondaria;
- realizzare uno strumento operativo da mettere a disposizione dei Servizi Sanitari Nazionale e Regionali (SSN e SSR) per orientare le strutture sanitarie nella gestione dei soggetti con patologie neoplastiche a probabile o sospetta origine ereditaria e dei loro collaterali;
- promuovere la partecipazione dei centri partecipanti a consorzi collaborativi internazionali con particolare riferimento a quelli su scala europea;
- favorire la partecipazione dei membri aderenti ad InTEF al progetto di realizzazione di una banca italiana di campioni di materiale biologico in linea con le linee guida di TRANSFOG.

Con riferimento ai programmi di sorveglianza mediante imaging, particolare attenzione verrà inoltre dedicata all'integrazione di una rete di centri con documentata esperienza nello screening senologico con mammografia, ecografia e risonanza magnetica a contrasto dinamico nelle donne ad alto rischio ereditario di tumore mammario.

Obiettivi secondari sono rappresentati da:

- il censimento della situazione operativa dei centri italiani che si occupano di TEF, con particolare riferimento a quelli del colon-retto e della mammella/ovaio, in ambito assistenziale e di ricerca;
- la produzione di documenti di riferimento per la stesura di *Standard Operating Procedure* (SOP);
- il collegamento con altre reti di ACC;
- il sostegno ad alcuni progetti di ricerca clinica su base nazionale.

## **Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati**

Durante questo primo anno del progetto è stata data priorità alle problematiche connesse alla realizzazione di una rete assistenziale InTEF, intendendo come “rete assistenziale” un programma di attività integrate su base nazionale/territoriale, finalizzato alla soddisfazione di un insieme di bisogni sanitari.

Dato che le problematiche oggetto delle attività delle prime due aree di coordinamento (CGO e test genetici) sono strettamente interconnesse e rappresentano il fulcro delle attività della costituenda rete InTEF, viene presentato come unica attività il lavoro svolto relativamente alle azioni approvate durante la prima riunione operativa con i responsabili delle UO partecipanti al progetto (e collaboratori esterni) del 14 marzo 2008:

### *1. Definizione degli standard e indicatori di CGO*

Attualmente non esistono standard di riferimento per le attività di CGO. A livello europeo si stanno costruendo standard relativi alle strutture che forniscono CG e al processo di CG. Il progetto Eurogentest ha prodotto diversi documenti di riferimento. In Italia nell'ambito della SIGU è stato istituito un gruppo di lavoro *ad hoc*. Una sinossi dei documenti più rilevanti verrà resa disponibile sul sito InTEF.

#### *1.2 Linee guida sui TEF*

Al fine di rendere disponibili dei documenti di consultazione (e discussione) sono state concepite delle tavole sinottiche per i principali tipi di tumore oggetto di CGO che contengono:

- sinossi delle forme di TEF che presentano un aumentato rischio per quel tipo di tumore, indicazione clinica al test genetico, presenza di particolarità preventive/terapeutiche;
- sinossi delle indicazioni di prevenzione contenute nelle principali LG internazionali per i gruppi a diverso rischio (popolazione generale, rischio familiarità, forme ereditarie).

Sono state predisposte le sinossi per i tumori del colonretto e della mammella che verranno rese disponibili sul sito InTEF.

### *2. Indagine conoscitiva sui centri di CGO e loro attività*

È stata effettuata un'indagine conoscitiva (InTEFquery1) per individuare, e confrontare, le attività sui TEF presenti presso le strutture di Genetica e di Oncologia medica. L'indagine è stata indirizzata ai responsabili di strutture di Genetica Clinica presenti nel Censimento 2004 della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) e ai responsabili di strutture di Oncologia Medica presenti nell'indirizzario dell'Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM) e del CIPOMO (Collegio Italiano dei Primari Oncologi Medici Ospedalieri).

In totale 76 genetisti e 313 Oncologi sono stati invitati a rispondere ad un questionario online predisposto in sede di coordinamento contenente domande sull'attività della propria struttura, sugli ideali e sull'organizzazione della CGO. Era inoltre richiesto di indicare eventuali centri di riferimento di CGO e di laboratorio.

Il primo invito è stato effettuato nel mese di giugno; solleciti sono stati inviati a luglio e a settembre. Nel mese di settembre, inoltre, si è cercato di raggiungere telefonicamente i non rispondenti per verificare i motivi della mancata adesione.

Alla data del 7 ottobre 2008, avevano risposto all'indagine 51 su 76 genetisti (67,1%) e 89 su 313 oncologi (28,4%). Al fine di cercare di aumentare l'adesione da parte degli oncologi è attualmente in corso il contatto telefonico diretto con i singoli medici. Si prevede di chiudere l'indagine nel mese di novembre 2008.

### 3. *Costruzione di un sito web*

Parte integrante del progetto inTEF è la creazione di un sito web a disposizione sia delle unità operative afferenti al network stesso, sia ad altri enti e istituti per consultazione, sebbene in maniera limitata. Nel sito potranno essere inseriti da parte delle unità operative contenuti come dati e informazioni provenienti dall'attività nel campo dei tumori eredo-familiari, in maniera coordinata e suddivisa nelle quattro aree funzionali: consulenza genetica, test genetici, saggi funzionali e sorveglianza. Al sito (<http://www.iss.it/itef>) si accede dalla sezione "programmi in rete" del sito di ACC (<http://www.iss.it/acca>), ospitato a sua volta nel sito principale dell'Istituto Superiore di Sanità. Analogamente al sito di ACC, del quale riprende la struttura e il rispetto dei criteri di accessibilità richiesti per la pubblica amministrazione, il sito inTEF è costituito da una home page pubblica con la presentazione sia in breve che in dettaglio delle basi del progetto, dei suoi obiettivi e delle quattro aree in cui è suddiviso. Per ogni area è a sua volta prevista una sezione pubblica di presentazione e una ad accesso riservato alle sole unità operative che costituiscono il network inTEF.

È inoltre in corso di finalizzazione la costruzione dell'area "saggi funzionali" allo scopo di potenziare conoscenze e gettare le basi di ulteriori collaborazioni inter-istituzionali secondo la missione del programma.

### 4. *Sorveglianza di donne ad alto rischio genetico-familiare di tumore mammario*

È stata attivata una Rete multicentrica nazionale, coordinata dall'ISS, per la sorveglianza radiologica multimodale di donne ad alto rischio di tumore mammario ereditario, con le finalità di: a) armonizzare i protocolli di screening delle donne ad alto rischio, identificate mediante consulenza genetica sulla base di mutazione deleteria dei geni BRCA1 o BRCA2, accertata nel soggetto o in parenti di primo grado, o sulla base della sola storia familiare; b) proporre un piano di prevenzione secondaria delle donne ad alto rischio, mediante uso integrato della risonanza magnetica a contrasto dinamico (MRI) e di tecniche di imaging convenzionale. La Rete ad oggi comprende otto IRCCS Oncologici: CRO; INT, HSR; IEO; IOV; Pascale; ISTGE; ITB), unitamente ad Aziende Ospedaliere, Policlinici e Istituti Universitari italiani - per un totale di 31 Centri distribuiti sul territorio, di cui 27 già autorizzati dal Comitato Etico Locale e pertanto già operativi (Piemonte (1), Lombardia (4), Trentino-Alto Adige (1), Veneto (1), Friuli (2); Liguria (2), Emilia (3), Toscana (2), Marche (1), Lazio (2), Abruzzo (1), Campania (2), Puglie (3), Sicilia (1), Sardegna (1)). È stato ad oggi attivato l'arruolamento di oltre 500 donne (di cui ca. 65% portatrici di mutazione). Presso l'ISS è stata realizzata una struttura informatica per la trasmissione in forma criptata dei dati di arruolamento e di screening (incluse le immagini radiologiche) ottenuti da ciascun Centro nelle sessioni diagnostiche annuali programmate.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del Network nazionale italiano Tumori Eredo- Familiari (inTEF)**

<b>Proponente</b> <i>(Coordinatori della rete)</i>	<b>Ente di appartenenza dell'UO</b>	<b>Responsabile scientifico delle UO</b>
INT <i>(Paolo Radice)</i> ISTGE <i>(Liliana Varesco)</i> ISS <i>(Franca Podo)</i> ISS <i>(Margherita Bignami)</i>	INT	Paolo Radice
	ISTGE	Liliana Varesco
	IEO	Bernardo Bonanni
	Humanitas	Alberto Malesci
	HSR	Maurizio Ferrari
	S. Matteo	Ombretta Luinetti
	IOV	Marco Montagna
	CRO	Alessandra Viel
	IOR	Luca Sangiorgi
	IRE	Vittoria Stigliano
	Pascale	Stefano Greggi
	ITB	Francesco Schittulli
	ISS	Margherita Bignami
	ISS	Franca Podo

## RETE NAZIONALE DI BIOINFORMATICA ONCOLOGICA (RNBIO)

Paolo Romano (a), Marco Crescenzi (b)

(a) *Struttura Complessa Bioinformatica e Proteomica Strutturale, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova*

(b) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### Base di partenza e razionale

L'esigenza di allestire una rete di bioinformatica per gli Istituti che fanno parte di Alleanza contro il Cancro (ACC) nasce dalla constatazione che la ricerca biomedica dipenderà sempre più dall'analisi delle informazioni disponibili e, quindi, dalla consapevolezza che la bioinformatica diventerà nei prossimi anni il più importante strumento di supporto all'analisi disponibile per i ricercatori. Già ora, la genomica e la proteomica dipendono fortemente dall'analisi automatica delle informazioni per svolgere le ormai classiche elaborazioni di analisi di sequenza, predizione di domini genomici attivi, di struttura, analisi funzionale dell'espressione genica, ecc. In prospettiva, altri ambiti di ricerca, quali l'analisi della variabilità genetica e delle mutazioni e l'analisi del metaboloma, produrranno grandi quantità di dati che potranno essere analizzati esclusivamente in-silico. A titolo d'esempio, si considerino alcuni numeri: le banche dati di sequenze nucleotidiche hanno incrementato la propria dimensione del 40% in media negli ultimi tre anni, una delle principali banche dati di esperimenti di *microarray*, *ArrayExpress*, ha duplicato la propria dimensione in ciascuno degli ultimi due anni, la lista dei siti SRS pubblici comprende un elenco di più di 1.300 distinti database, il supplemento annuale di *Nucleic Acids Research* dedicato alle banche dati di biologia molecolare ha elencato nel 2006 più di 680 database.

Le ovvie problematiche di analisi dati in-silico che derivano da questa ingente mole di informazioni sono ulteriormente complicate dalla distribuzione dei dati sulla rete Internet e dalla eterogeneità dei sistemi informativi. A questa eterogeneità corrispondono diversi software di gestione dati, diversi formati, diverse sintassi e, a volte, diverse semantiche. In questa situazione, anche la gestione dei dati e l'integrazione delle informazioni derivate da diverse sorgenti informative, compiti attualmente svolti dai ricercatori, diventano esse stesse motivazioni sufficienti per un supporto bioinformatico infrastrutturale.

A fianco di queste attività, legate prevalentemente alla ricerca, si sta affermando anche un settore di interesse traslazionale e clinico, la bioinformatica clinica. Appare, infatti, chiaro come sia sempre più necessario integrare le informazioni cliniche dei pazienti oncologici con informazioni genomiche per orientare la pratica diagnostica e terapeutica alla medicina personalizzata. In tale contesto, la pianificazione di studi e l'analisi statistica di dati integrati di tipo clinico e "omico", per la valutazione del contributo diagnostico e prognostico di tecnologie molecolari avanzate, si giova della cooperazione fra ricercatori informatici e statistici biomedici.

Gli IRCCS oncologici non hanno sinora sviluppato competenze, risorse ed esperienze bioinformatiche adeguate a questo contesto, salvo limitati casi. Al contrario, molti Istituti oncologici europei, quali il *Deutsches Krebsforschungszentrum* (DKFZ) di Heidelberg e il *Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas* (CNIO) di Madrid, nonché il *National Cancer Institute* (NCI) negli Stati Uniti, hanno da tempo investito cospicue risorse, attivato importanti gruppi di lavoro, e iniziano a ottenere i primi risultati significativi.

Gli Istituti di Alleanza contro il Cancro devono quindi elevare le competenze in questo settore strategico a un livello adeguato alle esigenze dei prossimi anni. La peculiarità di ACC, una federazione di Istituti autonomi e paritetici, nessuno dei quali avrebbe la “massa critica” necessaria, fa sì che una rete di coordinamento e cooperazione sia la struttura più idonea a consentire un efficace confronto tra bioinformatici, biologi e medici, un effettivo trasferimento di competenze tra Istituti, la valorizzazione delle competenze e dei risultati dell’attività bioinformatica svolta e la progettualità necessaria per risolvere efficacemente i problemi che si presenteranno nei prossimi anni.

La relativa novità, per gli Istituti ACC, della tematica impone lo svolgimento di uno studio di fattibilità che, nel corso del primo anno di progetto, consenta di definire precisamente le aree scientifiche di ricerca e cliniche di interesse per la rete, avendo cura di coinvolgere il maggior numero possibile di IRCCS oncologici e altri istituti di ricerca interessati.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

L’obiettivo principale della Rete Nazionale di Bioinformatica Oncologica (RNBIO) è la creazione di un efficace coordinamento delle attività bioinformatiche degli Istituti partecipanti ad ACC al fine di integrare ed elevare le attuali competenze e poter quindi ottimizzare e innovare le attività di ricerca e cliniche in oncologia basate sull’analisi in-silico e sull’automazione delle procedure e dei processi, nonché di partecipare a progetti di livello internazionale e, più in generale, competere ai massimi livelli della ricerca in questo settore.

Gli obiettivi secondari del progetto fanno riferimento ad aspetti relativi ad attività di supporto alla ricerca e alla clinica, alla formazione del personale, alla collaborazione interistituzionale e all’identificazione e definizione di nuovi progetti di ricerca di base e traslazionale.

Si ritiene in particolare di poter identificare i seguenti obiettivi concreti:

- promozione dell’uso di strumenti bioinformatici e dello sviluppo degli stessi, tramite le tecnologie informatiche e telematiche più innovative con l’obiettivo di migliorare l’efficienza e la qualità dell’analisi in-silico;
- coordinamento delle attività di ricerca e sviluppo su tematiche specifiche di ricerca e cliniche che possano portare all’ideazione di nuovi strumenti bioinformatici, la cui realizzazione può essere portata a termine in progetti finalizzati, finanziati su bandi nazionali e internazionali distinti;
- avvio e sviluppo di collaborazioni tra la rete di bioinformatica di ACC e Istituti oncologici europei e internazionali d’eccellenza, sulla base sia di progetti comunitari che bilaterali, nonché con altre reti e infrastrutture di ricerca, anch’esse da concretizzare con finanziamenti distinti;
- valorizzazione delle competenze e degli strumenti/servizi sviluppati e mantenuti dagli IRCCS in supporto all’oncologia clinica e sperimentale, anche nell’ottica di favorirne lo sviluppo secondo modalità informatiche di buon livello e di migliorarne le prestazioni;
- avvio e sviluppo di collaborazioni con gestori di servizi di *High Performance Computing* e infrastrutture di rete avanzate (Grid), nazionali e internazionali, per favorire l’utilizzo di software di elevata complessità e di grandi esigenze computazionali.

In particolare, il progetto:

- si propone di fornire strumenti e infrastrutture bioinformatiche e telematiche che facilitano il lavoro personale e collaborativo dei membri di ACC tramite l’implementazione di un opportuno sito di riferimento;



- prevede la partecipazione della maggioranza dei membri di ACC in quanto non si pone come una rete riservata ai bioinformatici, ma aperta a tutti i ricercatori e i clinici, ponendosi come un luogo di incontro e confronto tra le diverse professionalità tramite il quale sia possibile identificare e affrontare le esigenze e gli interessi di tutti; si intende allargare al massimo la partecipazione, soprattutto all'attività formativa, sfruttando le collaborazioni esistenti dei partner con altri enti/ricercatori.
- favorisce la realizzazione e l'ampliamento di reti regionali e interregionali che possono essere propedeutiche a uno sviluppo in ambito europeo in quanto i partner si rendono disponibili a sostenere e promuovere le attività della rete nei loro rispettivi ambiti regionali;
- ha numerosi agganci con progettualità europee per la partecipazione a progetti ERA-NET (*European Research Area NET*: registro tumori) ed ESFRI (*European Strategy Forum on Research Infrastructures*: biobanche, biologia strutturale, bioinformatica), nonché ai bandi del VII Programma Quadro HEALTH e IST (Challenges 1.2 'Service and Software Architectures, Infrastructures and Engineering' and 5.3 'Towards Sustainable and Personalised Healthcare - Virtual Physiological Human').

## **Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati**

Durante il primo anno di progetto, l'attività della RNBIO si è sviluppata secondo le linee previste, con la partecipazione effettiva e continua dei partner. Complessivamente, le attività svolte sono in leggero ritardo rispetto alle previsioni, come dettagliato in seguito, il ritardo essendo principalmente legato all'incertezza iniziale sulla data reale di inizio del progetto e alla successiva difficoltà a reclutare rapidamente il personale a contratto previsto per le attività di progetto. Il progetto si è ora avviato pienamente e si ritiene che i ritardi possano essere recuperati.

Nei primi dodici mesi, tutti i filoni di attività sono stati avviati. Il coordinamento si è concretizzato attraverso teleconferenze tramite software skype, posta elettronica, incontri generali e limitati a un numero ridotto di partner. In particolare, sono state attivate tre *mailing list*: la lista [members@rnbio.it](mailto:members@rnbio.it) è un forum aperto, non moderato, dedicato alla comunicazione tra i partner, la lista [news@rnbio.it](mailto:news@rnbio.it) è dedicata alla diffusione di annunci dalla rete, e la lista [newsletter@rnbio.it](mailto:newsletter@rnbio.it) è destinata agli annunci relativi alla Newsletter.

Il sito web di progetto è stato implementato all'indirizzo <http://www.rnbio.it/>, utilizzando il software Plone, un *Contents Management System* con utili caratteristiche per la gestione collaborativa di siti web. Il sito comprende un'area pubblica e una riservata ai partner. Nell'area pubblica sono presenti sezioni su news e eventi scientifici, i partner, documenti prodotti dalla rete, software e formazione. Nella sezione riservata sono invece disponibili sotto-sezioni dedicate alla formazione (progettazione dei corsi), ai gruppi di lavoro, ai meeting di progetto e alle teleconferenze. Tutti i partner sono registrati con un proprio account e abilitati all'inserimento e pubblicazione di news, eventi scientifici e documenti di varia natura.

Per quanto riguarda la formazione e l'aggiornamento, sono stati definiti due filoni principali relativi rispettivamente alla formazione sulla programmazione e sullo sviluppo di strumenti bioinformatici e al miglior utilizzo di software di particolare interesse e utilità. Il primo filone mira anche a sottolineare l'importanza della *good programming practice*, del *software reuse* e dell'interoperabilità dei tool sviluppati, mentre il secondo si pone l'obiettivo di definire metodi comuni di analisi, promuovere l'uso dei migliori software e, in definitiva, migliorare l'efficacia

dell'analisi. Il primo corso ha riguardato l'introduzione alla programmazione con il linguaggio R (*Introduction to R – I2R*) e si è svolto a Casalecchio di Reno, presso il CINECA, che collabora strettamente con l'unità operativa IOR, dal 5 al 6 giugno 2008. Il corso, che ha compreso anche una parte pratica, è stato destinato in primis ai partner della rete, ma allargato ai dipendenti di tutti gli IRCCS, con precedenza per quelli di ACC. La partecipazione è stata elevata, tanto che non è stato possibile accettare tutte le richieste pervenute, e il gradimento notevole. Attualmente sono in discussione alcune ipotesi per corsi da tenersi tra la fine del 2008 e i primi mesi del 2009. La discussione avviene all'interno dell'attività dei gruppi di lavoro.

Per quanto riguarda i gruppi di lavoro, si è proceduto alla loro definizione tramite un iter concordato che ha privilegiato la massima partecipazione dei partner. Inizialmente, si è chiesto ai partner di avanzare proposte. Queste sono state vagliate da tutti i partecipanti e si è quindi avviata una discussione generale su ciascuna proposta. Ciascuna delle proposte accettate ha quindi definito un programma di massima per la durata del progetto. La gestione dei gruppi avverrà sulla base di meeting periodici, e via apposite mailing list e/o teleconferenze. Il sito web è destinato a ospitare tutta la relativa attività. I gruppi di lavoro approvati sono relativi alle seguenti tematiche:

- i) automazione dei processi d'analisi dei dati online,
- ii) oncoproteomica,
- iii) oncogenomica,
- iv) metodi statistici,
- v) analisi dati di *deep sequencing*.

Non è per ora stato attivato nessun gruppo in collegamento con il progetto ESFRI INSTRUCT, ma la discussione sulle modalità di collaborazione con esso è tuttora in corso.

Una massa critica e attività sinergiche sono importanti per la ricerca e lo sviluppo bioinformatici. Per questo motivo, sono state incentivate nuove collaborazioni con altre reti oncologiche e bioinformatiche e con gestori di sistemi di supercalcolo. In particolare, si è partecipato alla proposta di un'infrastruttura italiana per la bioinformatica con la Società Italiana di Bioinformatica (*Bioinformatics Italian Society*, BITS) e con il progetto interdipartimentale "Bioinformatica" del CNR. Si sono anche stabiliti contatti per future collaborazioni con i responsabili del progetto ESFRI ELIXIR e della *Informatics Initiative del National Cancer Research Institute* inglese.

La rete è stata presentata in vari workshop e convegni, quali quello della Società Italiana di Cancerologia del 2007 (SIC2007), e della Società Italiana di Bioinformatica, congiunto alla *European Conference of Computational Biology* (ECCB/BITS 2008).

Inoltre, la rete ha organizzato una sessione di bioinformatica oncologica nell'ambito del workshop NETTAB 2008 dedicato a "Bioinformatics Methods for biomedical complex system applications", Varenna (LC), 19-21 maggio 2008. Alla sessione sono stati anche presentati diversi contributi dei partner della rete.

Come ulteriore strumento di promozione, sarà pubblicata una *newsletter* in formato elettronico. Un primo numero, di prova, denominato numero 0, sarà presentato nei prossimi giorni. L'obiettivo della Newsletter è quello di informare su attività e risultati ottenuti, contribuendo così anche allo sviluppo di ulteriori collaborazioni. La *newsletter* conterrà, tra l'altro, una rassegna dei risultati, l'annuncio di corsi ed eventi scientifici, abstract di pubblicazioni recenti dei partner e *research news* (sia interne che esterne alla rete), *training note* su software, metodi e algoritmi specifici.

A queste attività, prettamente di rete e di coordinamento, vanno aggiunte quelle svolte singolarmente dai diversi partner e opportunamente dettagliate nelle relazioni scientifiche individuali.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione della Rete Nazionale Bioinformatica in oncologia (RNBIO)**

Proponente (Coordinatori della rete)	Ente di appartenenza dell'UO	Responsabile scientifico delle UO
ISTGE (Paolo Romano) ISS (Marco Crescenzi)	ISTGE	Paolo Romano
	IEO	Francesca Ciccarelli
	INT	Adriano De Carli
	IRE	Giulia Piaggio
	CRO	Valter Gattei
	ITB	Stefania Tommasi
	IOR	Luca Sangiorgi
	Humanitas	Massimo Locati
	HSR	Giovanni Lavorgna
	Istituto di Scienze dell'Alimentazione (CNR)	Angelo Facchiano
	IDI	Giandomenico Russo
	ISS	Paolo Roazzi

## Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Benedetti D, Bomben R, Dal-Bo M, Marconi D, Zucchetto A, Degan M, Forconi F, Del-Poeta G, Gaidano G, Gattei V. Are surrogates of IGHV gene mutational status useful in B-cell chronic lymphocytic leukemia? The example of Septin-10. *Leukemia* 2008;4(3):355-8.
2. Bevilacqua V, Chiarappa P, Mastronardi G, Menolascina F, Paradiso A, Tommasi S. Identification of tumour evolution patterns by means of inductive logic programming. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* 2008;6(2):91-7.
3. Bevilacqua V, Pannarale P, Mastronardi G, Azzariti A, Tommasi S, Menolascina F, Iorio F, Di Bernardo D, Paradiso A, Colabufo NA, Berardi F, Perrone R, Tagliaferri R. High-throughput analysis of the drug mode of action of PB28, MC18 and MC70, three cyclohexylpiperazine derivative new molecules. In: Huang D-S, et al. (Ed.). *Advanced intelligent computing theories and applications with aspects of contemporary intelligent computing techniques: 4th International Conference on Intelligent Computing, ICIC 2008. Shanghai (China); September 2008. Proceedings*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2008. p. 1085-92
4. Costantini S, Colonna G, Facchiano AM. FASMA: a service to format and analyze sequences in multiple alignments. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2007;5(3-4):253-5.
5. Costantini S, Paladino A, Facchiano AM. CALCOM: A software for calculating the center of mass of proteins. *Bioinformatics* 2008;2(7):271-2.
6. Facchiano A, Facchiano F. Transglutaminases and their substrates in biology and human diseases: 50 years of growing. *Amino Acids* 2008. [Epub ahead of print]
7. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, Bomben R, Dal-Bo M, Luciano F, Rossi FM, Degan M, Amadori S, Del PG. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;111(2):865-73.

8. Marabotti A. Modeling the conformation of side chains in proteins: approaches, problems and possible developments. *Current Chemical Biology* 2008;2:200-14.
9. Marabotti A, Spyarakis F, Facchiano A, Cozzini P, Alberti S, Kellogg GE, Mozzarelli A. Energy-based prediction of amino acid-nucleotide base recognition. *J Comput Chem* 2008;29(12):1955-69.
10. Menolascina F, Alves RT, Tommasi S, Chiarappa P, Delgado M, Bevilacqua V, Mastronardi G, Freitas A, Paradiso A. Fuzzy rule induction and artificial immune systems in female breast cancer familiarity profiling. *The International Journal of Hybrid Intelligent Systems* 2008;5(3):161-5.
11. Menolascina F, Bevilacqua V, Zarrilli M, Mastronardi G. Induction of fuzzy rules by means of artificial immune systems in bioinformatics. In: Jin Y, Wang L (Ed.). *Fuzzy systems in bioinformatics, bioengineering and computational biology*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2009. p. 1-18.
12. Monti L, Cinquetti R, Guffanti A, Cremona M, Lavorgna G, Cazzola M, Vignati F, Cittaro D, Taramelli R, Acquati F. In silico prediction and experimental validation of natural antisense transcripts in two cancer-associated regions of human chromosome 6. *International Journal of Oncology* 2008 (in corso di stampa).
13. Mutarelli M, Cicatiello L, Ferraro L, Grober OM, Ravo M, Facchiano AM, Angelini C, Weisz A. Time-course analysis of genome-wide gene expression data from hormone-responsive human breast cancer cells. *BMC Bioinformatics* 2008;9(Suppl 2):S12.
14. Orfanelli U, Wenke AK, Doglioni C, Russo V, Bosserhoff AK, Lavorgna G. Identification of novel sense and antisense transcription at the TRPM2 locus in cancer. *Cell Res* 2008;18(11):1128-40.
15. Rambaldi D, Giorgi FM, Capuani F, Ciliberto A, Ciccarelli FD. Low duplicability and network fragility of cancer genes. *Trends Genet* 2008;24(9):427-30.
16. Romano P, Marra D. SWS: accessing SRS sites contents through Web Services. *BMC Bioinformatics* 2008;9(Suppl 2):S15.
17. Romano P. Automation of in-silico data analysis processes through workflow management systems. *Briefings in Bioinformatics* 2008 9(1):57-68.
18. Rossi D, Zucchetto A, Rossi FM, Capello D, Cerri M, Deambrogi C, Cresta S, Rasi S, De PL, Lobetti BC, Bulian P, Del PG, Ladetto M, Gattei V, Gaidano G. CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2008;93(10):1575-9.

## RETE NAZIONALE TELEPATOLOGIA (TESEO)

Antonino Carbone (a), Claudio Di Benedetto (b)

(a) Dipartimento di Anatomia Patologica, Fondazione IRCCS, Istituto Nazionale Tumori, Milano

(b) Servizio Informatico, Documentazione, Biblioteca, Attività Editoriali, Istituto Superiore di Sanità, Roma

### Base di partenza e razionale

L'applicazione di avanzate tecnologie informatiche e telematiche in ambito oncologico ha reso possibile, da qualche tempo a questa parte, la trasmissione a distanza e l'analisi di reperti istocitopatologici che, come noto, rappresentano un elemento di fondamentale importanza ai fini della diagnosi e della classificazione delle neoplasie.

Il sistema, comunemente noto come “telepatologia”, permette la condivisione, tra postazioni fisicamente distanti tra di loro, di immagini istopatologiche che possono essere utilizzate a fine diagnostico (rendendo possibili conferenze diagnostiche finalizzate alla soluzione di casi diagnostici difficili e inconsueti e consulti a distanza, altrimenti detti di “second opinion”), per scopi scientifici (realizzazione di database specialistici), nonché per scopi educativi (*e-learning*) e per l'aggiornamento professionale (diffusione di competenze).

I recenti sviluppi tecnologici in tema di acquisizione, tramite microscopia ottica, di reperti istocitopatologici e la loro successiva digitalizzazione – elementi costitutivi dei sistemi di microscopia virtuale – permettono un significativo miglioramento della rapidità, precisione e riproducibilità delle diagnosi. Una volta che il vetrino tradizionale è trasformato in vetrino digitalizzato, in grado cioè di fornire un'immagine di qualità diagnostica, il reperto può essere archiviato, duplicato, trasmesso su reti telematiche dedicate e su Internet.

Nel nostro Paese programmi che prevedono l'impiego della microscopia virtuale sono in fase di avanzata applicazione; sul piano nazionale è stato lanciato nel 2002, nell'ambito di Alleanza Contro il Cancro (ACC) il progetto TESEO allo scopo di promuovere servizi di telepatologia, mediante la realizzazione di una rete tra Dipartimenti di Anatomia Patologica.

Le attività ICT (*Information and Communication Technology*) di detto progetto, ivi compresi l'*hosting* e la gestione della banca dati, sono state svolte dal Consorzio di Bioingegneria e Informatica Medica (CBIM) di Pavia, che ha maturato una triennale esperienza nel coordinamento gestionale telematico del network in questione.

Anche alcune Amministrazioni regionali si stanno orientando verso la realizzazione di progetti di telepatologia in ambito oncologico (Regione Piemonte, Regione Sardegna, Regione Calabria, Regione Toscana, Regione Sicilia), privilegiando l'adozione della microscopia virtuale, il cui collegamento in rete garantirebbe un importante valore aggiunto sul piano nazionale. In questo scenario, il Progetto TESEO di ACC rappresenterà il *backbone* che assicurerà ai Progetti di Telepatologia in ambito oncologico la connettività nazionale in rete con il *backbone* regionale.

### Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivo principale del progetto è quello di costruire una rete nazionale partendo dalle infrastrutture esistenti, assicurando l'armonizzazione e l'integrazione delle risorse nazionali con

l'infrastruttura regionale in via di attivazione, sostenendo, così, una infrastruttura di assistenza e di ricerca nazionale che, nel rispetto del principio di sussidiarietà con le Regioni, possa offrire agli anatomopatologi e agli oncologi italiani un modello da esportare a livello europeo.

Obiettivi secondari del progetto sono:

1. *Sperimentazione del software applicativo di “second opinion”*

Raccomandazioni: la sperimentazione deve essere limitata in ambito intranetwork, con la possibilità di chiamata in causa di uno specifico esperto, ricercando comunque il consenso diagnostico, non trascurando la numerosità dei casi da immettere nel network, abituandosi a trattare con forte senso di collegialità i casi che possono comportare conflittualità di opinione.

2. *Controllo di qualità*

In aggiunta a quanto già riportato, si puntualizza il ruolo cruciale che il progetto TESEO può avere all'interno della SIAPEC per il controllo di qualità (di concerto con il Livello regionale), per la formazione (a distanza e ECM) e per le esperienze di concordanza diagnostica come base di linea guida. Il nuovo sito web SIAPEC potrebbe includere un link con TESEO o ancor meglio con ACC. Il collegamento alla rete, già esistente nell'ambito del Progetto TESEO, con Claudio Clemente, Coordinatore della Commissione Informatica della SIAPEC, e Angelo Paolo Dei Tos, Esperto per i Tumori rari, garantirà il coinvolgimento formale della Società Scientifica SIAPEC.

3. *Ricerca oncologica e impatto internazionale*

Si precisa che a fronte della necessità di un impatto regionale che potrebbe diventare concreto attraverso il progetto di Ricerca Finalizzata presentato dalla regione Piemonte per costruire un network interregionale, appare opportuno e necessario per completare l'architettura telematica immaginata in origine, avere anche un impatto internazionale. Un'opportunità ci è offerta dalla proposta avanzata dall'Alleanza degli Ospedali Italiani nel Mondo in merito ad una collaborazione Internazionale sulla ricerca oncologica tra gli Ospedali Italiani all'estero e gli IRCCS oncologici. Tale proposta prevede fra i soggetti attuatori selezionati Ospedali Italiani nel mondo (vedi sito del Ministero della Salute per la lista completa) e ACC anche per attività di teleconsulto in istocitopatologia.

4. *Formazione operatori e controllo di qualità (SIAPEC)*

Attività di formazione per gli operatori presenti nelle strutture sanitarie che saranno dotate di microscopia virtuale finalizzata ad un corretto e completo utilizzo clinico della strumentazione. L'attività di formazione prevede anche alcune sessioni di lavoro cooperativo in collaborazione con gli Anatomopatologi degli IRCCS e della SIAPEC al fine di definire e attuare procedure di controllo qualità della prestazione erogata. Il collegamento alla rete, già esistente nell'ambito del Progetto TESEO, con Claudio Clemente, Coordinatore della Commissione Informatica della SIAPEC, e Angelo Paolo Dei Tos, Esperto per i Tumori rari, garantirà il coinvolgimento formale della Società Scientifica SIAPEC.

5. *Histological Clinical Repository*

Si prevede la realizzazione di un repository clinico finalizzato alla gestione di dati clinici strutturati da associare all'immagine digitale e all'interconnessione con altre banche dati istologiche. Verrà inoltre realizzato un apposito motore di ricerca finalizzato alla consultazione avanzata.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Le prime fasi del progetto TESEO hanno conseguito i seguenti risultati:

- verifica scientifica del processo di conversione delle immagini istologiche digitali da sistema Bacus a sistema .slide di Olympus (Carbone con CBIM-Olympus);
- sopralluogo di CBIM presso gli 11 centri partecipanti per la verifica della infrastruttura hardware e software a supporto del progetto di telepatologia (tecnici CBIM);
- verifica della nuova versione del software di second opinion. In particolare, è stato verificato il nuovo flusso di second opinion implementato nel sistema software (CBIM, Di Benedetto, Carbone);
- presentazione, a seguito della validazione del sistema software, a tutti i partecipanti del progetto;
- verifica dello stato delle procedure amministrative per acquisizione della nuova strumentazione Olympus e stato di attivazione della rete GARR presso gli IRCCS partecipanti al progetto.

Le prime attività svolte sono state presentate il 21 aprile 2008 al “Convegno di presentazione delle attività iniziate nell’ambito dei programmi 1, 2, 3, 4” svolto presso l’Istituto Superiore di Sanità a Roma.

Relativamente all’infrastruttura applicativa, è stata completata una prima fase di re-engineering del software di “second opinion” del progetto TESEO che si è concretizzata con:

- rilascio della nuova versione del software di “second Opinion” (23 luglio 2008);
- richiesta di verifica del nuovo software (28 luglio 2008) e richiesta all’ingegner Stoppini di incontro;
- verifica dell’aggiornamento del nuovo software per “second opinion” (11 agosto 2008);
- incontro con gli anatomopatologi della Rete Nazionale di Telepatologia di ACC per la presentazione della nuova release del software applicativo;
- valutazione del nuovo software per “second opinion” (9 settembre 2008).

## Articolazione del progetto

L’articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del Rete Nazionale Telepatologia (TESEO)**

<b>Proponente</b> <i>(Coordinatori della rete)</i>	<b>Ente di appartenenza dell’UO</b>	<b>Responsabile scientifico delle UO</b>
INT ( <i>Antonino Carbone</i> ) ISS ( <i>Claudio Di Benedetto</i> )	INT	Antonino Carbone
	IRE	Raffaele Perrone Donnorso
	Pascale	Gerardo Botti
	CRO	Vincenzo Canzonieri
	ITB	Gianni Simone
	IEO	Giuseppe Viale
	Maugeri	Mario Scelsi
	HSR	Claudio Doglioni
	IOR	Piero Picci
	CIBIM	Marco Pagani

## RETE NAZIONALE PER LA CURA E LA RICERCA DEI SARCOMI MUSCOLOSCHIELETRICI

Piero Picci (a), Ferdinando Cornelio (b)

(a) Dipartimento di Oncologia Muscoloscheletrica, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna

(b) Direzione Scientifica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico "Carlo Besta", Milano

### Base di partenza e razionale

I sarcomi primitivi dell'apparato muscoloscheletrico sono neoplasie rare. I sarcomi dei tessuti molli muscoloscheletrici presentano un'incidenza di 2-3 nuovi casi/100.000 abitanti all'anno e sono caratterizzati da un'estrema varietà di istotipi. Nella fascia d'età pediatrica vi è una prevalenza per il rabdomiosarcoma, mentre in una fascia adulta sarcoma sinoviale, liposarcoma e leiomiomasarcoma sono gli istotipi maggiormente rappresentati. I sarcomi primitivi dello scheletro, ancora più rari di quelli delle parti molli, sono invece prevalentemente rappresentati dall'osteosarcoma (OS) e dai sarcomi della famiglia di Ewing (*Ewing's Family of Tumors*, EFT). La fascia di età a maggiore incidenza di tali neoplasie è quella compresa fra i 10 e i 20 anni pur potendo comparire a qualsiasi età. Pur non disponendo di un registro nazionale di tali patologie, sulla base dell'esperienza è possibile calcolare che annualmente in Italia assommano a circa 120 le nuove diagnosi di OS (comprese le forme secondarie) e a circa 80 le nuove diagnosi di EFT:

Il trattamento di tali patologie richiede un approccio multidisciplinare (patologico, chemioterapico, chirurgico, radioterapico). I trattamenti chemioterapici, nelle forme scheletriche, sono usualmente somministrati secondo modalità neoadiuvante con trattamenti successivi al trattamento locale in genere basati sulla risposta istologicamente valutata sul pezzo di resezione. Nelle forme dei tessuti molli l'uso primario della chemioterapia è ad oggi oggetto di studio.

Il trattamento locale è nella stragrande maggioranza dei casi di tipo chirurgico e pone significativi problemi di tipo ricostruttivo nelle forme scheletriche specie in età pediatrica.

Il trattamento radioterapico rappresenta nelle forme dei tessuti molli uno standard per consolidare il controllo locale dopo chirurgia. Nelle forme scheletriche è riservato ad una minoranza di pazienti con EFT e pone significativi problemi legati alla fascia di età in cui la malattia maggiormente incide e spesso si deve embriacare a trattamenti chemioterapici particolarmente complessi.

L'insieme di tali problemi ha fatto sì che tali patologie siano da sempre trattate in pochi centri che hanno maturato una significativa esperienza in materia.

L'Istituto Ortopedico Rizzoli raccoglie e tratta circa il 60% dei nuovi casi diagnosticati annualmente di sarcomi primitivi dello scheletro. Lo stesso Istituto e l'Istituto Nazionale Tumori di Milano raccolgono e trattano circa i due terzi dei pazienti con sarcomi ad alto grado dei tessuti molli arruolati nei protocolli nazionali e internazionali che nel tempo si sono succeduti e nel protocollo attualmente in corso.

Studi clinici nazionali finanziati dal CNR sono stati attribuiti all'Istituto Ortopedico Rizzoli sin dal 1978.



## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi del progetto sono:

1. consolidare una rete collaborativa nazionale di Istituti specificamente interessati e dedicati al trattamento multidisciplinare dei sarcomi primitivi dell'apparato muscoloscheletrico, rete che di fatto comprende già tutti gli IRCCS con interessi oncologici nel campo muscolo-scheletrico;
2. definire protocolli di ricerca clinica specifici per istotipo, stadio di malattia e particolari caratteristiche di neoplasia;
3. creare una struttura di supporto tecnico-organizzativo ai protocolli che verranno prodotti e condotti nell'ambito della rete collaborativa.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

La pianificazione delle attività connesse agli obiettivi del progetto è stata elaborata di concerto con il direttivo dell'*Italian Sarcoma Group* (ISG), associazione che raccoglie le principali istituzioni italiane dedicate o primariamente coinvolte nel trattamento dei sarcomi.

La prima riunione si è tenuta nel dicembre 2007 a Bologna e un successivo aggiornamento è stato effettuato nel corso del direttivo ISG riunitosi a Milano in occasione dell'Annuale congresso dell'Associazione (aprile 2008).

È stato definito un accordo per la creazione di un database ISG che consenta un accesso remoto dei dati relativi ai pazienti inseriti nei protocolli ISG. Il sito è visualizzabile all'indirizzo: <http://www.isg-area-riservata.org/dh>.

È stata formalizzata la creazione di un panel di anatomopatologi con il compito di revisione delle diagnosi istologiche dei pazienti con sarcomi ossei inseriti nei protocolli ISG. Il panel è composto dal Dott. M. Alberghini (IOR, Bologna); Dott.ssa A. Parafioriti (G. Pini, Milano); Dott. A. Franchi (Università di Firenze); Dott.ssa A. Linari (OIRM, Torino).

La prima sessione di revisione si è tenuta a Bologna in data 10-11 giugno 2008. La prossima sessione è in programma per il prossimo dicembre.

È stato organizzato presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli un corso di formazione per il monitoraggio clinico degli studi IGS. Al corso, organizzato in collaborazione con l'Ufficio Ricerca del Servizio di Assistenza del Rizzoli, ha partecipato personale dipendente e a contratto IOR che verrà successivamente utilizzato per il monitoraggio degli studi ISG.

È stato definito il protocollo di trattamento per il sarcoma di Ewing non metastatico. Studio randomizzato che confronta due protocolli a diversa intensità di dose. Allo studio partecipano le principali istituzioni italiane sia pediatriche che di oncologia degli adulti del territorio nazionale.

Il protocollo è stato sottoposto alla valutazione del Comitato Etico del Centro Coordinatore nel dicembre 2008.

Sono in programma per marzo 2009 e ottobre 2009 due conferenze di consenso per la definizione di raccomandazioni cliniche per il trattamento del sarcoma di Ewing e dell'osteosarcoma.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione della Rete nazionale per la cura e la ricerca dei sarcomi muscolo scheletrici**

<b>Proponente</b> <i>(Coordinatori della rete)</i>	<b>Ente di appartenenza dell'UO</b>	<b>Responsabile scientifico delle UO</b>
IOR ( <i>Piero Picci</i> )	IOR	Piero Picci
Besta ( <i>Ferdinando Cornelio</i> )	IOR	Stefano Ferrari

**PROGRAMMA 3**

**Trasferimento delle conoscenze allo sviluppo di interventi  
volti a prevenire, diagnosticare e trattare il cancro:  
presentazione dei progetti**

*Coordinatori*

Filippo Belardelli, Pier Giuseppe Pelicci



# **NUOVE MOLECOLE DELL'INFIAMMAZIONE: TRASFERIMENTO DAL LABORATORIO AL LETTO DEL PAZIENTE**

Alberto Mantovani

*Direzione Scientifica, Istituto Clinico Humanitas, Rozzano, Milano*

## **Base di partenza e razionale**

L'evidenza epidemiologica e sperimentale ha chiaramente indicato che l'infiammazione presente nel microambiente tumorale è un fattore prognostico negativo ed è associata ad aumentata progressione e invasione del tumore, aumentata angiogenesi e immunosoppressione. La scoperta di un legame tra infiammazione e rischio di cancerogenesi/progressione del tumore, apre la possibilità che molecole associate all'infiammazione possano diventare marcatori biologici utili per monitorare i pazienti (valenza diagnostica/prognostica) e anche fungere da bersaglio di terapie innovative (valenza terapeutica) che si basano su strategie totalmente diverse dalle precedenti.

L'obiettivo centrale di questo studio è di tradurre la nostra conoscenza sul nesso tra infiammazione e cancro in metodi utili a prevenire, diagnosticare e trattare il cancro. Questo progetto si basa su una forte tradizione collaborativa esistente fra gli IRCCS coinvolti e le strutture ospedaliere collocate in varie aree regionali del Paese. Caratteristica saliente di progetto è la focalizzazione su molecole originali dell'infiammazione scoperte e/o caratterizzate dal gruppo proponente IRCCS Humanitas.

La rete è costituita da tre istituzioni. La prima e coordinante istituzione è l'Istituto Clinico Humanitas, i cui scienziati hanno contribuito ad aprire la strada alla comprensione dei collegamenti fra infiammazione e progressione del cancro. I mediatori infiammatori e antinfiammatori di origine sono stati scoperti/caratterizzati da questo gruppo di scienziati (es. PTX3, TIR8/SIGIRR, CX3CR1) e sono stati studiati nel contesto dei tumori allo scopo di identificare un possibile biomarker informativo per la diagnosi e la prognosi, o che costituisca un target innovativo nelle terapie del cancro.

La seconda istituzione è l'Istituto Tumori di Milano (INT). Le attività di questa unità sono state sviluppate nel tentativo di approfondire la conoscenza del ruolo degli oncogeni nell'attivazione delle vie pro-infiammatorie. Traendo vantaggio dalla vasta quantità di dati disponibile sul profilo genetico dei tumori umani, gli scienziati hanno identificato, mediante l'analisi computazionale parecchie coppie ligando-recettore di mediatori infiammatori costantemente espressi in diversi tipi di tumori umani.

La terza istituzione è l'IRCCS Istituto Tumori Giovanni Paolo II di Bari (ITB), i cui scienziati hanno un'esperienza di lunga tradizione nel campo dell'angiogenesi e nella caratterizzazione delle cellule coinvolte nella neo-angiogenesi del tumore.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

L'obiettivo principale di questo progetto è il trasferimento clinico delle conoscenze sin qui acquisite sulle molecole infiammatorie da utilizzarsi quali potenziali biomarcatori diagnostici/prognostici e come co-adiuvatori delle terapie anti-tumorali convenzionali.

Il programma si articola seguendo diverse linee di ricerca:

- ruolo della proteina di fase acuta PTX3 nei tumori e suo utilizzo diagnostico/terapeutico in pazienti neoplastici;
- nuovi marcatori diagnostici/prognostici dei tumori: il recettore CX3CR1;
- nuovi marcatori diagnostici/prognostici dei tumori: il trasduttore TIR8;
- impatto dell'infiammazione indotta da chirurgia nella progressione tumorale;
- infiammazione mediata da oncogeni nei carcinomi umani: identificazione di molecole di interesse clinico;
- validazione di nuovi bersagli terapeutici dell'angiogenesi. Caratterizzare il ruolo dei mastociti e dei suoi enzimi nell'angiogenesi di metastasi epatiche, quali possibili bersagli di trattamenti antiangiogenetici;
- inibizione dello “switch angiogenico” del mieloma multiplo, caratterizzando il *signalling* di *pathway* che sostengono la neo-angiogenesi, quali il PDGFBB/PDGFRbeta e, per confronto, altri *pathway*, fra i quali il VEGF/VEGFR2, cruciale per le cellule endoteliali e tumorali.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Una caratteristica generale del programma di lavoro è la focalizzazione su molecole originali scoperte e/o caratterizzate dal gruppo proponente IRCCS Humanitas. Tra queste, Pentraxin-3 (PTX-3), una proteina solubile di fase acuta indotta dalle citochine infiammatorie TNF/IL-1, con un ruolo rilevante nella risposta immunitaria innata. PTX3 ha un ruolo difensivo importante nella risoluzione di infezioni sistemiche, che frequentemente colpiscono pazienti e tumori. In questo progetto PTX3 è stata studiata quale potenziale nuovo marcatore prognostico e agente profilattico terapeutico nei confronti di patogeni opportunisti, e nella clearance di cellule tumorali dopo chemioterapia. In collaborazione con il Gruppo di Ricerca (GR) Biondi e il GR Rambaldi, sono stati misurati i livelli plasmatici di PTX3 in pazienti leucemici immunosoppressi, allo scopo di stabilire una possibile relazione con i pazienti maggiormente a rischio di infezioni opportunistiche. In questo ambito, è allo studio la produzione a clinical grade di PTX3 esogeno. Insieme al gruppo del GR Manfredi, si sta studiando il ruolo di PTX3 nell'eliminazione delle cellule neoplastiche apoptiche.

Un'altra linea di lavoro originale si focalizza sulla molecola TIR8, un componente della trasduzione del segnale dei recettori dell'immunità innata (IL-1 e Toll like 4), con attività regolatrice inibitoria, espressa prevalentemente nell'epitelio intestinale. Il GR Mantovani ha caratterizzato il ruolo di regolatore negativo della molecola TIR8/SIGIRR nei processi infiammatori, e ha descritto che i topi privi di TIR8 sono più suscettibili di infiammazione intestinale e di cancro indotto da colite. In collaborazione con il GR Laghi il polimorfismo del gene Tir8 è stato studiato negli individui sani e in pazienti con malattia (“inflammatory bowel disease”).

Nel microambiente tumorale è presente un network complesso di chemochine e recettori. È ormai stabilito che anche le cellule tumorali possono esprimere i recettori delle chemochine, e

avvantaggiarsene non solo per migrare a distanza, ma anche per degradare la matrice del microambiente e per sopravvivere agli insulti apoptotici. In questo studio abbiamo valutato come le chemochine e i loro recettori possano servire da nuovi marcatori biologici dei tumori, in particolare come indicatori diagnostici/prognostici e come potenziali bersagli terapeutici. I nostri studi dimostrano che il tumore umano del pancreas esprime il CX3CR1, recettore specifico per Fractalkine o CX3CL1, una chemochina prodotta da cellule nervose e terminazioni nervose periferiche. Il carcinoma del pancreas umano ha un ben noto tropismo per le fibre nervose e il recettore è coinvolto nel processo di invasione e metastatizzazione. Infatti, i pazienti con più elevata espressione di recettore CX3CR1 hanno una marcata disseminazione perineurale e una più frequente recidiva locale dopo chirurgia. Sulla base di queste evidenze proponiamo che il recettore CX3CR1 sia un marcatore utile per identificare i pazienti a più alto rischio di progressione tumorale. Inoltre, in collaborazione con il GR Laghi, è stata studiata l'espressione del recettore CX3CR1 in tessuti pre-neoplastici (PanIN) quale marker potenziale e precoce di cancro pancreatico.

In collaborazione con il GR Montorsi è stato studiato un vasto numero di mediatori infiammatori per verificare l'effetto dello stress chirurgico (laparoscopia contro "open surgery") nel risultato clinico dei pazienti con cancro coloretale. Infine è stato studiato il ruolo del clustering molecolare indotto da IL-6 nel cancro coloretale umano (GR Spagnoli/Pucci).

Un'altra importante linea di ricerca comprende l'analisi dei meccanismi molecolari che guidano il profilo di espressione genica dei tumori. Il carcinoma papillare della tiroide è associato alla presenza di diversi oncogeni, tra i quali RET/PTC1. In collaborazione con l'IRCCS Tumori Milano, abbiamo dimostrato che la trasformazione neoplastica di tireociti umani normali, mediata da RET/PTC1 si accompagna all'accensione di decine di geni pro-infiammatori. Questi studi non solo hanno valenza prognostica, ma costituiscono la base razionale di terapie innovative. Il GR Borrello e il GR Canevari hanno analizzato il programma pro-infiammatorio e pro-invasivo indotto da altri tipi di oncogeni aventi un ruolo causale nella patogenesi dei PTC (TRK e BRAF), e in altri tipi di tumori umani quali in carcinoma dell'ovaio. Tra le molecole relate all'infiammazione, sono state trovate interessanti analogie nei diversi tumori studiati, tra alcune coppie di ligandi e recettori, che sono molto espressi nei tumori, tra i quali: chemochine, citochine, fattori di crescita). Questi risultati di "system biology" aiutano a definire quale programma pro-infiammatorio è attivato dai diversi tipi di oncogeni, e più in generale aprono prospettive interessanti per analizzare il signaling tra recettori tirosin-chinasici e chemochine nelle cellule tumorali.

Lo sviluppo e la progressione dei tumori dipende in modo obbligato dal processo di neovascolarizzazione. Un aspetto cruciale di questo programma, condotto all'ITB, è l'identificazione dei circuiti molecolari dell'angiogenesi, che meglio si prestino quali bersaglio di interventi terapeutici. Il circuito del VEGF e dei recettori VEGF-R1 e R2, studiato dal GR Vacca, rappresenta un bersaglio primario, insieme ad altre molecole più innovative quali il PDGF-BB. In particolare si sono studiati composti farmacologici per dimostrarne l'attività anti-angiogenetica e anti-tumorale su linee di mieloma multiplo e su cellule endoteliali. Tra i composti studiati, l'acido zolendronico, la talidomide, un inibitore del proteosoma (bortezomib), inibitori di recettori tirosin-chinasici (dasatinib). L'acido zolendronico riduce in modo significativo la produzione di VEGF e la capillarogenesi. Bortezomib riduce sia VEGF che IL-6, inoltre Dasatinib modula VEGF riducendo l'auto fosforilazione di PDGFR $\beta$ .

Il ruolo dei mastociti e degli enzimi triptasi e chimasi come mediatori positivi dell'angiogenesi nelle metastasi epatiche è oggetto di studio dell'UO Ranieri. È stato messo a punto un modello sperimentale per studiare il ruolo dei mastociti *in vivo* nell'angiogenesi tumorale. Questo modello permette di definire i meccanismi molecolari del funzionamento degli enzimi triptasi e chimasi nell'angiogenesi, e di caratterizzare l'adeguatezza dell'enzima triptasi

come possibile marcatore biologico dell'attività angiogenetica del tumore. È possibile inoltre caratterizzare composti farmacologici con attività modulatrice dei circuiti dell'angiogenesi. Queste informazioni costituiscono un'importante base razionale per futuri approcci terapeutici nei tumori umani.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del progetto Nuove molecole dell'infiammazione: trasferimento dal laboratorio al letto del paziente**

<b>Proponente</b> ( <i>Cordinatore del progetto</i> )	<b>UO</b> ( <i>ente di appartenenza: responsabile</i> )	<b>Gruppi di ricerca afferenti</b>	<b>Responsabile scientifico del gruppo</b>
Humanitas ( <i>Alberto Mantovani</i> )	UO1 (Humanitas: Alberto Mantovani)	Humanitas	Alberto Mantovani
		Humanitas	Luigi Laghi
		Humanitas	Marco Montorsi
		Centro M. Tettamanti	Andrea Biondi
		Ospedali Riuniti di Bergamo	Alessandro Rambaldi
		HSR	Angelo Manfredi
		Università di Roma Tor Vergata	Sabina Pucci
		INT	Silvana Canevari
		INT	Maria Grazia Borrello
		ITB	Girolamo Ranieri
	UO3 (ITB: Girolamo Ranieri)	Università di Bari	Angelo Vacca

## Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18(1):3-10.
2. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 2008;222:155-61.
3. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66(1):1-9.
4. Biagi E, Col M., Migliavacca M, Dell'Oro M, Silvestri D, Montanelli A, Peri G, Mantovani A, Biondi A and Rossi MR. PTX3 as a potential novel tool for the diagnosis and monitoring of pulmonary fungal infections in immuno-compromised pediatric patients. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008;30(12):881-5.
5. Bonanno E, Rulli F, Galatà G, Pucci S, Sesti F, Farinon AM, Spagnoli LG. Stool test for colorectal cancer screening: what is going on? *Surg Oncol* 2007;16:S43-5.
6. Borrello MG, Degl'innocenti D, Pierotti MA. Inflammation and cancer: the oncogene-driven connection. *Cancer Lett* 2008 267:262-70.



7. Coluccia AML, Cirulli T, Neri P, Manieri D, Colanardi MC, Gnoni A, Di Renzo N, Tassone P, Ribatti D, Dammacco F, Gambacorti-Passerini C, Vacca A. Validation of PDGFR $\beta$  and c-Src tyrosine kinases as tumor/vessel targets in patients with multiple myeloma: preclinical efficacy of the novel, orally available inhibitor dasatinib (BMS-354825/Sprycel®). *Blood* 2008;112:1346-56.
8. Manfredi AA, Capobianco A, Esposito A, De Cobelli F, Canu T, Monno A, Raucci A, Sanvito F, Doglioni C, Nawroth PP, Bierhaus A, Bianchi ME, Rovere-Querini P, Del Maschio A. Maturing dendritic cells depend on RAGE for *in vivo* homing to lymph nodes. *J Immunol* 2008;180(4):2270-5.
9. Manfredi AA, Rovere-Querini P, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A. Pentraxins, humoral innate immunity and tissue injury. *Curr Opin Immunol* 2008;20(5):538-44.
10. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008 24;454(7203):436-44.
11. Marchesi F, Piemonti L, Fedele G, Destro A, Roncalli M, Albarello L, Doglioni C, Anselmo A, Doni A, Bianchi P, Laghi L, Malesci A, Cervo L, Malosio ML, Reni M, Zerbi A, Di Carlo V, Mantovani A, and Allavena P. The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2008;68:(21). 9060-9.
12. Passantino L, Passantino G, Cianciotta A, Ribaud MR, Lo Presti G, Ranieri G, Perillo A. Expression of proto-oncogene C-kit and correlation with morphological evaluations in canine cutaneous mast cell tumors. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2008;30(3):609-21.
13. Patruno R, Arpaia N, Gadaleta CD, Passantino L, Zizzo N, Misino A, Lucarelli NM, Catino A, Valerio P, Ribatti D, Ranieri G. VEGF concentration from plasma activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. *J Cell Mol Med.* 2008 Apr 18. [Epub ahead of print]
14. Pucci S, Mazzarelli P, Sesti F, Boothman DA, Spagnoli LG. Interleukin-6 affects prosurvival and cell death escaping mechanisms, acting on Clusterin $\alpha$  interactions in colon carcinogenesis. (inviato per la pubblicazione, 2008)
15. Pucci S, Sesti F, Mazzarelli P, Bonanno E, Spagnoli LG. Clusterin in stool: a new biomarker for colon cancer screening? (inviato per la pubblicazione, 2008)
16. Rella A, Patruno R, Celano G, Valerio P, Gadaleta-Caldarola G, Catino A, Fazio V, Gadaleta CD, Ranieri G. Mast cell tryptase density correlates to angiogenesis in female breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 2008;26(15S):22100.
17. Rella A, Patruno R, Celano G, Valerio P, Gadaleta-Caldarola G, Catino A, Fazio V, Gadaleta CD, Ranieri G. Mast cell positive to tryptase may play a role in female breast cancer angiogenesis. *Annals of Oncology* 2008;19(Supplement5):v130-v132.
18. Ria R, Piccoli C, Cirulli T, Falzetti F, Mangialardi G, Guidolin D, Tabilio A, Di Renzo N, Guarini A, Ribatti D, Dammacco F, Vacca A. Endothelial differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells from patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2008;14:1678-85.
19. Ribatti D, Maruotti N, Nico B, Longo V, Mangieri D, Vacca A, Cantatore FP. Clodronate inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Oncology Rep* 2008;19:1109-112.
20. Roccaro AM, Leleu X, Blotta S, Burwik N, Vacca A, Russo D, Ghobrial IM. Waldenström macroglobulinemia: new therapeutic options. *Cancer Therapy* 2008;6:227-38.
21. Scavelli C, Di Pietro G, Cirulli T, Coluccia M, Boccarelli A, Giannini T, Mangialardi G, Bertieri R, Coluccia AML, Ribatti D, Dammacco F, Vacca A. Zoledronic acid impacts over-angiogenic phenotype of endothelial cells in patients with multiple myeloma. *Mol Cancer Therapeut* 2007;6:3256-62.

22. Scavelli C, Nico B, Cirulli T, Ria R, Di Pietro G, Mangieri D, Bacigalupo A, Mangialardi G, Coluccia AML, Caravita T, Molica S, Ribatti D, Dammacco F, Vacca A. Vasculogenic mimicry by bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *Oncogene* 2008;27:663-74.
23. Sesti F, Mazzarelli P, Bonanno E, Pucci S, Spagnoli LG. Immunodosage of clusterin for colon cancer detection: technical advances. (inviato per la pubblicazione)

# BASE MOLECOLARE DELLE MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE E SVILUPPO DI NUOVE TERAPIE

Mario Cazzola

Clinica Ematologica, Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia

## Base di partenza e razionale

Le malattie mieloproliferative croniche comprendono la leucemia mieloide cronica, la policitemia vera, la trombocitemia essenziale e la mielofibrosi idiopatica. Questi disordini sono caratterizzati da proliferazione clonale di cellule emopoietiche, eccessiva produzione di cellule ematiche con complicanze secondarie, instabilità genomica delle cellule clonali e variabile tendenza alla trasformazione blastica terminale. Mentre la base molecolare della leucemia mieloide cronica Philadelphia-positiva è nota da tempo, poco si sapeva fino a due anni fa circa le altre condizioni morbose, che vengono complessivamente definite malattie mieloproliferative croniche *Philadelphia-negative*. Partendo da un'anomalia cromosomica (disomia uniparentale del cromosoma 9p), abbiamo studiato e ristretto la regione cromosomica di perdita di eterozigotità, identificando un gene candidato, JAK2, che codifica per una proteina importante per la trasduzione del segnale indotto dai fattori di crescita emopoietici. Abbiamo sequenziato il gene JAK2 in diversi pazienti con malattia mieloproliferativa cronica e abbiamo individuato in una parte dei casi un'unica mutazione somatica, la mutazione JAK2 (V617F). JAK2 (V617F) è una "gain-of-function mutation", in quanto la proteina jak2 mutata trasduce più efficientemente il segnale indotto dal legame dei fattori di crescita ai loro specifici recettori (eritropoietina, G-CSF, trombopoietina) e riduce l'apoptosi delle cellule emopoietiche. Abbiamo poi definito il seguente modello patogenetico multifasico: a) primo evento: mutazione somatica spontanea JAK2 (V617F) e proliferazione clonale di una cellula emopoietica eterozigote; b) secondo evento: ricombinazione mitotica in una cellula emopoietica eterozigote per JAK2 (V617F), perdita di eterozigotità del cromosoma 9p ed espansione di un clone di cellule omozigoti per JAK2 (V617F).

Nonostante numerosi lavori recenti, rimane da definire il ruolo preciso di JAK2 (V617F) nella patogenesi delle malattie mieloproliferative croniche, e in particolare si deve capire come una singola mutazione si associ a fenotipi clinici diversi. Si sa inoltre che nei pazienti JAK2 (V617F)-negativi possono riscontrarsi sia altre mutazioni di JAK2 sia mutazioni attivanti del gene MPL, che codifica per il recettore della trombopoietina. Infine, è di fondamentale importanza sviluppare nuove molecole che siano in grado di agire a livello dei meccanismi patogenetici molecolari, vale dire delle proteine jak2 ed mpl mutanti.

La mielofibrosi idiopatica (*Idiopathic Myelofibrosis*, IM) è una malattia mieloproliferativa caratterizzata da fibrosi del midollo, osteopetrosi, neo-angiogenesi ed estensiva ematopoiesi extramidollare. Sono stati sviluppati due modelli animali della malattia. Il primo modello è rappresentato da topi che sono stati soggetti a manipolazioni che aumentano i livelli *in vivo* di trombopoietina (TPO) (topi TPO<sup>high</sup>), il fattore di crescita che regola la megacariocitopoiesi. Infatti, sia topi transgenici per TPO che animali trapiantati con cellule staminali infettate con un retrovirus che contiene il gene per la TPO umana, o ancora, animali trattati sistematicamente con questo fattore di crescita, sviluppano tutti una sindrome simile alla IM e muoiono per le

conseguenze della malattia in 2-3 mesi. Il secondo modello è rappresentato da animali geneticamente modificati in modo da esprimere bassi livelli del fattore di trascrizione Gata1, mediante delezione del primo enhancer e del promotore distale del gene (topi Gata1low). Questi mutanti sono vitali alla nascita ma i neonati sono trombocitopenici e anemici. Gli animali recuperano dall'anemia a 3-4 settimane dalla nascita ma rimangono trombocitopenici per tutta la vita a causa di un blocco nella maturazione dei megacariociti (MK) in pro-piastrine, con conseguente accumulo di MK nel midollo. Questi mutanti sviluppano una sindrome simile alla IM nell'uomo caratterizzata dalla presenza di anemia, emazie a goccia e progenitori emopoietici in circolo, fibrosi midollare e foci di ematopoiesi nel fegato dopo 15 mesi. La storia naturale di questi animali, permette di definire almeno tre fasi distinte dello sviluppo della malattia. Una fase pre-sintomatica (da 1 a 6 mesi di età), una fase iniziale (8-12 mesi), in cui la malattia può essere documentata solo istologicamente, e una fase mielofibrotica (15 mesi alla morte naturale), in cui gli animali sviluppano tutti i tratti della malattia umana. La causa genetica dell'insorgenza della IM nell'uomo non è ancora chiara. Infatti, la mutazione V617FJak2, che risulta in una forma della proteina incapace di disattivarsi dopo aver tradotto il segnale, la cui presenza caratterizza le malattie mieloproliferative, è stata identificata in 30-50% dei pazienti con IM. Jak2 rappresenta il primo elemento del segnale di traduzione della TPO. In questo senso, quindi, la presenza della mutazione V617FJak2 è funzionalmente equivalente alla mutazione TPOhigh. In contrasto, mutazioni nel gene Gata1 non sono state identificate fino ad ora in pazienti con IM. Tuttavia, i livelli della proteina GATA-1 negli MK di questi pazienti sono chiaramente ridotti.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Nei prossimi tre anni condurremo ricerche finalizzate a raggiungere i seguenti obiettivi. Innanzitutto, svilupperemo metodi che forniscano una valutazione quantitativa della percentuale di alleli JAK2 (V617F), utilizzando sia la PCR quantitativa sia la tecnologia dei microchip. Utilizzando queste tecnologie cercheremo poi altre mutazioni attivanti di JAK2 e di MPL nei pazienti JAK2 (V617F)-negativi. Studieremo in particolare inibitori di TGF-beta nel modello murino GATA-1low della mielofibrosi. A partire dal terzo anno condurremo trial clinici di fase I-II per valutare l'efficacia clinica di nuove molecole aventi attività contro le proteine jak2 ed mpl mutanti, e di molecole capaci di inibire TGF-beta.

I principali obiettivi del progetto di ricerca sono elencati di seguito:

- sviluppo di metodi efficienti che forniscano una valutazione quantitativa della percentuale di alleli JAK2 (V617F), utilizzando in particolare la PCR quantitativa e la tecnologia dei microchip;
- utilizzo di dati molecolari per stabilire correlazioni fra genotipo (stato mutazionale di JAK2 e di MPL, proporzione di cellule emopoietiche interessate) e fenotipo, ovvero alterazioni ematologiche e quadro clinico, con l'obiettivo di arrivare ad una classificazione molecolare delle malattie mieloproliferative croniche;
- sviluppo di modelli murini transgenici di malattia mieloproliferativa basati sulla specifica lesione genica finalizzati al loro uso per testare potenziali farmaci anti-JAK2;
- studio di nuove molecole che possano essere efficaci nel sopprimere i cloni mieloproliferativi attraverso un'azione inibitoria nei confronti delle proteine jak2 ed mpl mutanti, e loro valutazione sia in modelli cellulari che in modelli murini;
- attivazione (a partire dal terzo anno) di trial clinici di fase I-II per valutare l'efficacia di nuove molecole aventi attività anti-jak2 e anti-mpl e di molecole capaci di inibire TGF-beta.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Nel corso del primo anno sono state condotte le ricerche e sono stati ottenuti i risultati descritti di seguito.

Uno degli obiettivi prioritari di questo progetto di ricerca era quello di sviluppare metodi efficienti per valutare quantitativamente la percentuale di alleli JAK2 (V617F) e di sviluppare nuovi metodi per identificare altre mutazioni di JAK2 e mutazioni di MPL. Nel corso del primo anno abbiamo utilizzato a questo proposito PCR (*Polimerase Chain Reaction*) quantitativa, microchip e *High Resolution Melting*, in particolare per analizzare le mutazioni di MPL. Il lavoro che descrive queste ultime indagini verrà presentato al prossimo meeting dell'*American Society of Hematology* ("Loss of heterozygosity of chromosome 1p34 and high mutant allele burden in patients with post-essential thrombocythemia myelofibrosis carrying somatic mutations of MPL"). Un metodo per la ricerca delle mutazioni MPL (W515L) e MPL (W515K) basato sulla PCR quantitativa è stato già pubblicato sul *Journal of Molecular Diagnosis* (Pancrazzi *et al.*, 2008). I pazienti affetti da trombocitemia essenziale e portatori della mutazione MPL (W515L) o di quella MPL (W515K) tendono ad essere più anemici, ad avere una trombocitosi più marcata e a manifestare più frequentemente disturbi del microcircolo (Vannucchi *et al.*, 2008).

Utilizzando vari approcci, abbiamo ricercato mutazioni di JAK2 in pazienti affetti da policitemia vera che non presentavano la mutazione classica JAK2 (V617F). Abbiamo identificato varie mutazioni dell'esone 12 di JAK2: V536-I546dup11, F537-K539delinsL, F537-I546dup10+F547L, H538-K539delinsL, I540-E543delinsMK, R541-E543delinsK, N542-E543del ed E543-D544del.

Tali mutazioni sono associate ad un basso carico di alleli mutanti nei granulociti circolanti e non comportano quasi mai perdita di eterozigosità del cromosoma 9p. Le suddette mutazioni dell'esone 12 di JAK2 si associano ad una malattia mieloproliferativa caratterizzata da isolata eritrocitosi con bassi livelli di eritropoietina sierica. Queste osservazioni consentono di stabilire correlazioni fra genotipo (stato mutazionale di JAK2) e fenotipo (alterazioni ematologiche e quadro clinico), e sono di fondamentale importanza per arrivare ad una classificazione molecolare delle malattie mieloproliferative croniche. Il lavoro è stato pubblicato su *Blood* (Pietra *et al.*, 2008).

Abbiamo definito le caratteristiche cliniche delle malattie mieloproliferative croniche familiari, quantificando l'incidenza della mutazione somatica JAK2 (V617F), documentando l'accorciamento progressivo dei telomeri e dimostrando un fenomeno di anticipazione dell'esordio clinico. Il lavoro è stato pubblicato sul *Journal of Clinical Oncology* (Rumi *et al.*, 2007).

L'abnorme angiogenesi gioca un ruolo importante nelle malattie mieloproliferative croniche. La valutazione della densità microvascolare (microvessel density) sulla biopsia ossea è risultata strettamente correlata al carico mutazionale JAK2 (V617F). Tale lavoro è stato pubblicato sul *British Journal of Haematology* (Boveri *et al.*, 2008).

Al fine di definire la prognosi individuale e quindi di identificare i pazienti affetti da malattia mieloproliferativa che potrebbero beneficiare maggiormente di terapie sperimentali, abbiamo sviluppato un modello dinamico per predire la sopravvivenza di pazienti affetti da mielofibrosi post-policitemia vera. Tale modello utilizza emoglobina (<10 g/dL), conta piastrinica (<100x10<sup>9</sup>/L) e conta leucocitaria (>30x10<sup>9</sup>/L) quali fattori di rischio. I pazienti che hanno tutti i tre fattori di rischio hanno un'aspettativa di vita inferiore ad un anno, mentre i pazienti con un

solo fattore o senza alcun fattore di rischio hanno un'aspettativa mediana di vita superiore a 5 anni. Tale lavoro è stato pubblicato su *Blood* (Passamonti *et al.*, 2008).

Uno studio condotto su una coorte di 605 pazienti affetti da trombocitemia essenziale ha dimostrato che in questi pazienti il rischio di evoluzione in mielofibrosi è pari al 2,8% a 10 anni, mentre quello di evoluzione in leucemia acuta è pari al 2,6% a 10 anni; per contro il rischio di trombotosi è pari al 14% a 10 anni. Tale lavoro è stato pubblicato su *Haematologica* (Passamonti *et al.*, 2008).

Uno studio condotto su una coorte di 304 pazienti affetti da mielofibrosi idiopatica ha dimostrato che la mutazione JAK2 (V617F) era presente nel 63% dei casi. Nessuno dei pazienti negativi è diventato positivo durante il periodo di osservazione, mentre una parte dei pazienti positivi che presentava un pattern di eterozigotità per la mutazione ha sviluppato in seguito un pattern di omozigotità. La positività per JAK2 (V617F) rappresentava un fattore predittivo indipendente di evoluzione in leucemia acuta. Tale lavoro è stato pubblicato su *Blood* (Barosi *et al.*, 2007). Il gene CXCR4 è poco espresso nei pazienti affetti da mielofibrosi idiopatica, e questo contribuisce all'eccessiva mobilitazione delle cellule staminali CD34+: uno studio *ad hoc* ha dimostrato che il promoter di tale gene è frequentemente ipermetilato in questi pazienti (Vannucchi *et al.*, 2008).

Il Dott. Barosi ha coordinato un gruppo di esperti internazionali\* che ha definito i criteri per la diagnosi di mielofibrosi post-policitemia vera e di mielofibrosi post-teombocitemia essenziale (Barosi *et al.*, 2008).

Il Dott. Barosi e il Dott. Passamonti hanno esaminato criticamente e definito la sopravvivenza e i fattori prognostici dei pazienti affetti da malattie mieloproliferative croniche (Cervantes *et al.*, 2008).

L'asse CXCR4/SDF-1 è stato studiato nel topo Gata1low, che rappresenta un modello murino di mielofibrosi idiopatica (Vannucchi *et al. Blood* 2002;100(4):1123-32). Tanto nel topo Gata1low che nei pazienti affetti da mielofibrosi idiopatica i livelli sierici di SDF-1 sono risultati elevati; inoltre la proteina SDF-1 tendeva ad aumentare nel midollo osseo. Queste osservazioni suggeriscono che tali anomalie dell'asse CXCR4/SDF-1 sono responsabili dell'abnorme ricircolo di cellule staminali presente sia nei pazienti che nel modello murino di mielofibrosi idiopatica. Tale lavoro è stato pubblicato su *Experimental Hematology* (Migliaccio *et al.*, 2008).

Mpl, il recettore della trombopoietina, è espresso sui mastociti, e la delezione di Mpl aumenta la differenziazione dei mastociti nel topo (Migliaccio *et al. Ann NY Acad Sci* 2007;1106:152-74). Nel corso di questo progetto di ricerca abbiamo dimostrato che la somministrazione di trombopoietina induce l'apoptosi dei mastociti in modelli murini (Martelli *et al.*, 2008).

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

---

\* International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT): Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, Dupriez B, Levine RL, Passamonti F, Gotlib J, Reilly JT, Vannucchi AM, Hanson CA, Solberg LA, Orazi A, Tefferi A.

**Tabella 1. Articolazione del progetto Base molecolare delle malattie mieloproliferative croniche e sviluppo di nuove terapie**

<b>Proponente</b> ( <i>Cordinatore del progetto</i> )	<b>UO</b> ( <i>ente di appartenenza: responsabile</i> )	<b>Gruppi di ricerca afferenti</b>	<b>Responsabile scientifico del gruppo</b>
S. Matteo ( <i>Mario Cazzola</i> )	UO 1 (San Matteo: Mario Cazzola)	San Matteo	Mario Cazzola
		San Matteo	Mario Lazzarino
		San Matteo	Giovanni Barosi
		Experimental Hematology, Basel	Radek Skod
	UO 2 (ISS: Anna Rita Migliaccio)	ISS	Anna Rita Migliaccio
		Università di Chieti	Rosa Alba Rana

## Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, Massa M, Rosti V, Campanelli R, Villani L, Viarengo G, Gattoni E, Gerli G, Specchia G, Tinelli C, Rambaldi A, Barbui T; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Italian Registry of Myelofibrosis. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* 2007;110(12):4030-6.
2. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, Dupriez B, Levine RL, Passamonti F, Gotlib J, Reilly JT, Vannucchi AM, Hanson CA, Solberg LA, Orazi A, Tefferi A; International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia* 2008;22(2):437-8.
3. Bergamaschi GM, Primignani M, Barosi G, Fabris FM, Villani L, Reati R, Dell'era A, Mannucci PM. MPL and JAK2 exon 12 mutations in patients with the Budd-Chiari syndrome or extrahepatic portal vein obstruction. *Blood* 2008;111(8):4418.
4. Bogani C, Ponziani V, Guglielmelli P, Desterke C, Rosti V, Bosi A, Le Bousse-Kerdilès MC, Barosi G, Vannucchi AM; Myeloproliferative Disorders Research Consortium. Hypermethylation of CXCR4 promoter in CD34+ cells from patients with primary myelofibrosis. *Stem Cells* 2008;26(8):1920-30.
5. Boveri E, Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Arcaini L, Pascutto C, Castello A, Cazzola M, Magrini U, Lazzarino M. Bone marrow microvessel density in chronic myeloproliferative disorders: a study of 115 patients with clinicopathological and molecular correlations. *Br J Haematol* 2008;140(2):162-8.
6. Cervantes F, Passamonti F, Barosi G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2008;22(5):905-14.
7. Martelli F, Ghinassi B, Lorenzini R, Vannucchi AM, Rana RA, Nishikawa M, Partamian S, Migliaccio G, Migliaccio AR. Thrombopoietin inhibits murine mast cell differentiation. *Stem Cells* 2008;26(4):912-9.
8. Migliaccio AR, Martelli F, Verrucci M, Migliaccio G, Vannucchi AM, Ni H, Xu M, Jiang Y, Nakamoto B, Papayannopoulou T, Hoffman R. Altered SDF-1/CXCR4 axis in patients with

- primary myelofibrosis and in the Gata1 low mouse model of the disease. *Exp Hematol* 2008;36(2):158-71.
9. Pancrazzi A, Guglielmelli P, Ponziani V, Bergamaschi G, Bosi A, Barosi G, Vannucchi AM. A sensitive detection method for MPLW515L or MPLW515K mutation in chronic myeloproliferative disorders with locked nucleic acid-modified probes and real-time polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2008;10(5):435-41.
  10. Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, Boveri E, Elena C, Pietra D, Boggi S, Astori C, Bernasconi P, Varettoni M, Brusamolino E, Pascutto C, Lazzarino M. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica* 2008;93(11):1645-51.
  11. Passamonti F, Rumi E, Caramella M, Elena C, Arcaini L, Boveri E, Del Curto C, Pietra D, Vanelli L, Bernasconi P, Pascutto C, Cazzola M, Morra E, Lazzarino M. A dynamic prognostic model to predict survival in post-polycythemia vera myelofibrosis. *Blood* 2008;111(7):3383-7.
  12. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, Ferrari M, Gisslinger H, Kralovics R, Cremonesi L, Skoda R, Cazzola M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111(3):1686-9.
  13. Rumi E, Passamonti F, Della Porta MG, Elena C, Arcaini L, Vanelli L, Del Curto C, Pietra D, Boveri E, Pascutto C, Cazzola M, Lazzarino M. Familial chronic myeloproliferative disorders: clinical phenotype and evidence of disease anticipation. *J Clin Oncol* 2007;25(35):5630-5.
  14. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, Ruggeri M, Specchia G, Lo-Coco F, Delaini F, Villani L, Finotto S, Ammatuna E, Alterini R, Carrai V, Capaccioli G, Di Lollo S, Liso V, Rambaldi A, Bosi A, Barbui T. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood* 2008;112(3):844-7.



# IMMUNOTERAPIA CON IL PEPTIDE EGFRVII NEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME E IN ALTRI TUMORI SOLIDI

Gaetano Finocchiaro

Unità di Biochimica e Genetica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico “Carlo Besta”, Milano

## Base di partenza e razionale

L'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) è spesso amplificato e mutato in diversi tumori solidi in particolare in gliomi maligni e carcinomi dell'ovaio. Esistono varie forme mutanti di HER1/EGFR, ma la variante III (EGFRvIII) rimane sicuramente la più frequente. EGFRvIII risulta dall'eliminazione degli esoni 2-7 e dalla conseguente delezione *in-frame* di 801 paia di basi nella porzione genica codificante per il dominio extracellulare; ciò determina la mancanza del dominio di legame con il ligando e un'attivazione costitutiva del recettore, che porta ad alterazioni di trascrizione genica e traduzione proteica, tumorigenicità, inibizione dell'apoptosi, adesione, angiogenesi, aumento della motilità cellulare e, in molte linee tumorali, anche radioresistenza. EGFRvIII è considerato un ottimo potenziale target di terapia in quanto esclusivamente espresso nelle cellule tumorali.

L'espressione di EGFR è up-regolata nel 50-60% dei glioblastomi, mentre a livello clinico EGFRvIII è un fattore prognostico negativo negli astrocitomi anaplastici e nei glioblastomi che sopravvivono un anno o più. Per quanto riguarda il carcinoma ovarico l'espressione di EGFRvIII è documentata, mentre il suo ruolo nei carcinomi mammari non è definito in modo univoco. Linee cellulari di carcinoma mammario, infatti, non sembrano esprimere EGFRvIII, mentre 67% dei tumori invasivi sono positivi. Inoltre, in pazienti con carcinoma mammario l'espressione di EGFRvIII in cellule circolanti correla con lo stadio della malattia.

Diversi gruppi di ricerca hanno precedentemente studiato *in vivo* sia la vaccinazione profilattica con EGFRvIII, intesa come l'immunizzazione contro EGFRvIII e la successiva iniezione intracerebrale di cellule tumorali esprimenti EGFRvIII, sia la vaccinazione terapeutica, successiva cioè all'induzione della crescita tumorale. Sono state svolte anche diverse sperimentazioni cliniche per lo studio del potenziale terapeutico di un vaccino che riconosce in modo specifico le cellule tumorali grazie alla loro esclusiva espressione di EGFRvIII. In particolare Heimberger et al. Nel 2006 hanno condotto una sperimentazione su 19 pazienti affetti da GBM di prima diagnosi ed EGFRvIII positivi, dimostrando un significativo incremento di “time to tumor progression” rispetto ai 39 controlli storici ad essi confrontati (12 mesi vs 7,1;  $p=0,0058$ ). Visti i promettenti risultati ottenuti e pubblicati in letteratura, questo progetto intende analizzare l'efficacia del trattamento con CDX-110, un vaccino prodotto dalla Celldex Therapeutics e costituito dalla sequenza di EGFRvIII coniugata a Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) come adiuvante. Lo studio vedrà l'inclusione di pazienti affetti da GBM, o tumore all'ovaio o tumore alla mammella; criterio chiave per l'inclusione nello studio sarà la positività del paziente all'espressione di EGFRvIII, dimostrata per immunostochimica. Vista l'assenza di tossicità del peptide, in questo studio per tutti i pazienti sarà considerato come endpoint primario la risposta immunologica al trattamento in analisi in termini di risposta cellulare e umorale, e come endpoint secondario il tempo alla progressione.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

I promettenti risultati già pubblicati in letteratura sul potenziale terapeutico e l'assenza di effetti avversi significativi del trattamento con CDX-110 ci hanno spinto a selezionare degli obiettivi che indagassero maggiormente il meccanismo di azione di questo farmaco, prendendo solo inizialmente in considerazione gli aspetti di studio della tossicità.

Obiettivo generale del progetto e necessario per il suo sviluppo è l'identificazione e l'arruolamento di soggetti affetti da GBM o tumore all'ovaio o tumore alla mammella e contemporaneamente positivi per l'espressione di EGFRvIII. L'espressione di EGFRvIII sarà valutata mediante tecniche di PCR e/o immunoistochimica utilizzando anticorpi già testati dalla ditta produttrice di CDX-110, la CellDex Therapeutics, e secondo una metodica messa a punto dalla stessa.

Per quanto riguarda la parte di progetto dedicata ai pazienti affetti da GBM, l'obiettivo primario sarà inizialmente la valutazione di diverse dosi di CDX-110 in gruppi di pazienti, e, in un secondo momento, lo studio degli effetti della contemporanea somministrazione di Imiquimod. Imiquimod è un immunomodulatore che potrebbe fungere da ulteriore adiuvante con un'azione di potenziamento del trattamento. Endpoint primario della sperimentazione clinica di fase I-II sarà la risposta immunologica al vaccino in termini di risposta cellulare e umorale, mentre l'endpoint secondario sarà il tempo alla progressione tumorale (*Progression Free Survival*, PFS).

Il progetto prevede anche di studiare l'espressione di EGFRvIII in tumoresfere da GBM e adenocarcinoma mammario.

Obiettivo principale in questo caso sarà la definizione dell'importanza di EGFRvIII per il fenotipo simil-staminale (crescita di tumoresfere; tumorigenicità *in vivo*; potenziale clonale e differenziativi).

Per ciò che concerne invece il trattamento dei tumori della mammella e dell'ovaio, lo studio comincerà con la valutazione su pezzi paraffinati mediante immunoistochimica dell'espressione di EGFRvIII dei pazienti i cui campioni sono conservati nella banca di tessuti dello IEO. Per quanto riguarda i pazienti affetti da tumore al seno l'espressione di EGFRvIII sarà valutata soprattutto in quelli definiti "tripoli negativi", non esprimenti cioè PgR, ER ed Erb-B2. Dopo aver identificato la tipologia di pazienti che potrebbero maggiormente beneficiare del trattamento con CDX-110 (n.=20) e dopo aver ottimizzato le tecniche per la valutazione della loro risposta immunologica (anticorpi e citotossicità), verrà proposta una sperimentazione di fase II con il farmaco di interesse. Si preferiranno pazienti con malattia assente al termine della chemioterapia adiuvante o malattia minima residua dopo un trattamento di prima linea per malattia metastatica. Anche in questo caso, la sperimentazione avrà come endpoint primario la risposta immunologica al vaccino in termini di risposta cellulare e umorale, e come endpoint secondario il tempo alla progressione.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Il progetto si proponeva di studiare l'espressione di EGFRvIII, una variante del recettore EGFR caratterizzata dalla presenza di una delezione degli esoni 2-7 che mantiene un frame di lettura e crea un nuovo epitopo unicamente espresso nelle cellule neoplastiche, in diversi tumori (gliomi maligni, carcinomi ovarici, carcinomi mammari). Il secondo obiettivo era quello di organizzare una sperimentazione di fase I-II basata sull'immunoterapia con un peptide

corrispondente alla sequenza dell'epitopo EGFRvIII, coniugato con l'adiuvante KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*): tale peptide, denominato CDX110, è al momento prodotto dalla azienda statunitense Celldex Therapeutics.

Mentre sullo sviluppo di dati riguardanti l'espressione sono stati fatti progressi lo sviluppo dello studio clinico, per il quale CellDex aveva dato disponibilità al momento della presentazione del progetto stesso, è tuttora in stallo. Il primo problema che si è presentato è relativo alla normativa internazionale per il riconoscimento reciproco tra Italia e USA delle condizioni di produzione in *Good Manufacturing Practice* (GMP), come regolamentato da EMEA. Al momento tale mutuo riconoscimento, possibile per esempio per farmaci prodotti in Canada o in Svizzera, non è operativo con gli USA (vedi sito EMEA <http://www.emea.europa.eu/Inspections/MRA.html>). Si era ipotizzato inizialmente, sulla base di contatti con il Dott. Tom Davis (Senior Vice President e Chief Medical Officer di CellDex), che un sito di produzione Celldex potesse diventare operativo in UK nel 2008. Tuttavia la situazione è evoluta diversamente, in particolare a causa dell'acquisto di Celldex da parte di Pfizer. Il 16 aprile scorso è stato annunciato un accordo che "garantisce a Pfizer la licenza esclusiva mondiale per CDX 110 che è ora in fase II di sviluppo per il trattamento del glioblastoma multiforme. Tale accordo dà anche a Pfizer i diritti in esclusiva per l'uso dei vaccini EGFRvIII in altre potenziali indicazioni" [http://www.celldextherapeutics.com/wt/page/pr\\_1208373813](http://www.celldextherapeutics.com/wt/page/pr_1208373813)

Al momento attuale, nonostante la rinnovata disponibilità alla collaborazione offerta dal Dott. Tom Davis, la possibilità di una sperimentazione con CDX110 in Italia è legata ad un possibile accordo con Pfizer. Lo sviluppo della parte clinica del progetto può quindi prendere due strade:

- verificare con Pfizer Italia i tempi di un possibile sviluppo in Italia e/o Europa della sperimentazione di fase II-III attualmente in corso negli USA per i pazienti affetti da GBM;
- valutare la produzione in Europa del peptide EGFRvIII. Trattandosi di una sintesi a scopo di ricerca clinica non dovrebbero esserci problemi di brevetto ad ostacolare questa possibilità. La ditta BACHEM ([www.bachem.com](http://www.bachem.com)), in particolare, può sintetizzare su richiesta peptidi preparati in condizione GMP. Una richiesta molto preliminare ha verificato tale possibilità anche se problemi potrebbero essere presenti per la coniugazione con KLH. Potrebbe quindi essere ipotizzata la possibilità di una sintesi esclusiva del peptide e la definizione di una alternativa per quanto riguarda l'uso dell'adiuvante.

Accanto a questo, la letteratura recente offre basi razionali per considerare un trattamento aggiuntivo basato su cetuximab (Fukai *et al. Cancer Sci* 2008;99:2062-9; Martens *et al. Clin Cancer Res* 2008;14:5447-58; Patel *et al. Anticancer Res* 2007;27:3355-66) per pazienti con recidiva di GBM e presenza di EGFRvIII. Cetuximab è un anticorpo monoclonale chimerico IgG1 specificamente diretto contro EGFR.

Cetuximab si lega all'EGFR con un'affinità che è circa 5-10 volte più alta di quella dei ligandi endogeni. Cetuximab blocca il legame con i ligandi endogeni dell'EGFR, inibendo così la funzione del recettore. Esso inoltre induce l'internalizzazione dell'EGFR, il che può provocare la down-regulation dell'EGFR stesso. Cetuximab inoltre indirizza le cellule immunitarie effettrici citotossiche verso le cellule tumorali che esprimono l'EGFR (citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente: *Antibody Dependent Cell Cytotoxicity*, ADCC).

Cetuximab (Erbix™, Merck) è al momento in studio con un protocollo di fase I-II per pazienti affetti da GBM, alla prima diagnosi e in associazione con temozolamide ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov); identifier NCT00311857).

Una sperimentazione con cetuximab in pazienti con recidiva di GBM e presenza di EGFRvIII potrebbe essere implementata nel corso del 2009.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del progetto Immunoterapia con il peptide EGFRvIII nel glioblastoma multiforme ein altri tumori solidi**

<b>Proponente</b> <i>(Cordinatore del progetto)</i>	<b>UO</b> <i>(ente di appartenenza: responsabile)</i>	<b>Gruppi di ricerca afferenti</b>	<b>Responsabile scientifico del gruppo</b>
Besta <i>(Gaetano Finocchiaro)</i>	UO1 <i>(Besta: Gaetano Finocchiaro)</i>	Besta	Gaetano Finocchiaro
		Besta	Amerigo Boiardi
		Besta	Renato Mantegazza
		Besta	Maria Grazia Bruzzone
	UO2 <i>(IEO: Maria Rescigno)</i>	IEO	Maria Rescigno
		IEO	Giuseppe Viale
		IEO	Giuseppe Curigliano
		IEO	Nicoletta Colombo
		IRE	Carmine M. Carapella
		IRE	Antonello Vidiri
		IRE	Anna Cianciulli
		Università degli studi Sapienza di Roma	Felice Giangaspero, Mario Piccoli

# SVILUPPO VACCINI IDIOTIPICI PER STUDI DI FASE I-II DI IMMUNOTERAPIA “SUBSET SPECIFICA” PER PAZIENTI CON DISORDINI LINFOPROLIFERATIVI A CELLULE B

Riccardo Dolcetti

Dipartimento di Oncologia Medica, Centro di Riferimento Oncologico, Aviano

## Base di partenza e razionale

I linfomi non-Hodgkin (*Non-Hodgkin Lymphoma*, NHL) costituiscono un gruppo eterogeneo di tumori, la cui incidenza è aumentata nelle ultime decadi, rimanendo una significativa frazione di casi incurabile. Le forme a basso grado di malignità mostrano frequentemente recidive alla chemioterapia e una prognosi infausta. Queste evidenze, insieme alla tossicità dei trattamenti standard, stimolano lo sviluppo di nuove terapie per un miglior controllo di tali neoplasie.

Vaccini che abbiano come bersaglio l'idiotipo (Id) di linfomi/leucemie a cellule B rappresentano un approccio immunoterapeutico promettente che potrebbe consentire un miglior controllo clinico di tali neoplasie e con minore tossicità rispetto alle terapie convenzionali. Questa strategia è basata sull'osservazione che le immunoglobuline (Ig) clonotipiche espresse da linfociti B neoplastici presentano determinanti unici che possono fungere da antigeni tumore-specifici. In modelli murini, i vaccini idiotipici si sono dimostrati in grado di indurre risposte immuni protettive, mentre studi clinici condotti su pazienti con linfoma hanno dimostrato che vaccini idiotipici ricombinanti o cellule dendritiche pulsate con Id paziente-specifici possono indurre risposte citotossiche tumore-specifiche clinicamente significative, con tossicità contenuta. Tuttavia, il largo impiego di tali vaccinazioni è ostacolato dal fatto che i vaccini devono essere prodotti singolarmente e in maniera individualizzata per ciascun paziente, con una notevole complessità di produzione e costi difficilmente sostenibili. La caratterizzazione molecolare di vari istotipi di neoplasie linfoidi ha recentemente fornito evidenze che suggeriscono come tali limitazioni possano essere superate. Infatti, è stato dimostrato che vari istotipi di neoplasie a cellule B possono utilizzare gli stessi segmenti genici Ig, suggerendo che la condivisione di Id simili tra neoplasie di diversi pazienti sia più frequente di quanto ritenuto in passato. In particolare, circa il 20-25% delle leucemie linfatiche croniche (CLL) esprimono, sulla superficie cellulare della loro componente neoplastica, combinazioni “stereotipate” di IgH/IgL con sequenze omologhe anche a livello delle regioni ipervariabili (HCDR3) delle IgH. Studi precedenti del DI proponente hanno dimostrato che la proteina VK3-20, frequentemente espressa in B-NHL HCV-associati, è immunogenica in sistemi *ex vivo* ed è in grado di indurre risposte citotossiche specifiche nei riguardi di proteine VK correlate e utilizzate anche da altre forme di linfoma/leucemia a cellule B. Ciò fornisce un solido razionale per lo sviluppo di vaccini ricombinanti che utilizzino Id condivisi da differenti neoplasie a cellule B.

Oltre all'attivazione di uno studio di fase I-II basato sull'utilizzo della proteina VK3-20 quale vaccino per il trattamento di linfomi esprimenti catene leggere molecolarmente correlate, il progetto consentirà di identificare e caratterizzare dal punto di vista immunologico altre Ig idiotipiche condivise da sottogruppi di neoplasie linfoidi, particolarmente le forme indotte e/o sostenute da una stimolazione antigenica cronica. Ciò consentirà di definire lo spettro di neoplasie linfoidi per le quali disegnare e attivare strategie di immunoterapia “cross-reattiva”.

Il progetto prevede inoltre la definizione dell'entità delle risposte T memoria specifiche in donatori e pazienti con linfoma e l'identificazione/validazione degli epitopi CTL presentati dai più comuni alleli HLA di classe I, finalizzati allo sviluppo di saggi per un preciso monitoraggio delle risposte immuni epitopo-specifiche. Il potenziale terapeutico di tali vaccini e del trasferimento adottivo di CTL specifici verranno definiti in modelli animali. Gli approcci diagnostici e terapeutici innovativi derivanti dal trasferimento in campo clinico dei risultati ottenuti saranno rilevanti anche per quanto riguarda disordini linfoproliferativi monoclonali pre-linfomatosi (crioglobulinemia mista di tipo II). Infatti, la possibile applicazione di schemi di vaccinazione preventiva con Ig idiotipiche ricombinanti "subset-specifiche" potrebbe rivelarsi di notevole importanza al fine di impedire o ritardare l'evoluzione di tali forme verso il linfoma maligno conclamato.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi primari del progetto sono:

- attivazione di uno studio di fase I-II basato sull'utilizzo della proteina idiotipica VK3-20 quale vaccino per il trattamento di linfomi a basso grado di malignità esprimenti catene leggere molecolarmente correlate;
- sviluppo di nuovi vaccini idiotipici ricombinanti da applicarsi in schemi di immunoterapia "subset-specifica" per disordini linfoproliferativi.

Obiettivi secondari del progetto sono:

- identificazione di sottogruppi di neoplasie linfoidi caratterizzati dall'espressione di Ig clonotipiche ad elevata omologia di sequenza;
- definizione delle proprietà immunogeniche di Ig clonotipiche "subset-specifiche" sia *in vitro* che in modelli animali finalizzata allo sviluppo di vaccini terapeutici e preventivi;
- sviluppo di nuovi modelli preclinici atti alla valutazione della crescita *in vivo* di neoplasie linfoidi B mediante l'ingegnerizzazione di linee neoplastiche con proteine fluorescenti e monitoraggio mediante *optical imaging*;
- sviluppo di saggi per il monitoraggio di risposte immuni Id-specifiche in pazienti affetti da linfomi/leucemie di interesse, con particolare riferimento ai pazienti arruolati nello studio clinico;
- definizione del ruolo adiuvante di nuovi approcci con siRNA in grado di inibire hTERT allo scopo di potenziare l'attività apoptotica e incrementare l'effetto della immunoterapia;
- produzione GMP (*Good Manufacturing Practice*) di Ig clonotipiche ricombinanti e disegno di ulteriori studi clinici di fase I-II basati sull'utilizzo di tali proteine per scopi vaccinali;
- definizione della capacità di Ig clonotipiche ricombinanti di indurre risposte immuni specifiche *ex vivo* in pazienti con infezione da HCV;
- produzione di anticorpi monoclonali rivolti contro epitopi condivisi delle Ig clonotipiche "subset-specifiche" di possibile utilizzo in diagnostica e terapia;
- definizione delle modalità di elisione cellulare indotte dagli effettori immuni Id-specifici nei confronti di cellule di linfoma/leucemia;
- sviluppo di un sistema di valutazione morfo-fenotipico in cellule dendritiche per il monitoraggio dell'attivazione dell'immunità specifica acquisita;
- sviluppo di un gene-chip atto alla definizione della tipologia della risposta immunitaria indotta dal vaccino da applicarsi in campo clinico per valutarne il possibile valore predittivo della risposta clinica.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Il presente progetto si prefigge quale obiettivo primario l'attivazione di uno studio di fase I-II basato sull'utilizzo della proteina idiopica VK3-20 quale vaccino per il trattamento di linfomi a basso grado di malignità esprimenti catene leggere molecolarmente correlate. Nei primi 12 mesi, grazie all'attività integrata delle varie UO afferenti sono state ottenute evidenze pre-cliniche rilevanti a supporto dell'applicazione in campo clinico di tale approccio vaccinale. In particolare:

- L'immunogenicità *ex vivo* di VK3-20 e VK3-15 è stata confermata in un'ampia serie di donatori. È stato possibile ottenere sia cellule T CD4+ che CD8+ in grado di riconoscere e lisare specificamente le cellule bersaglio, un aspetto di notevole rilevanza applicativa.
- Una proteina VK3-20 prototipica induce risposte T cellulari cross-reattive rispetto a VK3-20 derivate da altri linfomi e anche nei confronti della proteina correlata VK3-15.
- CTL VK3-20-specifici uccidono in modo antigene-specifico e HLA-A\*02-ristretto linee di linfoma sia VK3-20+ (DG75) che VK3-15+ (LCL SH9) indicando che tali proteine sono naturalmente processate in cellule linfoidi e in grado di produrre epitopi immunogenici "cross-reattivi".
- La proteina VK3-20 contiene almeno 25 epitopi in grado di legare i più comuni alleli HLA di Classe I. Sono stati validati 11 epitopi HLA-A\*0201 ed è stato dimostrato che tali peptidi sono in grado di indurre CTL specifici *ex vivo* da donatori capaci di lisare anche linee di linfoma sia VK3-20+ che VK3-15+.
- Gli epitopi HLA-A\*0201 di VK3-20 sono in gran parte condivisi con proteine VK/VJ espresse da numerose neoplasie linfoidi. CTL specifici per due di questi epitopi "nativi" di VK3-20 sono in grado di riconoscere e uccidere in modo specifico e HLA-ristretto bersagli autologhi caricati con versioni "cross-reattive" degli stessi peptidi, ma appartenenti a proteine idiopiche non correlate. Ciò suggerisce come VK3-20 contenga versioni "naturalmente eteroclitiche" di diversi epitopi condivisi con altre proteine VK/VJ ampiamente espresse in diverse neoplasie linfoidi.
- È iniziato l'arruolamento dei soggetti da studiare per la presenza di risposte T cellulari nei confronti della proteina VK3-20 in soggetti HCV+ con o senza crioglobulinemia e/o linfoma ed è stata messa a punto la relativa metodica di analisi ELISPOT. I risultati conseguiti finora indicano come risposte T cellulari VK3-20-specifiche siano presenti in pazienti con linfoma HCV+ ma non in donatori sani o in soggetti HBV+.
- Sono stati costruiti idonei vettori per l'espressione di VK3-20 e VK3-15 che sono stati trasferiti al Partner Industriale esterno che ha sviluppato un nuovo processo di produzione e purificazione "clinical-grade".
- È stata valutata l'immunogenicità della proteina VK3-20 in topi BALB/c. I risultati dimostrano che tutti i topi immunizzati hanno sviluppato una risposta umorale con titoli anticorpali fino a 1:1600-1:3200. Inoltre, i sieri sono risultati in grado di riconoscere la proteina in Western blot, confermando che la proteina VK3-20 ricombinante prototipo è immunogenica per la branca umorale.

- Utilizzando approcci diversi sono stati ottenuti e caratterizzati finora 8 anticorpi monoclonali specifici per la proteina VK3-20. Di 6 di questi anticorpi è stato mappato l'epitopo riconosciuto mediante la tecnica dell'epitope excision. Due monoclonali risultano reattivi anche in citofluorimetria verso la linea di linfoma SH9 VK3-15+, uno dei quali risulta reattivo anche verso la linea DG75 VK3-20+.
- Sono stati ottimizzati i modelli animali basati sulla crescita *in vivo* delle linee DG-75 e SH9 impiantate s.c. in topi SCID e sono attualmente sotto indagine altre vie di somministrazione, come quella intravenosa o intraperitoneale. Al fine di poter monitorare la crescita e la diffusione tumorale, le cellule DG-75 sono state ingegnerizzate per esprimere la proteina EGFP, che permette alle cellule di essere visualizzate *in vivo* in modo longitudinale con idonei apparati di imaging. Con questo approccio è stato facilmente individuato meno di un milione di cellule e ci si aspetta di aumentare ulteriormente la sensibilità in seguito a trasduzione con luciferasi e sfruttando uno strumento specifico per bioluminescenza. Sia le cellule DG-75 che le SH9 vanno tuttavia incontro ad un forte abbassamento dell'espressione delle molecole MHC di classe I e II a seguito della inoculazione *in vivo* limitando la valutazione dell'efficacia della vaccinazione. Tali limitazioni sono state superate ingegnerizzando le cellule DG-75 con un plasmide esprimente HLA-A\*0201. Tali cellule mantengono l'espressione di classe I e II a seguito del recupero dopo il trasferimento *in vivo*.

Il progetto prevede inoltre l'identificazione di sottogruppi di neoplasie linfoidi caratterizzate dall'espressione di Id ad elevata omologia di sequenza, finalizzata allo sviluppo di vaccini "subset-specifici". È pertanto iniziato l'allestimento di un database dedicato comprendente le sequenze nucleotidiche e aminoacidiche predette dei geni IgVH e IgVL delle neoplasie linfoidi di interesse. Le analisi finora eseguite confermano e ampliano osservazioni precedenti e supportano il possibile ruolo di proteine idiotipiche VKIII quali bersagli immunologici di rilevanza terapeutica per linfoproliferazioni benigne e maligne associate all'infezione da HCV. La caratterizzazione molecolare di altre neoplasie linfoidi non HCV-correlate consentirà di definire la frazione di pazienti con linfomi/leucemie non-HCV+ che potrebbe beneficiare di immunoterapia con vaccini basati sull'uso di VK3-20 ricombinante. Inoltre, il completamento dell'analisi di una casistica di leucemie linfatiche croniche (CLL) comprendente più di 1500 casi consentirà di identificare altre proteine idiotipiche espresse da distinti sottogruppi di pazienti. Tali proteine idiotipiche saranno successivamente caratterizzate dal punto di vista delle proprietà immunogeniche, consentendo di identificare ulteriori vaccini idiotipici "subset specifici" di potenziale rilevanza immunoterapeutica in grado di poter essere applicati globalmente ad un numero relativamente ampio di pazienti. Il database disponibile ha inoltre consentito l'individuazione di nuove categorie prognostiche di CLL.

Al fine di valutare se l'inibizione di hTERT è in grado di sensibilizzare cellule di linfoma all'effetto litico di effettori immuni specifici per antigeni idiotipici, sono stati sviluppati e validati approcci di silenziamento di hTERT.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.



**Tabella 1. Articolazione del progetto Sviluppo di vaccini idiotipici per studi di fase I-II di immunoterapia “subset-specifica” per pazienti con disordini linfoproliferativi a cellule B**

Proponente (Coordinatore del progetto)	UO (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
CRO (Riccardo Dolcetti)	UO1 (CRO: Riccardo Dolcetti)	CRO	Riccardo Dolcetti
		CRO	Valli De Re
		CRO	Valter Gattei
		CRO	Roberta Maestro
		CRO	Umberto Tirelli
		CRO	Vincenzo Canzonieri
		CRO	Diego Serraino
		INT	Andrea Anichini
		ISS	Maria Ferrantini
		IOV	Antonio Rosato
	UO2 (IOV: Antonio Rosato)	IOV	Stefano Indraccolo
		IOV	Anita De Rossi
		Pascale	Franco M. Buonaguro
	UO3 (Pascale: Franco M. Buonaguro)	Pascale	Giuseppe Castello
		Pascale	Francesco Izzo
		Pascale	Gerardo Botti
		Pascale	Maurizio Montella
		NIH	Francesco M. Marincola
		Ospedale Cotugno, Napoli	Oreste Perrella

## Pubblicazioni conseguite nell’ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Benedetti D, Bomben R, Dal-Bo M, Marconi D, Zucchetto A, Degan M, Forconi F, Del-Poeta G, Gaidano G, Gattei V. Are surrogates of IGHV gene mutational status useful in B-cell chronic lymphocytic leukemia? The example of Septin-10. *Leukemia* 2008;22(1):224-6.
2. Boffetta P, Dolcetti R. Infectious etiopathogenesis of extranodal lymphomas. In: Cavalli F, Stein H, Zucca E (Ed.). *Extranodal lymphomas*. London, New York: Informa Healthcare; 2008. p. 24-33.
3. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Benedetti D, Marconi D, Zucchetto A, Forconi F, Maffei R, Ghia EM, Laurenti L, Bulian P, Del Principe MI, Palermo G, Thorselius M, Degan M, Campanini R, Guarini A, Del PG, Rosenquist R, Efremov DG, Marasca R, Foa R, Gaidano G, Gattei V. Comprehensive characterization of IGHV3-21-expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia: an Italian multicenter study. *Blood* 2007;109(7):2989-98.
4. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Francesco Forconi F, Maffei R, Laurenti L, Rossi D, Del Principe MI, Zucchetto A, Bretoni F, Rossi FM, Bulian P, Cattarossi I, Ilariucci F, Sozzi E, Spina V, Zucca E, Degan M, Lauria F, Del Poeta G, Efremov DG, Marasca R, Gaidano G, Gattei V. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicenter study. *British Journal of Haematology* 2008 Nov 19. [Epub ahead of print].
5. Bulian P, Gaidano G, Del PG, Gattei V. CD49d expression in chronic lymphocytic leukemia: a prognostic parameter and a therapeutic target. *Future Oncol* 2008;4(3):355-8.

6. Caggiari L, Cannizzaro R, De Zorzi M, Canzonieri V, Da Ponte A, De Re V. A new HLA-A\*680106 allele identified in individuals with celiac disease from the Friuli area of northeast Italy. *Tissue Antigens* 2008;72(5):491-2.
7. Caggiari L, De Zorzi M, Ahlenstiel G, Rehmann B, De Re V. Identification of new MHC-A, -B, -C alleles in Pan troglodytes. *Tissue Antigens* 2008;72(1):79-83.
8. Caggiari L, Rehmann B, Folgori A, De Re V. Identification of four novel MHC-C alleles in chimpanzees. *Tissue Antigens* 2007;70 (1):78-9.
9. *Crioglobulinemia mista* [opuscolo per i pazienti a cura del GISC (Gruppo Italiano per lo Studio delle Crioglobulinemie)].
10. De Re V, Caggiari L, De Vita S, Mazzaro C, Lenzi M, Galli M, Monti G, Ferri C, Zignego AL, Gabrielli A, Sansonno D, Dammacco F, Libra M, Sacchi N, Talamini R, Spina M, Cannizzaro R, Guidoboni M, Dolcetti R. Genetic insights into the disease mechanisms of type II mixed cryoglobulinemia induced by hepatitis C virus. *Digest Liver Dis* 2007;39 Suppl 1:S65-S71.
11. De Re V, Caggiari L, Dolcetti R, De Zorzi M, Simula MP, Toffoli G (GICAT). Immunogenetica delle linfoproliferazioni HCV-associate: il ruolo dell'HLA di classe II. In: *XII° Monografia GICAT - Tumori indotti da agenti infettivi*. Milano: BIOMEDIA Editore.
12. De Re V, Caggiari L, Simula M P, De Vita S, Sansonno D, Dolcetti R. B-cell lymphomas associated with HCV infection. *Gastroenterology* 2007;132(3):1205-7.
13. De Re V, Caggiari L, Simula M.P, De Vita S, Mazzaro C, Lenzi M, Massimo GM, Monti G, Ferri C, Zignego AL, Gabrielli A, Sansonno D, Dammacco F, Libra M, Sacchi N, Talamini R, Spina M, Tirelli U, Cannizzaro R, Dolcetti R. Role of the HLA class II: HCV-related disorders. *Ann Ny Acad Sci* 2007;1107:308-18.
14. De Re V, De Vita S, Sansonno D, Toffoli G. Mixed cryoglobulinemia syndrome as an additional autoimmune disorder associated with risk for lymphoma development. *Blood* 2008;15;111(12):5760.
15. De Re V, Sansonno D, De Paoli P, Geremia S, Gatti P, Caggiari L, Simula MP, Toffoli G. Recent patents relating to HCV molecules like putative targets for therapeutic intervention. In: *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* 2007;1(3):186-94.
16. De Re V, Simula MP, Caggiari L, Orzes N, Spina M, Da Ponte A, De Appollonia L, Dolcetti R., Canzonieri V, Cannizzaro R. Proteins specifically hyperexpressed in a coeliac disease patient with aberrant T cells. *Clin Exp Immunol* 2007;148(3):402-9.
17. De Re V, Simula MP, Cannizzaro R, Sansonno D, Canzonieri V, Gloghini A, Carbone A, Colombatti A, Marin MD, De Zorzi M, Toffoli G. HCV Inhibits antigen processing and presentation and induces oxidative stress response in gastric mucosa. *Proteomics clinical application* 2008;2:1290-9.
18. De Zorzi M, Caggiari L, Ahlenstiel G, Rehmann B., De Re V. Description of two new MHC class II DRB1 [Pan troglodytes (Patr)-DRB1] alleles. *Tissue Antigens* 2008;71(5):490-2.
19. Forconi F, Rinaldi A, Kwee I, Sozzi E, Raspadori D, Rancoita PM, Scandurra M, Rossi D, Deambrogi C, Capello D, Zucca E, Marconi D, Bomben R, Gattei V, Lauria F, Gaidano G, Bertoni F. Genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion. *Br J Haematol* 2008;143(4):532-6.
20. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, Bomben R, Dal-Bo M, Luciano F, Rossi FM, Degan M, Amadori S, Del PG. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;111(2):865-73.
21. Libra M, Gloghini A, Malaponte G, Gangemi P, De Re V, Zignego AL, Spandidos DA, Nicoletti F, Stivala F, Carbone A. Prevalence of t(14;18) IGH-BCL2 translocation in mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. *J Hepatol* 2008;49(2):170-4.

22. Libra M, Navolanic PM, Nicoletti F, De Re V, Mazzarino MC. Rituximab for treatment of lymphoproliferative disorders associated with hepatitis C virus (HCV) infection. In: Bonavida B (Ed.). *Rituximab-mediated molecular signaling and interaction with chemotherapeutic drugs*. Trivandrum (India): Research Signpost; 2007. p. 19-32.
23. Martorelli D, Houali K, Caggiari L, Vaccher E, Barman L, Franchin G, Gloghini A, Pavan A, Da Ponte A, Tedeschi RM, De Re V, Carbone A, Ooka T, De Paoli P, Dolcetti R. Spontaneous T cell responses to Epstein-Barr Virus-encoded BART1 protein and derived peptides in patients with nasopharyngeal carcinoma: bases for improved immunotherapy. *Int J Cancer* 2008;123(5):1100-7.
24. Merlo A, Turrini R, Bobisse S, Zamarchi R, Alaggio R, Dolcetti R, Zanovello P, Amadori A, Rosato A. EBV-specific cytotoxic CD4+ T cells: a potential new tool to improve the treatment of EBV-related tumors. (inviato per la pubblicazione).
25. Merlo A, Turrini R, Dolcetti R., Zanovello P, Amadori A, Rosato A. Adoptive cell therapy against EBV-related malignancies: a survey of clinical results. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8(9):1265-94.
26. Montrone M, Martorelli D, Rosato A, Dolcetti R. Retinoids as critical modulators of immune functions: new therapeutic perspectives for old compounds. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* (in corso di stampa).
27. Pavan A, Spina M, Canzonieri V, Sansonno S, Toffoli G, De Re V. Recent prognostic factors in Diffuse Large B-Cell lymphoma indicate NF-kB pathway as a target for new therapeutic strategies. *Leukemia and Lymphoma* 2008;49(11):2048-58.
28. Quartuccio L, Fabris M, Salvin S, Isola M, Soldano F, Falletti E, Beltrami CA, De Re V, De Vita S. Bone marrow B-cell clonal expansion in type II mixed cryoglobulinaemia: association with nephritis. *Rheumatology* 2007;46(11):1657-61.
29. Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, De PL, Cresta S, Rasi S, Spina V, Franceschetti S, Lunghi M, Vendramin C, Bomben R, Ramponi A, Monga G, Conconi A, Magnani C, Gattei V, Gaidano G. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 2008 May 19. [Epub ahead of print]
30. Rossi D, Zucchetto A, Rossi FM, Capello D, Cerri M, Deambrogi C, Cresta S, Rasi S, De PL, Lobetti BC, Bulian P, Del PG, Ladetto M, Gattei V, Gaidano G. CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2008;93(10):1575-9.
31. Sansonno D, Carbone A, De Re V, Dammacco F. Hepatitis C virus infection, cryoglobulinaemia, and beyond. *Rheumatology* 2007;46(4):572-8.
32. Sansonno D, Tucci FA, Lauletta G, De Re V, Montrone M, Troiani L, Sansonno L, Dammacco F. Hepatitis C virus productive infection in mononuclear cells from patients with cryoglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 2007;147(2):241-8.
33. Sansonno D, Tucci FA, Lauletta G, Troiani L, Gatti P, De Re V, Conteduca V, Chironna M, Sansonno S, Dammacco F. Combined interferon-ribavirin, and rituximab management of hepatitis c virus-related mixed cryoglobulinemia. A long-term study. (inviato per la pubblicazione).
34. Simula MP, Caggiari L, Gloghini A, De Re V. HCV-related immunocytoma and type II mixed cryoglobulinemia-associated autoantigens. *Ann Ny Acad Sci* 2007;1110:121-30.
35. Spessotto P, Zucchetto A, Degan M, Wasserman B, Danussi C, Bomben R, Perris R, Canzonieri V, Radillo O, Colombatti A, Gattei V. Laminin-332 (Laminin-5) is the major motility ligand for B cell chronic lymphocytic leukemia. *Matrix Biol* 2007;26(6):473-84.
36. Terrin L, Trentin L, Degan M, Corradini I, Bertorelle R, Carli P, Maschio N, Bo MD, Noventa F, Gattei V, Semenzato G, De RA. Telomerase expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia predicts survival and delineates subgroups of patients with the same igVH mutation status and different outcome. *Leukemia* 2007;21(5):965-72.

# APPLICAZIONE DELLA CHEMIOTERAPIA ALLA RIMODULAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNE ANTITUMORALE: STUDIO DEI MECCANISMI E “PROOF OF CONCEPT” NELL’UOMO

Enrico Proietti

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

## Base di partenza e rationale

In questi ultimi anni, i progressi nel campo dell’immunologia dei tumori hanno aperto nuovi orizzonti nel trattamento di pazienti oncologici ed hanno promosso l’avvio di numerosi studi clinici di immunoterapia del cancro. Nonostante il successo ottenuto in una certa percentuale di casi, l’efficacia di trattamenti di immunoterapia dei tumori è ancora insoddisfacente.

L’importanza del microambiente sulla crescita tumorale è ormai ampiamente riconosciuta, tuttavia la maggior parte degli interventi terapeutici nel cancro è ancora disegnata per agire esclusivamente in modo diretto contro le cellule tumorali. Solo di recente, la ricerca si è orientata verso la comprensione delle interazioni tumore/ambiente, riconsiderando l’uso di alcuni chemioterapici per i loro effetti sull’organismo e in particolare sul sistema emopoietico e linfopoietico, a prescindere dalla loro azione diretta contro il tumore.

Diversi studi hanno dimostrato che la chemioterapia antineoplastica può essere vantaggiosamente combinata con strategie di immunoterapia. Alcuni dei meccanismi ipotizzati riguardano la capacità di chemioterapici di ridurre la risposta immunitaria regolatoria, di promuovere la risposta attiva mediante l’induzione di fattori emopoietici e linfopoietici, di incrementare la disponibilità di antigeni tumorali e agire sulle cellule deputate al loro processamento (*Antigen Presenting Cells*, APC).

L’immunoterapia adottiva è una strategia terapeutica basata sull’infusione di elevate quantità di cellule attivate *ex vivo* con IL-2 (LAK) insieme alla somministrazione di alte dosi di IL-2. Sebbene questa strategia sia stata in grado di indurre regressioni tumorali in una piccola frazione di pazienti con melanoma metastatico, ad essa si associa una considerevole tossicità. È soprattutto rilevante il contributo della chemioterapia linfoablattiva, non mieloablattiva, al successo dell’immunoterapia adottiva: essa, infatti, crea un ambiente depleto di linfociti in cui sono assenti le cellule immunosoppressive, e le citochine omeostatiche (IL-2, IL-7) sono a disposizione delle cellule infuse.

Il presente progetto si propone di verificare attraverso studi clinici “proof of concept” la capacità del pre-trattamento con chemioterapici di potenziare la risposta immune contro il tumore.

In un primo studio in pazienti con melanoma, la risposta immune al tumore sarà stimolata mediante vaccinazione con cellule dendritiche autologhe caricate con corpi apoptotici di cellule di melanoma. Al momento di massima risposta immune antitumorale i linfociti circolanti di questi pazienti saranno prelevati mediante aferesi e congelati per essere successivamente reinoculati negli stessi soggetti dopo trattamento con ciclofosfamide (Cy).

In un secondo trial, in pazienti con carcinoma dell’ovaio o con carcinoma del colon retto, i linfociti isolati dal sangue saranno espansi *in vitro* ed “educati” a riconoscere gli antigeni

tumorali mediante opportuni metodi di coltura e, quindi, reinfusi nello stesso paziente dopo trattamento con Cy e fludarabina.

Studi preclinici in modelli animali affiancheranno lo studio principale per fornire indicazioni complementari sui meccanismi di modulazione delle risposte immuni antitumorali da parte dei diversi agenti chemioterapici. In particolare, sarà studiato il ruolo dei sistemi di riparazione al danno genotossico da chemioterapici sull'induzione di meccanismi omeostatici del sistema linfo-emopoietico; sarà studiato l'effetto dei chemioterapici sui linfociti T regolatori e, infine, sarà studiata l'importanza del microambiente tumorale sull'azione citotossica dei linfociti infiltranti il tumore.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Il *core* dello studio è rappresentato da due studi clinici di fase I-II per lo sviluppo di protocolli di terapia combinata che includono trattamenti integrati di chemioterapia e immunoterapia.

L'immunoterapia si avvarrà della messa a punto e validazione di metodiche per la preparazione di un vaccino antitumorale basato sull'uso di *Dendritic Cells* (DC) caricate con corpi apoptotici di cellule di melanoma, e dell'uso di cellule del sistema immunitario provenienti da pazienti vaccinati o dal tessuto tumorale. Nell'ambito di questo studio si intende standardizzare metodi esistenti e mettere a punto nuovi metodi di valutazione dei correlati immunologici della risposta antitumorale.

Saranno eseguiti studi di genomica per identificare elementi coinvolti negli effetti del trattamento chemioterapico sull'omeostasi del sistema linfo-emopoietico e valutare l'impatto di polimorfismi di geni immuno-relati sulla modulazione della risposta al vaccino.

Il primo dei due studi si avvarrà dell'esperienza clinica già maturata dai ricercatori dell'ISS in uno studio appena concluso con dacarbazina (DTIC) e vaccino su pazienti con melanoma. Lo studio sarà incentrato sulla combinazione di chemioterapia linfodepletiva e trasferimento adottivo dei linfociti autologhi provenienti da pazienti immunizzati secondo uno schema che prevede trattamento con DTIC e infusione di IFN-DC autologhe caricate con corpi apoptotici tumorali.

Il secondo studio sarà focalizzato sull'isolamento, espansione e reinfusione dopo trattamento linfodepletivo, di linfociti autologhi educati *ex vivo* contro il tumore, in pazienti con carcinoma dell'ovaio o del colon-retto.

Entrambi gli studi avranno come *end point* primari la standardizzazione dei metodi di preparazione delle DC o dei TIL (*Tumor-Infiltrating Lymphocytes*) in condizioni GMP (*Good Manufacturing Practice*), la valutazione della tossicità e tollerabilità dei trattamenti e la valutazione della loro capacità di indurre risposte immunitarie significative. *End point* secondari saranno: lo studio e la standardizzazione dei correlati immunologici della risposta antitumorale, la definizione dei profili genici indotti dai trattamenti chemioterapici e la valutazione del ruolo dei polimorfismi di alcuni geni immuno-relati e, infine, la valutazione dell'efficacia del trattamento in termini di intervallo libero da malattia e di sopravvivenza complessiva.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

La finalità generale di questo progetto è quella di definire i meccanismi e le modalità di applicazione a pazienti con tumore di una strategia terapeutica basata sulla combinazione di chemioterapia e vaccinazione antitumorale. A questo scopo è stata stabilita una collaborazione integrata tra diverse unità operative cliniche e di ricerca preclinica.

Il primo anno di attività del progetto ha consentito di preparare le basi per un successivo sviluppo degli studi clinici e per la valutazione dei risultati conseguiti con metodi standardizzati in grado di correlare le risposte immunologiche antitumorali all'andamento clinico dei pazienti.

L'Unità Operativa 1, anche sulla base dei risultati ottenuti in un precedente studio clinico pilota, condotto in pazienti con melanoma avanzato, ha potuto disegnare il protocollo clinico (studio di fase I-II) per un intervento terapeutico, nella stessa tipologia di pazienti, basato sulla combinazione di un trattamento chemioterapico standard con dacarbazina e la somministrazione di un vaccino costituito da cellule dendritiche autologhe caricate con corpi apoptotici derivanti dal tumore prelevato dal paziente stesso. A questo fine, sono state definite le caratteristiche dei pazienti da arruolare (pazienti affetti da melanoma metastatico in stadio IIIB-IVa da sottoporre a resezione chirurgica completa), le modalità di combinazione chemioterapia-vaccinazione (somministrazione s.c del vaccino 1 e 7 giorni dopo ciascuna applicazione di chemioterapia) e i tempi del monitoraggio immunologico. Il protocollo clinico è stato definito nelle sue linee generali ed è stata iniziata la stesura delle CRF. Ulteriori studi sono stati eseguiti per ottimizzare le modalità di coltura e di caricamento di cellule dendritiche umane in condizioni GMP, in presenza di interferon di tipo I e di GM-CSF.

Alla preparazione del trial clinico è stata affiancata attività di ricerca preclinica. In particolare il gruppo della Dott.ssa Podo ha avviato la messa a punto dei metodi di analisi *in vivo*, nella massa tumorale, mediante risonanza magnetica nucleare di alcuni aspetti metabolici legati alla risposta immune antitumorale.

La dott.ssa Bignami ha messo a punto una metodica di analisi della modulazione di enzimi legati alla riparazione del danno cellulare indotto da dacarbazina e ciclofosfamide.

Il Prof. Doria ha condotto uno studio di valutazione dei meccanismi con cui la ciclofosfamide riduce in modo selettivo il numero e la funzione dei linfociti T regolatori.

Sono in fase conclusiva esperimenti di valutazione, mediante saggi di microarray, della modulazione dell'espressione di un ampio pannello di mRNA indotte da diversi chemioterapici (Dott.ssa Aricò, Dott.ssa Moschella).

Sono stati avviati esperimenti di valutazione del ruolo del fattore di trascrizione IRF1 sui linfociti T regolatori utilizzando topi KO per questo fattore (Dott.ssa Battistini).

L'Unità Operativa 2, in stretta collaborazione con l'ISG (Dott.ssa Catricalà), l'UO clinica dell'Oncologia Medica A (Dott.ssa Ferraresi) e l'Unità del Laboratorio di Immunologia (Dott. Natali), ha creato un gruppo interdisciplinare con l'obiettivo di contribuire ad identificare correlati immunologici della risposta anti-tumorale in pazienti con melanoma e, in particolare, in pazienti trattati con terapie integrate di chemio-immunoterapia. A questo fine è stato iniziato il reclutamento di pazienti di stadio III/IV affetti da melanoma da sottoporre a terapia combinata con dacarbazina (DTIC) e immunoterapia. Ha avuto inizio la raccolta e il congelamento di linfociti e siero dal sangue periferico di pazienti afferenti all'istituto S. Gallicano e IRE e, quando possibile, di tessuti neoplastici. Sono stati analizzati alcuni meccanismi funzionali coinvolti nella risposta immunitaria indotta dal trattamento integrato chemio-vaccino in pazienti arruolati in un precedente trial clinico condotto nel nostro Istituto.

In particolare, in questo primo anno di attività sono state standardizzate metodologie di monitoraggio immunologico nel tentativo di individuare parametri immunologici significativi e correlabili alla diversa risposta clinica. A tal fine sono stati caratterizzati e analizzati funzionalmente linfociti CD8+ di pazienti affetti da melanoma e liberi da malattia al momento dell'arruolamento in un trial clinico di vaccinazione peptidica in combinazione con DTIC. Sono state analizzate popolazioni linfocitarie CD8+ isolate *ex vivo* e caratterizzate mediante anticorpi monoclonali che identificano l'espressione in membrana di recettori specifici per i diversi stati di attivazione linfocitaria (*Naive, Memory, Effector, Effector-Memory*). Tale analisi ha dimostrato che il trattamento chemioterapico effettuato un giorno prima rispetto alla vaccinazione è in grado di espandere la popolazione CD8+ con fenotipo Effector-Memory, definita come popolazione necessaria all'eventuale controllo della progressione tumorale. Questi risultati sono stati utilizzati dalla Unità Operativa 1 per il disegno dello studio clinico precedentemente descritto.

Poiché lo studio *ex vivo* delle popolazioni linfocitarie non permette di effettuare studi funzionali che invece necessitano di un adeguato numero di linfociti antigene-specifici per poter essere eseguiti, sono state standardizzate metodologie per l'espansione *in vitro* di linee antigene-specifiche e, mediante colorazioni citofluorimetriche che utilizzano molecole HLA-tetrameriche complessate con gli antigeni tumorali di interesse, è stata analizzata la magnitudo di espansione cellulare a diversi tempi durante il trattamento e, nei pazienti sopravvissuti, nel follow-up clinico successivo alla fine del trattamento.

Inoltre, mediante saggi di citotossicità si è dimostrato che la dacarbazina è in grado di indurre popolazioni che non solo sono antigene-specifiche ma, sono in grado di riconoscere cellule tumorali esprimenti l'antigene.

Infine, sono state messe a punto tecniche per la generazione di centinaia di cloni antigene-specifici partendo dalle linee arricchite nella popolazione antigenica di interesse. Tali cloni sono stati caratterizzati funzionalmente mediante saggi di IFN-gamma ELISPOT e di citotossicità. In particolare, è stata analizzata la capacità litica nei confronti di differenti linee di melanoma con un diverso fenotipo antigenico. L'avidità di tali cloni nei confronti dell'antigene tumorale Melan-A è stata caratterizzata mediante saggi di citotossicità su cellule presentanti l'antigene (APC) caricate con peptidi naturali (Melan-A 26-35) e modificati (Melan-A A27L) in diluizioni di concentrazione decrescente. Dal sequenziamento delle catene beta e del CDR3 del TCR di alcuni cloni rappresentativi è stato dimostrato che l'inoculo della dacarbazina prima della vaccinazione è in grado di diversificare il repertorio dei linfociti CD8+ Melan-A-specifici e che tale diversificazione è correlabile ad una migliore efficacia clinica della terapia.

Sono in corso studi di caratterizzazione immunoistochimica sul microambiente tumorale, quando disponibile materiale biotico, al fine di identificare un microambiente tumorale che possa favorire l'*homing* linfocitario (Dott. Natali). Tali studi potrebbero essere correlati con i dati relativi ai profili genici indotti sui linfociti dai trattamenti chemioterapici, che suggeriscono un ruolo della dacarbazina nell'up-regolazione di geni relativi alla motilità e all'*homing* linfocitario.

Il gruppo di ricerca della Dott.ssa Franzese dell'Università Tor Vergata, afferente alla UO1, sta contribuendo all'identificazione di meccanismi funzionali attraverso i quali la dacarbazina può favorire la risposta immunitaria anti-tumore. In particolare, sta validando saggi specifici per studiare la senescenza delle sottopopolazioni linfocitarie, quali TRAP Assay per lo studio dell'attività telomerasica, Western Blot e Immunoprecipitazione per lo studio della distribuzione intracellulare di hTERT, RT e Real Time PCR per la misurazione dell'espressione di hTERT mRNA, Flow-Fish per la determinazione della lunghezza dei telomeri.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del progetto Applicazione della chemioterapia alla rimodulazione della risposta immune antitumorale: studio dei meccanismi e "proof of concept" nell'uomo**

Proponente (Coordinatore del progetto)	UO (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
ISS (Enrico Proietti)	UO1 (ISS: Enrico Proietti)	ISS	Enrico Proietti
		ISS	Angela Battistini
		ISS	Margherita Bignami
		ISS	Franca Podo
		ISS	Eleonora Aricò
	UO2 (IRE - Paola Nisticò)	CNR	Gino Doria
		IRE	Paola Nisticò
		IRE	Piergiorgio Natali
		IRE	Virginia Ferraresi
		Istituto S. Gallicano	Caterina Catricalà
	UO3 (HSR: Marco Bregni)	Università di Roma Tor Vergata	Ornella Franzese
		HSR	Marco Bregni
		INT	Licia Rivoltini
		IEO	Maria Rescigno

## Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Bracci L, La Sorsa V, Belardelli F, Proietti E Type I interferons as vaccine adjuvants against infectious diseases and cancer. *Expert Rev Vaccines* 2008;7(3):373-81.
2. Bracci L, Proietti E, Belardelli F. IFN-alpha and novel strategies of combination therapy for cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1112:256-68.
3. Bracci L, Schumacher R, Provenzano M, Adamina M, Rosenthal R, Groeper C, Zajac P, Iezzi G, Proietti E, Belardelli F, Spagnoli GC. Efficient stimulation of T cell responses by human IFN-alpha-induced dendritic cells does not require Toll-like receptor triggering. *J Immunother* 2008;31(5):466-74.
4. Giammarioli AM, Maselli A, Casagrande A, Gambardella L, Gallina A, Spada M, Giovannetti A, Proietti E, Malorni W, Pierdominici M. Pyrimethamine induces apoptosis of melanoma cells via a caspase and cathepsin double-edged mechanism *Cancer Res* 2008;68(13):5291-300.
5. Nisticò P, Capone I, Palermo B, Del Bello D, Ferraresi V, Moschella F, Aricò E, Valentini M, Bracci L, Cognetti F, Ciccarese M, Vercillo G, Roselli M, Fossile E, Tosti ME, Wang E, Marincola F, Imberti L, Catricalà C, Natali PG, Belardelli F, Proietti E. Chemotherapy enhances vaccine-induced antitumor immunity in melanoma patients. *Int J Cancer* 2009;124(1):130-9.



# IDENTIFICAZIONE DI MARCATORI PER LA PREDIZIONE DELLA RISPOSTA A NUOVI FARMACI ANTITUMORALI (INIBITORI DI HDAC, TIROSINO CHINASI E POMPE IONICHE)

Pier Giuseppe Pelicci

Dipartimento di Oncologia Sperimentale, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

## Base di partenza e razionale

L'obiettivo della nuova medicina molecolare è la definizione degli specifici difetti genetico-molecolari di un determinato tumore per il disegno di farmaci appropriati ed esempi sono già ampiamente disponibili nella pratica clinica così come l'identificazione di profili di espressione genica capaci di costituire *signature* di sensibilità/resistenza ai diversi trattamenti. Alcuni nuovi farmaci antitumorali mostrano particolare interesse per le prospettive di identificazione di marcatori per la predizione delle risposte in pazienti incologici:

### – *Inibitori delle tirosino-chinasi*

In base alla considerazione che enzimi tirosin chinasi sono coinvolti in *pathway* di proliferazione e sopravvivenza cellulare e che varie protein chinasi hanno un ruolo regolatorio in tali processi, l'inibizione di queste attività enzimatiche, attivate in modo aberrante in diversi tipi di tumore, rappresenta un nuovo ed estremamente promettente approccio con differenti opportunità terapeutiche con il quali interferire a diversi livelli sulla patofisiologia della cellula tumorale. Tra i recettori ad attività tirosin-chinasica quelli più studiati, definibili come *upstream target*, appartengono alla famiglia EGFR (EGFR, HER-2/neu, HER-3), VEGFR (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), PDGFR (KIT, PDGFRA, PDGFRB), mentre altri possibili bersagli terapeutici sono costituiti dalle molecole effettrici di tali recettori (*downstream targets* perché a valle della cascata indotta dall'interazione tra fattore di crescita e recettore), tra cui Ras/Raf-MEK/Erk, BRAF, PI3K/Akt, PTEN, Ret. Proprio in relazione al loro ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale mitogenico e quindi nei processi di proliferazione e differenziamento cellulare così come nell'attivazione dell'angiogenesi, i recettori ad attività tirosin-chinasica sono stati oggetto di un'intensa ricerca, finalizzata all'identificazione di molecole in grado di interferire sulla loro attività in modo specifico. A tutt'oggi diversi sono gli inibitori tirosin-chinasici, sia recettoriali che citoplasmatici, utilizzati in clinica nel trattamento di neoplasie solide e sistemiche. Generalmente si tratta di anticorpi monoclonali che legano la porzione extracellulare del recettore inibendone l'interazione col ligando (gefitinib nel caso di EGFR, trastuzumab nel caso di HER-2, IMC-1C11 nel caso di VEGFR) o impedendone la dimerizzazione (come nel caso di pertuzumab per HER-2) e di piccole molecole capaci di inibire l'attività enzimatica delle tirosin-chinasi (come nel caso dell'imatinib per la proteina di fusione ad attività tirosin-chinasica BCR/ABL nella leucemia mieloide cronica).

### – *Inibitori delle istone-deacetilasi*

Le deacetilasi (HDAC) e le acetil-transferasi (HAT) istoniche influenzano la struttura della cromatina e modulano l'attività di diverse proteine non istoniche implicate nella

regolazione di differenti funzioni cellulari. Ad oggi nell'uomo sono state identificate 18 HDAC, che sono state raggruppate in tre classi. La classe I, a cui appartengono HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8, è ubiquitaria ed è implicata nella patogenesi di numerosi tumori. La sperimentazione clinica di inibitori delle HDAC ha condotto recentemente il primo inibitore di HDAC (il SAHA) alla registrazione per l'utilizzo nella terapia di alcuni linfomi a cellule T. Gli attuali inibitori delle deacetilasi istoniche in sperimentazione clinica (incluso il SAHA) mostrano tutti una certa tossicità e una bassa selettività per i diversi isoenzimi HDAC. Uno di questi inibitori (l'acido valproico o VPA) è da diversi decenni in uso come farmaco antiepilettico, a dosi che nei pazienti neurologici non sono però sufficienti ad inibire HDAC. Il VPA è un inibitore specifico per la classe I di HDAC, e potrebbe quindi rappresentare un farmaco selettivo per la sottofamiglia di HDAC maggiormente coinvolta nella tumorigenesi.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

L'obiettivo di questo programma di ricerca è l'identificazione di marcatori biologici e molecolari di predizione della risposta clinica ad alcuni dei farmaci molecolari disponibili: inibitori di istone-deacetilasi, HDACi (VPA e SAHA); inibitori delle tirosino chinasi, TKi (herceptin e imatinib); inibitori delle pompe ioniche (*Proton Pump Inhibitors*, PPI) in selezionati tipi di tumore (tumori della mammella, melanomi, leucemie mieloidi e glioblastomi). I tumori che verranno inseriti nello studio verranno caratterizzati per l'espressione del bersaglio e, ove appropriato, per il suo stato di attivazione o per la presenza di alterazioni genetiche. La sensibilità ai farmaci molecolari selezionati verrà analizzata sia sul *bulk* delle cellule tumorali che su colture di cellule staminali dello stesso tumore.

Lo studio verrà eseguito utilizzando modelli pre-clinici di neoplasia: i) modelli animali, comprendenti topi transgenici (leucemie mieloidi acute ottenute mediante transgenizzazione delle proteine di fusione PML-RAR e AML1-ETO; leucemia mieloide cronica esprimente bcr-abl; tumore mammario esprimente erbB2; melanomi sovraesprimenti B-Raf) e xenotrapianti dei corrispondenti tumori umani in topi immunodeficienti; ii) Campioni umani, comprendenti colture primarie di tumore (es. cellule epiteliali mammarie e di melanoma), colture di cellule tumorali staminali (mammosfere, neurosfere, melanosfere e LTC-IC) e campioni biotipici dagli stessi tumori.

L'attività sperimentale sarà articolata in tre fasi:

- *Fase 1*: Valutazione della attività biologica (crescita cellulare, apoptosi, senescenza, ciclo cellulare), biochimica (effetto sulle vie di segnalazione downstream allo specifico bersaglio molecolare: HDAC, TK, pompe ioniche) e molecolare (profili di espressione) di ciascun farmaco nelle varie colture primarie di tumore e nei modelli murini transgenici disponibili. Tali studi condurranno all'identificazione di bersagli critici della risposta e/o potenziali marcatori.
- *Fase 2*: Valutazione dell'espressione dei marcatori di risposta nelle biopsie dei tumori, mediante ibridazione in situ e immunistochimica.
- *Fase 3*: Validazione dell'efficacia predittiva dei marcatori selezionati mediante studi correlativi su xenotrapianti di tumori umani. Se questo programma di ricerca condurrà all'identificazione di marcatori di risposta ai farmaci molecolari studiati, programmiamo l'esecuzione di uno studio clinico pilota (carcinomi metastatici della mammella trattati con VPA). Infine, verranno condotti studi preliminari per la caratterizzazione del bersaglio molecolare di nuovi farmaci (ET-43) potenzialmente attivi nei confronti di liposarcomi esprimenti la proteina di fusione FUS-CHOP.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

L'obiettivo di questo programma di ricerca è l'identificazione di marcatori biologici e molecolari di predizione della risposta clinica ad alcuni dei farmaci molecolari disponibili: inibitori di istone-deacetilasi, HDACi (VPA e SAHA); inibitori delle tirosino chinasi, TKi (herceptin e imatinib); inibitori delle pompe ioniche (PPI) in selezionati tipi di tumore (tumori della mammella, melanomi, leucemie mieloidi e glioblastomi). Il nostro approccio coinvolge, per vari tipi di tumore, la caratterizzazione del bersaglio terapeutico (espressione, stato di attivazione e presenza di alterazioni genetiche) e la loro sensibilità ai Farmaci Molecolari selezionati. La sensibilità viene valutata sia *in vivo*, utilizzando modelli animali (topi transgenici e xenotrapianti in topi immunodeficienti), che *in vitro*, utilizzando sia il *bulk* delle cellule tumorali che colture di cellule staminali dello stesso tumore. Nella prima fase di questo studio abbiamo condotto i seguenti esperimenti:

### 1. HDACi e Nutline in tumori mammari e melanomi

Abbiamo riscontrato una correlazione tra stato di acetilazione degli istoni e sensibilità al trattamento con HDACi *in vitro* e stiamo effettuando profili di espressione per identificare signature predittive di risposta. In parallelo, stiamo mettendo a punto protocolli per il silenziamento selettivo delle varie HDAC. Per quello che concerne la valutazione di HDACi su modelli animali, stiamo lavorando con topi transgenici MMTV-ErbB2/neu e mettendo a punto i vari saggi sperimentali. Esperimenti *in vitro* (mammosfere) e *in vivo* (trapianto) con cellule staminali tumorali (BCSCs) provenienti da tumori MMTV-ErbB2/neu hanno evidenziato un arricchimento delle cellule staminali rispetto al tessuto mammario sano, un fenotipo dipendente dall'inattivazione di p53. Tramite l'utilizzo di Nutlin3, un composto chimico che determina un accumulo di p53, siamo stati in grado di revertire la cinetica di divisione tra BSC normali e tumorali. Useremo questo modello sperimentale per studiare anche HDACi. Stiamo infine mettendo a punto modelli sperimentali per testare l'attività di HDACi nel melanoma. Abbiamo generato e caratterizzato 20 colture primarie di melanoma. Dallo stesso campione bioptico abbiamo analizzato la capacità di alcune cellule di crescere in sospensione formando sferoidi (cellule staminali e progenitori non differenziati). Sedici campioni hanno formato sferoidi, mentre 4 sono stati in grado di formare solo colture di cellule aderenti.

### 2. Trabectedin nei liposarcomi mixoidi

Trabectedin è un nuovo farmaco attivo nei liposarcomi mixoidi, caratterizzati dal trascritto di fusione FUS-CHOP. Per validare l'ipotesi che il Trabectedin agisca bloccando la capacità transattivante del trascritto FUS-CHOP stiamo studiando due linee cellulari di liposarcoma e sei linee umane stabilizzate come xenograft in animali immunodeficienti.

### 3. Regolazione farmacologica della famiglia p53/p63/p73

Abbiamo caratterizzato la regolazione dell'espressione dei componenti della famiglia di p53 (p63 e p73), la regolazione della ligasi Itch, coinvolta nella loro degradazione e alcuni composti chimici che possono inibire l'attività di quest'ultima. Abbiamo dimostrato che Itch è una proteina stabile, e che la via degradativa proteasoma-dipendente non è implicata nella regolazione dei suoi stessi livelli endogeni.

4. *Recettori ad attività tirosin-chinasica in sarcomi alveolari, tumori maligni delle guaine nervose periferiche, mesoteliomi e cordomi*

Abbiamo stabilizzato una linea cellulare di mesotelioma in grado di crescere *in vitro* e di generare tumori nel topo nudo che utilizzeremo per la caratterizzazione dei *pathway* rilevanti ai fini terapeutici (analisi mutazionale dei geni EGFR, PDGFRA, PDGFRB, PI3K, PTEN, RAS e RAF, del loro livello di espressione e stato di attivazione). Negli adenocarcinomi polmonari, abbiamo dimostrato la attivazione costitutiva di recettori del PDGF, non dovuta a mutazioni genetiche.

5. *Identificazione di pazienti responsivi a trattamenti con inibitori di tirosin-chinasi*

È stata identificata nei GIST una nuova mutazione attivante il recettore c-KIT (c-KITL576P) associata a mancata risposta ad imatinib. L'analisi biochimica del tumore residuo dopo trattamento ha mostrato l'incapacità di imatinib di inibire la autofosforilazione di c-KIT indotta dalla mutazione.

6. *Indolinoni e RET*

Un inibitore della serie indolinoni RPI-1 inibisce la capacità proliferativa e invasiva delle cellule tumorali attraverso attività multitarget. Nell'ambito di questa classe è stata identificata una nuova serie di inibitori di RET che agiscono attraverso una differente modalità di interazione con il sito di legame dell'ATP della chinasi.

7. *Inibitori di pompa protonica (PPI), melanoma e osteosarcoma*

Sono in corso studi clinici in pazienti con melanoma e osteosarcoma per valutare la capacità chemosensibilizzante dei PPI, ed è in attivazione un protocollo di trattamento su pazienti con carcinoma mammario recidivato.

8. *HDACi e glioblastomi*

Abbiamo confermato su 71 linee primarie di glioblastoma (GBM) l'upregolazione di Enhancer in Zeste 2 (EZH2), un gene del gruppo Polycomb già coinvolto in tumorigenesi. L'analisi dell'espressione viene correntemente eseguita in cellule tumorali che crescono come neuro sfere (NS) o come cellule aderenti (AC) (EZH2 è sempre più espresso nelle NS). In un sottogruppo di GBM in cui era disponibile l'informazione sulla sopravvivenza complessiva (n=44) abbiamo potuto verificare che essa è significativamente inferiore quando il GBM forma NS *in vitro* ( $p < 0,01$ ). Abbiamo inoltre verificato che solo le NS, ma non le AC, esprimono livelli misurabili di CD133, un gene espresso in cellule staminali neurali. Sono iniziati gli esperimenti di trattamento con SAHA, un inibitore delle istone deacetilasi (HDAC), allo scopo di valutare la efficacia del SAHA nel limitare la proliferazione cellulare e il suo effetto su EZH2. Alla concentrazione 2 microM SAHA era capace di impedire la formazione di nuove NS e provocare l'adesione o la morte delle cellule in coltura. A tale concentrazione anche l'espressione di EZH2 è nettamente diminuita.

9. *Rai e glioblastomi*

Abbiamo dimostrato che la proteina Rai è espressa nel 60% dei glioblastomi esaminati. L'espressione di Rai all'interno del tumore è disomogenea: Rai è sempre espresso invece, ad elevati livelli, nelle neurosfere tumorali isolate. Abbiamo dimostrato che Rai regola la capacità migratoria delle neurosfere isolate da glioblastomi umani e il loro potenziale tumorigenico *in vivo*, suggerendo che la ridotta capacità migratoria delle neurosfere tumorali in assenza di Rai possa determinare tumori intracranici con ridotte caratteristiche diffuse e infiltrative.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del progetto Identificazione di marcatori per la predizione della risposta a nuovi farmaci antitumorali (inibitori di HDAC, tirosino chinasi e pompe ioniche)**

Proponente (Coordinatore del progetto)	UO (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
IEO (Pier Giuseppe Pelicci)	UO1 (IEO: Pier Giuseppe Pelicci)	IEO	Pier Giuseppe Pelicci
		IEO	Saverio Minucci
		IEO	Susanna Chiocca
		IEO	Salvatore Pece
		IEO	Giuseppina Bonizzi
		IEO	Luisa Lanfrancone
	UO2 (INT: Maria Grazia Daidone)	Humanitas	Paola Allavena
		IDI	Alessandro Terrinoni
		INT	Maria Grazia Daidone
		INT	Angela Greco
		INT	Sylvie Ménard
		INT	Gabriella Sozzi
	UO3 (Besta: Gaetano Finocchiaro)	INT	Franco Zunino
		INT	Silvana Pilotti
		ISS	Stefano Fais
		Besta	Gaetano Finocchiaro
		Besta	Maurizio Gelati
		IEO	Giuliana Pelicci

## Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

- Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, A. Mantovani. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18(1):3-10.
- Cassinelli G, Favini E, Degl'Innocenti D, Salvi A, De Petro G, Pierotti MA, Zunino F, Borrello M.G, Lanzi C. RET/PTC1-driven neoplastic transformation and proinvasive phenotype of human thyrocytes involve Met induction and  $\beta$ -catenin nuclear trans location. *Neoplasia* 2009;11:10-21.
- Cincinelli R, Cassinelli G, Dallavalle S, Lanzi C, Merlini L, Botta M., Tuccinardi T, Martinelli A, Penco S, Zunino F. Synthesis, modeling, and RET protein kinase inhibitory activity of 3- and 4-substituted  $\beta$ -carbolin-1-ones. *J. Med. Chem* 2008; 51:7777-87.
- Stacchiotti S, Tamborini E, Marrari A, Brich S, Arisi Rota S, Orsenigo M, Crippa F, Morosi C, Gronchi A, Pierotti MA, Casali PG, Pilotti S. Response to sunitinib malate in advanced alveolar soft part sarcoma (ASPS). *Clin Cancer Res* (accettato per la pubblicazione).
- Perrone F, Da Riva L, Orsenigo M, Losa M, Jocollè G, Millefanti C, Pastore E, Gronchi A, Pierotti MA, Pilotti S. PDGFRA, PDGFRB, EGFR and downstream signalling activation in malignant peripheral nerve sheath tumour. *Neuro Oncology* (accettato per la pubblicazione)
- Tamborini E, Viridis E, Orsenigo M, Arisi Rota S, Brich S, Conca E, Gronchi A, Stacchiotti S, Manenti G, Casali PG, Pierotti MA, Pilotti S. Analysis of receptor tyrosine kinases (RTK) and downstream pathways in chordomas. (inviato per la pubblicazione).

# IL MICROAMBIENTE TUMORALE COME BERSAGLIO TERAPEUTICO

Alessandro Gianni

Struttura complessa Oncologia Medica 3, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

## Base di partenza e razionale

La terapia dei tumori, sviluppatasi a partire dagli anni '50, si basa quasi esclusivamente sull'impiego di farmaci dotati di citotossicità diretta nei confronti della cellula tumorale.

Questo approccio riflette largamente le modalità di screenig impiegate fino a pochi anni or sono nella ricerca di composti ad attività antitumorale, consistenti nel testare l'attività antiproliferativa di un gran numero di composti empiricamente selezionati su linee cellulari coltivate *in vitro*. All'opposto, *in vivo* la crescita tumorale è influenzata in modo determinante dalle cellule che costituiscono il microambiente tumorale. Lo stroma co-evolve con il tumore e concorre a formare un microambiente sfavorevole alle terapie sia dal punto di vista strutturale sia fornendo fattori di sopravvivenza. I principali attori cellulari del microambiente tumorale sono i fibroblasti dello stroma, le cellule del sistema immunitario sia innato che adattativo, e le cellule della rete vascolare e linfatica. A questi si associano i componenti della matrice extracellulare che hanno sia funzione strutturale che regolatoria.

La maggiore comprensione della biologia della crescita tumorale *in vivo*, e il riconoscimento del ruolo critico giocato dal microambiente, incoraggia oggi la ricerca di trattamenti in cui il bersaglio non sia la cellula tumorale, ma le cellule del microambiente con funzioni di supporto. Promettenti risultati clinici sono stati osservati in alcuni tumori umani con farmaci capaci di inibire le cellule endoteliali (talidomide nel mieloma, bevacizumab nei tumori epiteliali) o i B linfociti (rituximab nel linfoma di Hodgkin classico, CD20-negativo).

Queste osservazioni, anche se preliminari e perfettibili, rappresentano un'importante prova di principio a favore di strategie terapeutiche dirette contro il microambiente. Se combinate con la chemioterapia tradizionale possono potenziarne l'efficacia favorendone l'attività citotossica e/o la biodistribuzione del farmaco al tumore.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi generali del progetto sono:

1. identificare nel microambiente tumorale nuovi bersagli terapeutici basandosi su modelli preclinici biologicamente ben caratterizzati;
2. identificare meccanismi responsabili di effetti biologici o efficacia terapeutica in studi clinici in cui l'attività sul microambiente è ipotizzabile;
3. validare, in studi clinici di fase I-II, l'effettivo targeting di cellule dello stroma e loro efficacia.

Obiettivi specifici principali del progetto sono:

1. valutare l'attività di un anticorpo anti-SPARC (di topo > in topo) nel favorire l'accesso al tumore di farmaci e anticorpi terapeutici;

2. confermare l'esistenza della nicchia per la leucemia mieloide acuta e modularne l'interazione con le cellule staminali leucemiche;
3. definire il ruolo di PTX-3 (una proteina solubile di fase acuta prodotta dai macrofagi) e dei macrofagi nel favorire la crescita tumorale dei sarcomi;
4. verificare in pazienti affetti da linfoma di Hodgkin l'attività antilinfomatosa di farmaci diretti contro cellule del microambiente (in particolare T-linfociti CD4-positivi);
5. verificare l'attività antitumorale di farmaci dotati di attività inibitoria sull'autofagia, un processo cellulare influenzato dal microambiente e responsabile di resistenza ai farmaci antitumorali

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

L'attività delle UO coinvolte nel progetto si è incentrata su due aspetti principali:

- *Studi preclinici che hanno esplorato il ruolo del microambiente tumorale nella genesi, nella progressione e nella terapia dei tumori*

Il microambiente dei tumori solidi è caratterizzato dalla presenza di cellule e mediatori infiammatori i quali contribuiscono al continuo rimodellamento tissutale, alla neoangiogenesi alla progressione e invasione tumorale. Pertanto, il microambiente del tumore non soltanto può contribuire alla genesi e alla progressione neoplastica ma rappresenta un potenziale bersaglio terapeutico. Gli studi preclinici eseguiti nel corso del primo anno del progetto e riassunti di seguito hanno investigato molteplici aspetti del ruolo del microambiente.

L'autofagia è stata recentemente associata alla capacità di alcune cellule tumorali di "resistere" all'effetto pro-apoptotico indotto dai farmaci antineoplastici. La xenofagia è un processo adottato dalle cellule tumorali metastatiche per cannibalizzare cellule limitrofe o del sistema immune. Quindi, autofagia e xenofagia rappresentano importanti meccanismi di sopravvivenza per le cellule tumorali in condizioni microambientali avverse e di resistenza all'effetto pro-apoptotico dei farmaci antineoplastici. In questo contesto, sono state analizzate *in vitro* e *in vivo* la suscettibilità all'apoptosi e all'autofagia di cellule isolate da melanoma metastatico in condizioni di microambiente sfavorevole come: (i) la deprivazione di nutrienti dal terreno di coltura, (ii) l'inibizione della via metabolica glicolitica (2-deossi-D-glucosio). Sono quindi stati effettuati trattamenti con agenti farmacologici (es. pirimetamina e gli inibitori della catepsina B che modulano l'autofagia).

L'analisi dell'espressione dell'inibitore delle proteasi Serpina B5 in biopsie di pazienti con carcinoma della mammella sottoposte a terapia neoadiuvante ha evidenziato livelli di questa molecola significativamente più alti nei tumori che sono andati in progressione sotto trattamento rispetto a quelli presenti nei tumori responsivi.

La modulazione dell'espressione della proteina adattatrice Rai nello sviluppo del glioblastoma mediante la tecnica dell'RNA interference ha dimostrato che Rai aumenta la capacità migratoria delle neurosfere tumorali *in vitro* e il loro potenziale tumorigenico *in vivo*. La ridotta capacità migratoria propria delle neurosfere tumorali in assenza di Rai comporta la formazione di tumori intracranici con ridotte caratteristiche diffuse e infiltrative.

Lo studio del ruolo di SPARC ha dimostrato che SPARC è necessaria per la corretta organizzazione della matrice extracellulare del tumore e media l'interazione tra cellula tumorale e macrofagi durante le fasi iniziali del processo metastatico. Esperimenti in corso sono finalizzati a testare l'ipotesi che SPARC o molecole a valle del suo *pathway* possano rappresentare potenziali bersagli terapeutici.

Un prototipo di farmaco antitumorale con attività anti-microambiente è la Trabectedin, molecola dotata di effetti anti-infiammatori che potrebbero contribuire alla sua attività anti-tumorale. Trabectedin riduce a livello trascrizionale la produzione di alcune citochine/chemochine sia nelle cellule tumorali sia nei monociti/macrofagi, quali ad esempio CCL2, CXCL8, IL-6 e VEGF. Trabectedin possiede attività anti-angiogenetica. In linee cellulari stabilizzate e in tumori primari di liposarcoma, Trabectedin riduce in modo significativo la produzione di PTX3, una proteina di fase acuta indotta da citochine infiammatorie, che costituisce anche un componente importante della matrice tumorale.

Una ulteriore strategia anti-angiogenetica esplorata nella fase iniziale del progetto si basa sulla capacità del frammento aminotermine della cromogranina-A di inibire la proliferazione, la migrazione e l'organizzazione delle cellule endoteliali indotta dal VEGF *in vitro* e *in vivo*. È possibile veicolare sui vasi tumorali citochine in grado di indurre danno vascolare attraverso la fusione con il peptide CNGRC, un ligando di CD13 espresso dall'endotelio angiogenico. La cromogranina-A è in grado di inibire l'attività proangiogenica dell'bFGF in un saggio di angiogenesi basato sull'uso di anelli di aorta di ratto.

Lo studio dello stato cinetico delle cellule staminali leucemiche umane marcate con il colorante di membrana PKH26 e trapiantate in topi immunodeficienti. Questi esperimenti hanno dimostrato che nelle leucemie ci sono cellule staminali in grado di dividersi pochissime volte nell'arco di settimane. Se queste rare cellule vengono ritrapiantate sono in grado di rigenerare una leucemia con le stesse caratteristiche genetico-molecolari e fenotipiche di quella da cui sono state isolate in origine. È stato altresì dimostrato mediante l'analisi di geni regolatori del ciclo di divisione cellulare che la delezione della ciclina E1 aumenta il potenziale di ripopolazione delle cellule staminali in saggi di trapianto seriale, in sintonia col concetto che la quiescenza sia un elemento importante nel mantenimento della staminalità.

- *Disegno di uno studio clinico di chemioimmunoterapia avente l'obiettivo di bersagliare sia le cellule neoplastiche che le cellule del microambiente tumorale*

Il linfoma di Hodgkin (LH) è caratterizzato istologicamente dalla presenza di un numero limitato di cellule tumorali (cellule di Hodgkin/Reed-Sternberg) che rappresentano meno del 5% delle cellule del tessuto linfomatoso e sono circondate da un numero preponderante di cellule infiammatorie, in particolare T- e B-linfociti. L'eliminazione di queste cellule dal microambiente potrebbe sottrarre alla cellula di Hodgkin/Reed-Sternberg fattori indispensabili alla sua sopravvivenza con conseguente arresto maturativo e morte cellulare. È stato disegnato e organizzato uno studio clinico di fase III da condurre in pazienti con LH in stadio precoce (I - IIA) che verranno randomizzati a ricevere chemioterapia secondo lo schema ABVD seguito a radioterapia oppure ABVD supplementato con l'anticorpo monoclonale anti-CD20 Rituximab.



## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del progetto Il microambiente tumorale come bersaglio terapeutico**

<b>Proponente</b> ( <i>Cordinatore del progetto</i> )	<b>UO</b> ( <i>ente di appartenenza: responsabile</i> )	<b>Gruppi di ricerca afferenti</b>	<b>Responsabile scientifico del gruppo</b>	
INT (Alessandro M. Gianni)	UO1 (INT: Alessandro M. Gianni)	INT	Alessandro Massimo Gianni	
		INT	Andrea Anichini	
		INT	Mario P. Colombo	
		INT	Elda Tagliabue	
	UO2 (IEO: Pier Giuseppe Pelicci)	IEO	Pier Giuseppe Pelicci	
		IEO	Giuliana Pelicci	
		IEO	Bruno Amati	
		ISS	Walter Malorni	
		UO3 (Humanitas: Paola Allavena)	Humanitas	Paola Allavena
			HSR	Angelo Corti

## Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

- Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18:3-10.
- Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 2008;222:155-61.
- Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:1-9.
- Bellone M, Mondino A, Corti A. Vascular targeting, chemotherapy and active immunotherapy: teaming up to attack cancer. *Trends Immunol* 2008;29:235-41.
- Bergamaschi A, Tagliabue E, Sorlie T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R, Tammi R, Giercksky H, Nesland JM, Ménard S, Borresen-Dale AL. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol* 2008;214:357-67.
- Corti A, Curnis F, Arap W, Pasqualini R. The neovasculature homing motif NGR: more than meets the eye. *Blood* 2008;112:2628-35.
- Crippa L, Gasparri A, Sacchi A, Ferrero E, Curnis F, Corti A. Synergistic damage of tumor vessels with ultra-low dose endothelial-monocyte activating polypeptide-II and neovasculature-targeted TNF $\alpha$ . *Cancer Res* 2008;68:1154-61.
- Curnis F, Sacchi A, Gasparri A, Longhi R, Bachi A, Doglioni C, Bordignon C., Traversari C, Rizzardì GP, Corti A. Isoaspartate-glycine-arginine: a new tumor vasculature targeting motif. *Cancer Res* 2008;68:7073-82
- Giammarioli AM, Maselli A, Casagrande A, Gambardella L, Gallina A, Spada M, Giovannetti A, Proietti E, Malorni W, Pierdominici M. Pyrimethamine induces apoptosis of melanoma cells via a caspase and cathepsin double-edged mechanism. *Cancer Res* 2008;68:5291-300.

10. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454:436-44.
11. Marchesi F, Piemonti L, Fedele F, Destro A, Roncalli M, Albarello, Doglioni, Anselmo, Doni, Bianchi, Laghi, Malesci, Cervo, Malosio, Reni, Zerbi, Di Carlo, Mantovani A, Allavena P. The Chemokine Receptor CX3CR1 Is Involved in the Neural Tropism and Malignant Behavior of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Res* 2008;68:9060-9.
12. Matarrese P, Ciarlo L, Tinari A, Piacentini M, Malorni W. Xeno-cannibalism as an exacerbation of self-cannibalism: a possible fruitful survival strategy for cancer cells. *Curr Pharm Des* 2008;14:245-52.
13. Matarrese P, Manganeli V, Garofalo T, Tinari A, Gambardella L, Ndebele K, Khosravi-Far R, Sorice M, Esposti MD, Malorni W. Endosomal compartment contributes to the propagation of CD95/Fas-mediated signals in type II cells. *Biochem J* 2008;413:467-78.
14. Spitaleri A, Mari S, Curnis F, Traversari C, Longhi R, Bordignon C, Corti A, Rizzardi GP, Musco G. Structural basis for the interaction of isoDGR with the RGD-binding site of  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin. *J Biol Chem* 2008;283:19757-68.

# SVILUPPO DI NUOVI FARMACI CAPACI DI ALTERARE IL MICROAMBIENTE TUMORALE E RIPRISTINARE LA RISPOSTA IMMUNE ANTI-TUMORALE

Vincenzo Bronte  
Istituto Oncologico Veneto (IRCCS), Padova

## Base di partenza e razionale

Da tempo è nota la connessione fra infiammazione e cancro. Studi epidemiologici indicano che l'infiammazione cronica predispone verso forme neoplastiche a carico del colon, prostata, fegato e l'uso di farmaci antinfiammatori non steroidei può conferire una protezione all'insorgenza dei tumori.

La comunicazione tra tumori e cellule infiammatorie avviene attraverso un circuito di mediatori pro-infiammatori comprendenti citochine, chemochine e metaboliti; questa risposta pro-infiammatoria può essere innescata e mantenuta, nelle stesse cellule tumorali, dall'attivazione di alcuni oncogeni.

Abbiamo di recente dimostrato che il tessuto tumorale è infiltrato da linfociti T citotossici differenziati che tuttavia non controllano la crescita tumorale e non rispondono ai classici stimoli di attivazione a causa degli elevati livelli di perossinitriti nell'ambiente tumorale, la cui produzione dipende dall'attività di due enzimi, arginasi (ARG) e ossido nitrico sintetasi (NOS), entrambi iper-espressi in diversi tumori umani, sia all'interno delle stesse cellule neoplastiche che nell'infiltrato mielomonocitario. Inibendo l'attività di ARG e NOS è stato possibile recuperare la funzionalità dei linfociti tumore-specifici, sia nel tessuto tumorale umano sia in modelli tumorali murini (colon, mammella, prostata). Questo studio ha, quindi, identificato un nuovo e cruciale meccanismo di immunosoppressione mediato dal tumore e apre la strada a nuove strategie terapeutiche. Abbiamo quindi valutato una nuova classe di farmaci in grado di influire sul metabolismo dell'arginina che hanno mostrato profili di sicurezza soddisfacenti nei trials clinici di fase I-II. Al fine di ridurre la tossicità gastrointestinale dei convenzionali farmaci anti-infiammatori non steroidei, questi ultimi sono stati coniugati con un gruppo nitro (NO). La somministrazione orale di uno di questi nuovi composti, la nitro-aspirina, ha normalizzato lo stato immunitario dell'ospite portatore di tumore, aumentando il numero e la funzionalità di linfociti T tumore-antigeni specifici, e incrementando l'efficacia terapeutica della vaccinazione antitumorale.

Questi studi hanno mostrato, per la prima volta, che un approccio farmacologico è in grado d'interferire con i meccanismi usati dai tumori per sopprimere i linfociti T, rimuovere il blocco che li rende inattivi e ripristinare la loro capacità di reagire agli antigeni tumorali. Sulla base della nostra scoperta, riteniamo quindi che farmaci in grado di controllare ARG e/o NOS possano essere utili come adiuvanti in approcci immunoterapeutici contro il cancro, in quanto capaci di ricreare un ambiente adatto per l'attività del sistema immunitario. La nitroaspirina, tuttavia, ha mostrato alcuni limiti che non consentono di pensare ad un suo trasferimento clinico: non è in grado, ad esempio, di correggere la mancata risposta dei linfociti T umani infiltranti il tumore prostatico in organo-culture *in vitro*. Abbiamo sviluppato nuove piccole molecole in grado di interferire con l'attività degli enzimi indicati in precedenza e recuperare la funzionalità dei linfociti tumore-specifici *in vitro*. Dopo uno screening iniziale, almeno due

nuove molecole che hanno mostrato proprietà anti-immunosoppressive sono state testate in esperimenti con colture d'organo prostatiche umane. È interessante notare come, in contrasto alla NO-aspirina, che era inefficace sui tessuti neoplastici umani, almeno due dei nuovi composti siano risultati attivi anche in colture d'organo di cancro della prostata.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Lo scopo principale del presente progetto è quello di definire le attività biologiche, i meccanismi d'azione e le possibili sinergie fra nuove molecole di sintesi in grado di alterare lo stato infiammatorio mantenuto dalla crescita/progressione neoplastica e responsabile dell'inibizione della risposta antitumorale dei linfociti T tumore-specifici. In particolare, intendiamo valutare estesamente l'efficacia *in vivo* e gli eventuali effetti collaterali di queste nuove molecole immunomodulatrici, da sole o in combinazione con farmaci attivi su oncogeni proinfiammatori. L'obiettivo traslazionale è quello di avviare i farmaci più promettenti alla sperimentazione clinica entro 3 anni, un obiettivo alla portata dei gruppi partecipanti. Questo studio potrebbe definire una nuova classe di adiuvanti specifici per l'immunoterapia contro il cancro, un'esigenza avvertita dalla comunità scientifica internazionale come fondamentale per traghettare l'immunoterapia verso l'applicazione clinica. Accanto a questi composti, intendiamo valutare l'azione di inibitori di oncogeni studiati dai gruppi afferenti all'Istituto Superiore di Oncologia (ISO), con lo scopo di valutare se, alterando programmi trascrizionali controllati da oncogeni, sia possibile influire sullo stato infiammatorio tumore-associato ed esplorare possibili sinergie tra questi nuovi composti. L'obiettivo principale si articola in una serie di obiettivi secondari definiti di seguito:

- Obiettivo 1. Progettazione, sintesi e modulazione strutturale di nuovi farmaci NO-donatori e loro caratterizzazione chimico-fisica e funzionale sia *in vitro* che *in vivo*
  - Azione 1a. Valutazione dell'azione di farmaci NO-donatori sui meccanismi soppressori indotti in modelli sperimentali murini di crescita neoplastica.
  - Azione 1b. Valutazione dell'azione di farmaci NO-donatori sull'attività di linfociti T infiltranti il tumore in colture d'organo di tumori umani (prostata e colon).
  - Azione 1c. Caratterizzazione delle modifiche fenotipiche e funzionali apportate da farmaci NO-donatori a popolazioni cellulari umane e murine appartenenti all'immunità innata e acquisita.
  - Azione 1d. Analisi dell'azione di farmaci NO-donatori sull'angiogenesi tumore-indotta e sulla permeabilità dei vasi tumorali a proteine plasmatiche e cellule infiammatorie.
- Obiettivo 2. Nuove terapie biologiche integrate: studi *in vitro* e *in vivo*
  - Azione 2a. Valutazione in colture tumorali d'organo di inibitori di oncogeni: studio dell'azione sul microambiente infiammatorio tumorale.
  - Azione 2b. Studio di inibitori sintetici di oncogeni in associazione con farmaci NO-donatori: analisi di potenziali effetti sinergici *in vitro* e in modelli tumorali sperimentali.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Scopo principale di questo studio è la progettazione, sintesi e modulazione strutturale di nuovi farmaci capaci di modulare la risposta immune nel microambiente tumorale. In particolare, abbiamo rivolto la nostra attenzione ad alcuni composti leader, con proprietà di contrasto dell'azione immunosoppressiva esercitata dai tumori, che possano essere proposti come candidati per successive applicazioni cliniche.

Le molecole sintetizzate portano un gruppo NO-donatore sullo *scaffold* dell'acido acetilsalicilico (classe delle "NO-donor aspirins"), e si differenziano tra loro per differenziate caratteristiche di NO-rilascio.

Fino ad oggi sono stati sottoposti a screening 78 composti differenti. Sono stati eseguiti saggi di proliferazione cellulare e di valutazione delle funzioni effettrici dei linfociti T citotossici *in vitro* e *in vivo*. Lo scopo di questi esperimenti è stato quello di valutare la capacità di ripristino delle funzioni citolitiche dei linfociti T CD8+ in condizioni di immunosoppressione indotte da cellule mieloidi soppressorie murine (MDSC).

Abbiamo messo a punto un iter di screening a tappe separate e progressive che prevedeva la valutazione iniziale della capacità dei composti di ripristinare la proliferazione indotta dall'antigene nei linfociti T citotossici, per poi proseguire con saggi di ripristino delle funzioni citolitiche in condizioni di bassa o elevata immunosoppressione. Fino ad oggi, dei 16 composti risultati efficaci in proliferazione 10 sono stati in grado di ripristinare le funzioni effettrici dei linfociti T CD8+ in condizione di forte immunosoppressione. Successivamente i composti candidati sono stati sottoposti a prove di stabilità in ambiente acido, solubilità in un veicolo non tossico compatibile con la somministrazione *in vivo* e assorbimento mediante dosaggio ematico del composto somministrato in animali sani. Grazie a queste informazioni abbiamo selezionato, per gli esperimenti *in vivo*, due composti principali: AT38 e AT27. I composti scelti sono stati somministrati per valutare la capacità di ripristinare nel topo portatore di tumore la risposta tumore-specifica indotta dalla vaccinazione. Nessuno dei due composti è riuscito a normalizzare la risposta immune in animali con colon-carcinoma. Inaspettatamente, infatti, questi composti hanno mostrato un'azione negativa, dose-dipendente, sulla capacità dei linfociti T di topi normali di rispondere ad uno stimolo antigenico.

Tuttavia, AT38 è stato in grado di ridurre significativamente la produzione intratumorale di perossinitriti, uno degli obiettivi prefissati dal progetto (vedi di seguito) e ripristinare l'attivazione dei linfociti T intratumorali in organoculture di cancro prostatico umano. Abbiamo, quindi, avviato uno studio di farmaco-modulazione dei sopra citati farmaci lead, attraverso appropriate modifiche strutturali, al fine di individuare quale sia la porzione induttrice di attività anti-proliferativa sui linfociti T e gli eventuali modulatori dell'attività medesima. Questa seconda categoria di composti sarà oggetto di studio nel secondo anno del progetto. Questi problemi hanno ritardato la presentazione di un brevetto che intendiamo, comunque, conseguire entro i primi mesi del 2009.

Un interessante risvolto di queste ricerche ha riguardato le interazioni tra specie reattive del nitrogeno, come i perossinitriti, e le chemochine intratumorali. La chemochina CCL2 è in grado di agire come chemoattraente per i linfociti T citotossici (i quali sopprimono la crescita tumorale) e per le MDSC (che sopprimono, invece, la risposta antitumorale e favoriscono lo sviluppo del tumore).

I dati sperimentali hanno dimostrato che dopo trattamento con perossinitriti, la chemochina CCL2 perde la capacità di attrarre i linfociti T, mentre può ancora reclutare MDSC. Per verificare che l'incapacità dei linfociti di infiltrare la massa tumorale è correlata alla presenza di

perossinitriti nel microambiente, è stato utilizzato il farmaco AT38, di cui si è detto sopra. Il farmaco è stato somministrato per 8 giorni a topi precedentemente inoculati con il colon carcinoma C26GM. I dati indicano che il farmaco AT38 è in grado di ridurre la produzione di perossinitriti nel microambiente tumorale e di incrementare, in maniera dose-dipendente, l'afflusso di linfociti T nel tumore stesso. Questi promettenti risultati saranno oggetto di ulteriori studi in cui il trasferimento adottivo di linfociti T anti-tumoralis sarà abbinato alla somministrazione di AT38 nei giorni che precedono il trasferimento adottivo, un protocollo che dovrebbe minimizzare gli effetti secondari del farmaco NO-donatore.

AT38 sarà anche oggetto di studio delle altre Unità che hanno messo a punto dei test di permeabilità *in vitro* e *in vivo* con cui saggiare l'azione dei nuovi composti NO-donatori sulla vascolatura intratumorale. Diversi sistemi di analisi quantitativa e morfologica sono stati perfezionati e sono adesso disponibili per lo studio di quei composti NO-donatori che sembrano essere in grado di modificare le risposte vascolari e la migrazione dei linfociti T.

Inoltre, si è messa a punto una tecnica avanzata al microscopio confocale per poter seguire *in vivo* le modificazioni delle giunzioni intercellulari nei tumori. Avremo anche a disposizione una serie di marcatori surrogati di attività anti-angiogenica.

Infine, analisi citofluorimetriche avanzate condotte in collaborazione tra le diverse Unità del progetto, hanno permesso di delineare il profilo di marcatori delle cellule MDSC umane e di valutarne, in via preliminare, le variazioni in pazienti con diverse neoplasie, inclusi soggetti affetti da carcinoma prostatico.

Nell'ottica di gettare le basi per possibili terapie combinate, alcuni gruppi hanno proseguito nel loro sforzo di identificare nuove molecole che agiscano su vie di segnalazione chiave del processo neoplastico.

In accordo con i risultati esposti finora, particolare attenzione è stata rivolta ai recettori delle chemochine; in particolare, l'attività di CXCR2 e CXCR4 è stata bloccata utilizzando inibitori farmacologici e RNA interference.

La sequenza Int è stata utilizzata per trasportare all'interno del nucleo cellulare minianticorpi scFv diretti contro il dominio aminotermine di c-Myc ottenendo un'attività antiproliferativa in linee cellulari tumorali, in cui c-Myc è sovraespresso.

Inoltre, è stato approfondito lo studio del peptide 072RB, un inibitore di Bcl-XL. Quando somministrato endovena, 072RB ha rallentato/inibito in modo significativo lo sviluppo delle cellule leucemiche nei topi trattati, rispetto al controllo.

Un potenziale bersaglio nel secondo anno degli studi sarà rappresentato dalla subunità p50 NF- $\kappa$ B, un elemento chiave della trascrizione genica di enzimi che portano alla produzione di perossinitriti. Prove *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che l'assenza di p50 NF- $\kappa$ B altera significativamente il fenotipo protumorale di MDSC, ripristinando funzioni antitumorali che sono assenti. Tali osservazioni sono state parzialmente convalidate anche in tumori umani (carcinoma ovarico e carcinoma epatocellulare).

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del progetto Sviluppo di nuovi farmaci capaci di alterare il microambiente tumorale e ripristinare la risposta immune anti-tumorale**

<b>Proponente</b> ( <i>Cordinatore del progetto</i> )	<b>UO</b> ( <i>ente di appartenenza: responsabile</i> )	<b>Gruppi di ricerca afferenti</b>	<b>Responsabile scientifico del gruppo</b>
IOV (Vincenzo Bronte)	UO1 (IOV: Vincenzo Bronte)	IOV	Vincenzo Bronte
		Università Degli Studi di Torino	Alberto Gasco
		Istituto Superiore di Oncologia	Giancarlo Vecchio
		Istituto Superiore di Oncologia, Univ. degli Studi di Genova	Silvio Parodi
	UO2 (IRCCS Fondazione S. Lucia: Luca Battistini)	IRCCS Fondazione S. Lucia.,	Luca Battistini
		IRCCS Fondazione S. Lucia	Giovanna Borsellino
	UO3 (Humanitas: Antonella Viola)	Humanitas	Antonella Viola
		Humanitas	Antonio Sica
		IFOM	Elisabetta Dejana
		IEO	Francesco Bertolini

## Publicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Agliano A, Martin-Padura I, Marighetti P, Mancuso P, Rabascio C, Pruneri G, Shultz LD, Bertolini F. Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. *Int J Cancer* 2008;123:2222-7.
2. Avignolo C, Bagnasco L, Biasotti B, Melchiori A, Tomati V, Bauer I, Salis A, Chiossone L, Mingari MC, Orecchia P, Carnemolla B, Neri D, Zardi L, Parodi S. Internalization via Antennapedia Protein Transduction Domain (PTD) of a scFv antibody toward c-Myc protein *FASEB J* 2008;2:1-9.
3. Bertolini F. Chemotherapy and the tumor microenvironment: the contribution of circulating endothelial cells. *Cancer Metastasis Review* 2008;27:95-101.
4. Birdsey GM, Dryden NH, Amsellem V, Gebhardt F, Sahnun K, Haskard DO, Dejana E, Mason JC, Randi AM. The transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. *Blood* 2008;111(7):3498-506.
5. Bronte V, Mocellin S. Suppressive influences in the immune response to cancer. *J Immunother* 2008 (in corso di stampa).
6. Castellone MD, De Falco V, Rao DM, Bellelli R, Fusco A, Gutkind JS, Santoro M. The  $\beta$ -catenin Axis Integrates Multiple Signals Downstream From RET/PTC and Leads to Cell Proliferation. *Cancer Res* (in corso di stampa).
7. Cermenati S, Moleri S, Cimbri S, Corti P, Del Giacco L, Amodeo R, Dejana E, Koopman P, Cotelli F, Beltrame M. Sox18 and Sox7 play redundant roles in vascular development. *Blood* 2008;111:2657-66.
8. Contento RL, Molon B, Boullaran C, Pozzan T, Manes S, Marullo S, Viola A. CXCR4-CCR5: a couple modulating T-cell functions. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2008;105:10101-10106.
9. Dellapasqua S, Bertolini F, Bagnardi V, Campagnoli E, Scarano E, Torrisi R, Shaked Y, Mancuso P, Goldhirsch A, Rocca A, Pietri E, Colleoni M. Metronomic cyclophosphamide and

- capecitabine combined with bevacizumab in advanced breast cancer: clinical and biological activity. *J Clin Oncol* 2008;26:4899-905.
10. Dolcetti L, Marigo I, Mantelli B, Peranzoni E, Zanovello P, Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation. *Cancer Lett* 2008;267(2):216-25.
  11. Gri G, Piconese S, Frossi B, Manfroi V, Merluzzi S, Tripodo C, Viola A., Odom S., Rivera J, Colombo MP, Pucillo CE. 2008. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 2008;29(5):771-81.
  12. Kerbel RS, Benezra R, Lyden DC, Hattori K, Heissig B, Nolan D, Mittal V, Bertolini F, Rafii S. Endothelial progenitors are cellular hubs essential for neo-angiogenesis of certain aggressive tumors and metastatic transition. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 2008;105(34):E54; author reply E55.
  13. Li H, Raia V, Bertolini F, Price DK, Figg WD. Circulating endothelial cells as a therapeutic marker for thalidomide in combined therapy with chemotherapy drugs in a human prostate cancer model. *BJU International* 2008;101:884-8.
  14. Lodyga M, De Falco V, Bai XH, Kapus A, Melillo RM, Santoro M, Liu M. XB130, a tissue-specific adaptor protein that couples the RET/PTC oncogenic kinase to PI3-K pathway. *Oncogene* (in corso di stampa).
  15. Mandruzzato S, Solito S, Falisi E, Francescato S, Chiarion-Sileni V, Mocellin S, Zanon A, Rossi CR, Nitti D, Bronte V, Zanovello P. IL4R+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients, 2008, inviato per la pubblicazione.
  16. Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P, and Bronte V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid-derived suppressor cells. *Immunol Rev* 2008;222:162-79.
  17. Martin-Padura I, Bertolini F. Circulating endothelial cells in cancer: Towards marker and target identification. *Current Pharmaceutical Design* 2008;14(36):3780-9.
  18. Mennuni C, Ugel S, Mori F, Cipriani B, Iezzi M, Pannellini T, Lazzaro D, Ciliberto G, La Monica N, Zanovello P, Bronte V, Scarselli E. Preventive vaccination with telomerase controls tumor growth in genetically engineered and carcinogen-induced mouse models of cancer. *Cancer Res* 2008;68(23):9865-74.
  19. Peranzoni E, Marigo I, Dolcetti L, Ugel S, Sonda N, Taschin E, Mantelli B, Bronte V, Zanovello P. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology* 2008;212:795-812.
  20. Ponassi R, Biasotti B., Tomati V, Bruno S, Poggi A, Malacarne D, Cimoli G, Salis A, Pozzi S, Miglino M, Damonte G, Cozzini P, Spyraiki F, Campanini B, Bagnasco L, Castagnino N, Tortolina L, Mumot A, Frassoni F, Daga A, Cilli M, Piccardi F, Monfardini I, Perugini M, Zoppoli G, D'Arrigo C, Pesenti R, Parodi S. A novel Bim-BH3-derived Bcl-XL inhibitor *Cell Cycle* 2008;7(20):1-14.
  21. Rudini N, Felici A, Giampietro C, Lampugnani MG, Corada M, Swirsding K, Garrè M, Liebner S, Letarte M, ten Dijke P and Dejana E. VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J* 2008;27(7):993-1004.
  22. Shaked Y, Henke E, Roodhart J, Mancuso P, Langenberg M, Colleoni M, Daenen LG, Man S, Xu P, Emmenegger U, Tang T, Zhu Z, Witte L, Strieter RM, Bertolini F, Voest E, Benezra R, Kerbel RS. Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: Implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell* 2008;14:263-1273.
  23. Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, Potente M, Daly C, Dimmeler S, Dejana E. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol* 2008;10(8):923-34



24. Turowski P, Martinelli R, Crawford R, Wateridge D, Papageorgiou AP, Lampugnani MG, Gamp AC, Vestweber D, Adamson P, Dejana E, Greenwood J. Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. *J Cell Sci* 2008;121:29-37.
25. Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2008;48:171-197.
26. Viola A, Molon B, Contento RL. Chemokines: coded messages for T cell missions. *Frontiers in Biosciences* 2008;13:6341-53.

## RECETTORI PER CHEMOCHINE COME MARCATORI BIOLOGICI E MOLECOLARI DI RISPOSTA CLINICA E TARGET DIAGNOSTICO TERAPEUTICO

Stefania Scala

Dipartimento di Immunologia Clinica, Istituto Tumori Napoli, Fondazione G. Pascale, Napoli

### Base di partenza e razionale

Le chemochine sono una famiglia di piccole proteine di 8-10 kDa con attività chemotattica. Esse sono caratterizzate da una vasta gamma di attività biologiche, incluso la regolazione del trafficking leucocitario, la modulazione della proliferazione di cellule ematopoietiche e l'adesione alle molecole di matrice extracellulari. Recentemente è stato identificato un ruolo dell'asse chemochine-recettori per chemochine nelle neoplasie umane. Principalmente il recettore CXCR4 e la relativa chemochina, CXCL12 sono stati descritti in numerose neoplasie. CXCL12 è una chemochina di tipo C-X-C che interagisce con un recettore specifico, CXCR4, un recettore a sette-domini transmembrane, associato ad una proteina G-.

Cellule di neoplasia mammaria esprimono elevati livelli di CXCR4 e la specifica chemochina, CXCL12, è massimamente espresso ai luoghi di metastasi di neoplasia mammaria. Trattamento con anticorpi neutralizzanti per CXCR4 riducono drammaticamente la metastasi. Anche nel modello di melanoma, carcinoma del colon, carcinoma renale, del colon retto, del polmone, glioblastoma, carcinoma della prostata l'asse CXCR4/CXCL12 ha dimostrato un ruolo centrale nella metastatizzazione. Pertanto il ruolo dei recettori per chemochine e relativi ligandi ha un ruolo cruciale nel processo di metastatizzazione. Recentemente inoltre abbiamo dimostrato un ruolo prognostico per l'espressione del recettore CXCR4 in associazione all'espressione del VEGF nelle neoplasie del colon retto e un valore prognostico per l'espressione del CXCR4 nel melanoma primitivo. Per definire i meccanismi alla base e evincere strategie inibenti saranno condotti studi sia nel carcinoma prostatico umano (*in vitro*) sia nel modello murino di sviluppo spontaneo del carcinoma prostatico TRAMP (*Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*). Inoltre, numerose evidenze sperimentali suggeriscono che i tumori solidi sono generati e mantenuti da una piccola popolazione di cellule tumorali capaci di proliferare indefinitamente e di dare origine ad una progenie di cellule differenziate. L'espressione di recettori per chemochina, e in particolare del CXCR4 è stata descritta diffusamente su cellule staminali neoplastiche. Verrà pertanto valutato l'analisi del sistema CXCR4-SDF1 a livello delle cellule staminali tumorali, con l'intento di dimostrarne la rilevanza nei tumori primitivi e nelle metastasi. Valutare l'espressione di chemochine e recettori per le cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cell, CSC*), o sfere, ottenute da vari tumori solidi, in particolare tumori del polmone, del colon, melanoma e glioblastoma. I livelli di espressione, in particolare del recettore CXCR4 saranno valutati anche su cellule più differenziate ottenute mediante coltura delle sfere in condizioni differenzianti oppure direttamente sulle cellule tumorali ottenute dalla dissociazione di campioni tumorali freschi. In parallelo verranno effettuati studi simili nelle leucemie acute mieloidi nelle quali è stato possibile dimostrare che i livelli di espressione del CXCR4 rappresentano un fattore prognostico negativo. Da tali evidenze consegue che l'antagonismo del segnale mediato da CXCR4 attraverso peptidi e/o piccole molecole potrebbero rappresentare un interessante approccio terapeutico. Valutazione di

potenziali strategie terapeutiche innovative in grado di ridurre i livelli di espressione di CXCR4 sulle CSC, quindi potenzialmente di ridurre la capacità invasiva, e il processo di *homing* delle CSC nella “nicchia” metastatica attraverso identificazione e sintesi di specifici antagonisti peptidici e/o piccole molecole.

Il progetto proposto indicherà un nuovo approccio terapeutico inibendo l’asse del CXCR4. Inoltre, l’identificazione di un nuovo bersaglio terapeutico potrebbe essere rapidamente trasferita in studi clinici con inibitori del CXCR4.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi del progetto sono:

1. Valutare l’espressione di chemochine e relativi recettori in neoplasie solide e in leucemie acute mieloidi per identificare pattern di espressione. Saranno condotti anche studi nel carcinoma prostatico (*in vitro*) sia nel modello murino di sviluppo spontaneo del carcinoma prostatico TRAMP.
2. Valutare il ruolo dei recettori delle chemochine nelle cellule staminali tumorali. CSC–CXCR4 positive verranno isolate e analizzate per capacità proliferativa, di adesione e di migrazione delle diverse sotto-popolazioni di cellule staminali. In saggi *in vivo* verrà invece prevalentemente valutata la capacità metastatica delle due sottopopolazioni cellulari. Infine analizzare retrospettivamente la correlazione tra espressione di CXCR4 sulle cellule staminali e la prognosi dei pazienti.
3. Sintetizzare specifici inibitori dei recettori per chemochine o di chemochine. Innanzitutto l’obiettivo sarà quello di sintetizzare analoghi di natura peptidica/peptidomimetica del ligando endogeno, rispetto al quale risultino più stabili alla degradazione enzimatica *in vivo* e in grado di essere irrigiditi nella conformazione idonea all’interazione con il recettore prescelto mediante l’introduzione di strutture cicliche nel *backbone* peptidico, nonché con l’introduzione di aminoacidi non naturali dotati di catene laterali la cui topologia è in grado di incrementare l’affinità verso il sistema recettoriale.
4. Valutare l’effetto *in vitro* di inibitori del CXCR4 su blasti leucemici di LAM overesprimenti il CXCR4. In particolare, utilizzando modelli *in vitro* d’interazione fra cellule leucemiche e cellule stromali o molecole della matrice extracellulare, si cercherà di valutare se l’inibizione del CXCR4 sia in grado di modificare la risposta ai chemioterapici anti-leucemici. Questi studi verranno anche estesi a modelli *in vivo*.
5. Effettuare la validazione biologica delle molecole prodotte. In particolare i composti verranno testati per tossicità in un sistema cellulare *in vitro* e successivamente *in vivo*.
6. Eseguire sintesi, purificazione e analisi di complessi metallici coniugati a molecole di natura peptidica.
7. Utilizzare possibilmente in Studi Clinici di Fase I le molecole validate, nonché eventuali terapie basate sull’uso combinato di trattamenti tradizionali (chemioterapia, terapie anti-angiogenesi, ecc) e nuove molecole selezionate.
8. Allestire studi clinici basati sul valore prognostico attribuito ai pattern di espressione dei recettori delle chemochine sulle cellule staminali tumorali.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Nel corso del primo anno di attività la percentuale di cellule esprimenti il recettore CXCR4 in melanoma metastatico e nella relativa popolazione staminale tumorale sono stati valutati. Cellule tumorali CXCR4+ mostrano una maggiore capacità migratoria in saggi *in vitro* rispetto alle cellule CXCR4-. Sono in corso esperimenti *in vivo* nei quali, attraverso un sistema di *imaging in vivo*, verranno valutate lesioni a distanza. Evidenze iniziali dimostrano *in vivo* l'equivalenza tra le due popolazioni cellulari in termini di capacità tumorigenica.

Meccanismi molecolari di regolazione dell'espressione del recettore CXCR4 e dell'attività del *signaling* a valle dello stesso sono stati valutati in cellule tumorali. I dati più significativi concernono a) l'identificazione di un meccanismo di regolazione dell'espressione di CXCR4 da parte del miR146a, la cui espressione è a sua volta regolata da un fattore di trascrizione noto come PLZF (Labbaye C, 2008); e b) la scoperta di un meccanismo di regolazione mediato dal miR-219 su una glicoproteina nota come CD164 che si associa al recettore CXCR4 in seguito alla sua stimolazione. Come per il CXCR4, i livelli di espressione di CD164 aumentano con l'avanzamento del tumore, almeno nel melanoma. CD164 è espresso nei melanomi primari ma i suoi livelli incrementano nei melanomi metastatici. L'inibizione dell'espressione di CD164 *in vitro* è associata ad una ridotta capacità di migrazione.

CXCR4 è iperespresso in cellule tumorali farmaco-resistenti rispetto alle corrispondenti cellule parentali. Questo risultato si riferisce ad una linea tumorale di melanoma, ma è analogo a quanto riscontrato su blasti leucemici di leucemia mieloide acuta. I risultati inibenti la migrazione *in vitro* ottenuti somministrando a concentrazioni subcitotossiche un peptide sintetico, il *cicloTyrinv*, sembrano incoraggianti.

Peptidi inibenti il recettore CXCR4 sono stati realizzati attraverso un *Rationale Design* basato sulla omologia strutturale identificata tra la struttura del CXCL12 e vMIPII, una chemochina prodotta dall'herpes virus-Kaposi associato. Essendo stato dimostrato che l'N-terminale sia di vMIP-II che di SDF-1 $\alpha$  è sufficiente per il legame al CXCR4 e per esplicare l'attività fisiologica della chemochina (agonista per SDF-1  $\alpha$  e antagonista per vMIP-II), è stata progettata una nuova famiglia di ligandi di CXCR4. Tali peptidi sono stati sintetizzati e studi funzionali sono in corso per valutare la possibile funzione biologica inibitoria nei confronti del recettore CXCR4. I saggi funzionali prevedono saggi di inibizione di migrazione, inibizione del legame di specifici anticorpi fluorescenti contro il recettore CXCR4, inibizione dell'induzione del P-Erk ligando indotta e inibizione del rilascio del calcio. Peptidi selezionati verranno poi testati per il binding specifico al recettore attraverso test di spiazzamento del ligando marcato. Tali saggi realizzati su linee cellulari leucemiche (CEM) e linee epiteliali di melanoma (PES 43) hanno permesso di identificare 4 peptidi candidati inibenti CXCR4.

Preliminari studi *in vivo* hanno valutato il modello delle metastasi polmonari indotte delle cellule di melanoma B16 nel sistema dei topi C57Bl. Metastasi polmonari sono state verificate attraverso valutazione post sacrificio. Sono in corso di definizioni possibili rilevazioni attraverso metodiche di imaging attraverso sonde fluorescenti, TC-PET dedicate ai piccoli animali e metodiche di RMN.

Possibile ruolo diagnostico del recettore CXCR4 nei gliomi è stato descritto; l'espressione del CXCR4 discriminava tra astrocitoma di secondo grado e astrocitomi anaplastici e glioblastoma multiforme. Inoltre, l'analisi quantitativa delle aree peritumorali nelle immagini MR pesate in T2, sembravano correlare con i livelli di espressione di CXCR4.

La valutazione di parametri M in relazione alla crescita di un modello di glioblastoma umano ottenuto dall'impianto intracerebrale di cellule U87 nel topo nudo è in corso. La crescita

tumorale è stata valutata mediante immagini MR pesate in T1 dopo somministrazione di Gadolinio e in T2.

Verranno inoltre valutate, *in vitro* e *in vivo*, le potenziali attività terapeutiche di antagonisti di come AMD3100 e di peptidi inibitori, sintetizzati dall'Istituto Tumori Pascale di Napoli.

Analisi dell'espressione di CXCR4 in biopsie di tumore e su modelli *in vivo* di neoplasia prostatica (TRAMP) è in corso. Sieri e apparato urogenitale da topi TRAMP e wild type (WT) di differenti età sono stati raccolti. Lesioni PIN insorgono già alla V/VI settimana di vita. Intorno alla settimana 11-12, quando gli animali sviluppano tolleranza verso antigeni tumore associati le lesioni PIN hanno invaso quasi tutti gli acini prostatici. Un franco adenocarcinoma e la possibilità di metastasi ai linfonodi paraortici è caratteristica di topi di oltre 20 settimane di vita. In una percentuale variabile di topi TRAMP di questa età (5-20%) si sviluppa una neoplasia prostatica neuroendocrina, particolarmente insensibile agli androgeni e con alte potenzialità metastatiche ad organi viscerali.

A breve inizieranno le analisi in immunohistochimica e citofluorimetria per valutare l'espressione di CXCR4/SDF1 sulle cellule neoplastiche e stromali nel modello TRAMP. Contemporaneamente saranno condotte analisi su preparati istologici umani di neoplasie prostatiche.

Le CSC sono state isolate da tessuto prostatico sano e da lesioni neoplastiche TRAMP in differenti stadi (da PIN a tumore neuroendocrino). Sono state quindi isolate una linea di cellule staminali da prostata murina sana e almeno 4 linee di CSC da lesioni PIN, adenocarcinoma e tumore neuroendocrino. Mentre la linea di cellule staminali prostatiche da topo WT non è stata in grado di generare tumore se inoculate in topo immunodeficiente, le linee di CSC fino ad oggi valutate sono state in grado di generare tumori sia ortotopici sia sottocutanei.

L'analisi citofluorimetrica delle CSC ha mostrato una scarsa espressione di CXCR4 (<10%), apparentemente non modificabile dai successivi passaggi *in vitro*. Espressione di chemochine e loro recettori verrà valutata su cellule tumorali differenziate, ottenute mediante coltura delle sfere in condizioni differenzianti oppure direttamente sulle cellule tumorali ottenute dalla dissociazione di campioni tumorali freschi. La valutazione retrospettiva sulle cellule staminali tumorali di CXCR4 e altre chemochine, permetterà di definire il valore predittivo del pattern di espressione di CXCR4, da solo o in associazione, sulla formazione di metastasi.

Le concentrazioni degli intermedi del metabolismo della fosfatidilcolina (PC), in particolare la fosforilcolina (PCho) e glicerofosforilcolina (GPC), possono rappresentare biomarcatori metabolici della risposta al trattamento (proliferazione cellulare, apoptosi e sopravvivenza, angiogenesi).

Nel primo anno abbiamo studiato le variazioni quantitative dei metaboliti colinici in modelli *in vitro* di cellule linfoblastoidi umane (CEM) private di siero e poi ristimolate con siero fetale (10%), oppure con chemochina SDF-1  $\alpha$ . Dati preliminari mostrano che i livelli intracellulari di PCho aumentavano significativamente in cellule private di siero rispetto alle cellule di controllo in presenza di siero. La riesposizione al siero (10%) o alla sola chemochina SDF1-  $\alpha$ , induceva livelli di PCho a valori basali. Risultati preliminari hanno inoltre indicato che le cellule trattate con AMD3100 presentavano un contenuto intracellulare di PCho intermedio tra cellule di controllo e cellule private di siero.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del progetto Recettori per chemochine come marcatori biologici e molecolari di risposta clinica e target terapeutico**

<b>Proponente</b> ( <i>Cordinatore del progetto</i> )	<b>UO</b> ( <i>ente di appartenenza: responsabile</i> )	<b>Gruppi di ricerca afferenti</b>	<b>Responsabile scientifico del gruppo</b>
Pascale (Stefania Scala)	UO1 (Pascale: Stefania Scala)	Pascale	Alfredo Siani
		Pascale	Stefania Scala
		Pascale	Vincenzo Rosario Iaffaioli
		Pascale	Paolo del Rio
		Pascale	Claudio Arra
		CNR	Pietro Omodeo
		CNR	Stefania de Luca
		ISS	Alessandra Carè
		ISS	Ugo Testa
		ISS	Franca Podo
		ISS	Giuseppe Arancia
		HSR	Matteo Bellone
		HSR	Rossella Galli
		HSR	Claudio Doglioni
		UO2 (ISS: Ruggero Marchiano De Maria)	
UO3 (HSR: Matteo Bellone)			

## Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Felicetti F, Errico MC, Bottero L, Segnalini P, Stoppacciaro A, Biffoni M, Felli N, Mattia G, Petrini M, Colombo MP, Peschle C, Carè A. The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer Res* 2008;68(8):2745-54.
2. Felicetti F, Errico MC, Segnalini P, Mattia G, Carè A. MicroRNA-221 and -222 pathway controls melanoma progression. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8(11):1759-65.
3. Labbaye C, Spinello I, Quaranta MT, Pelosi E, Pasquini L, Petrucci E, Biffoni M, Nuzzolo ER, Billi M, Foà R, Brunetti E, Grignani F, Testa U, Peschle C. A three-step pathway comprising PLZF/miR-146a/CXCR4 controls megakaryopoiesis. *Nat Cell Biol* 2008;10(7):788-801.

# SVILUPPO DI NUOVE TERAPIE NEI SARCOMI MUSCOLOSCHIELETRICI: IMMUNOTERAPIA E TARGET TERAPIA A CONFRONTO

Piero Picci

Dipartimento di Oncologia Muscoloscheletrica, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna

## Base di partenza e razionale

I sarcomi muscoloscheletrici rappresentano un gruppo di tumori relativamente rari per i quali esiste una grandissima esigenza di nuovi schemi di trattamento che associno ad una più elevata probabilità di guarigione anche effetti di tossicità collaterale a lungo termine ridotti rispetto a quelli delle terapie antitumorali usate correntemente.

Al fine di raggiungere questo scopo, si possono prendere in considerazione diversi approcci terapeutici innovativi tra cui l'utilizzazione di anticorpi monoclonali, che sta assumendo in questi ultimi anni un ruolo di primo piano nel trattamento di tumori solidi precedentemente considerati incurabili. Ciò è dovuto ad una serie di fattori che includono elevata efficacia e buona tollerabilità dell'immunoterapia, se comparata con analoghi trattamenti antitumorali. Inoltre, dai dati presenti in letteratura e derivanti da numerose sperimentazioni cliniche, risulta evidente che la buona risposta al trattamento basato sulla sola somministrazione dell'anticorpo monoclonale in pazienti affetti da tumori solidi metastatici (es. Herceptin-Genentech, per il carcinoma mammario metastatico HER-2/neu+; Herbitux- ImClone e Avastin-Genentech, per il carcinoma metastatico coloretale) diventa eccellente se combinata con chemioterapie specifiche. Alla luce di queste osservazioni e considerando la natura estremamente aggressiva dei sarcomi muscoloscheletrici, emerge la necessità di verificare se un'immunoterapia combinata con la somministrazione di chemioterapici specifici sia una strategia di cura efficace e sufficientemente sicura.

Nel corso della prima fase di questo progetto verranno quindi valutate in parallelo le potenzialità di tre diversi approcci immunoterapeutici indirizzati contro le molecole CD99 e Fibronectina, oltre che contro il proteoglicano NG2. Simultaneamente, si analizzerà l'efficacia preclinica di un nuovo agente antitumorale di recente sintesi, il 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)texano (NBDHEX), diretto contro l'enzima glutatione trasferasi, coinvolto nella detossificazione dei principali farmaci utilizzati nei regimi di polichemioterapia dei tumori muscoloscheletrici, che è risultato essere molto attivo in diverse linee cellulari di tumori umani.

Sulla base dei risultati ottenuti nella prima fase (primi 24 mesi) del programma di ricerca, la seconda parte dello studio (25-36 mesi) prevederà lo sviluppo dell'approccio che ha dato i migliori risultati preclinici (con produzione in GMP – *Good Manufacturing Practice* –, se e dove necessario) oltre che il completamento degli studi tossicologici e di farmacocinetica al fine di arrivare, al termine del progetto, ad avere tutti i prerequisiti per avviare uno studio clinico di fase I-II nei sarcomi muscoloscheletrici.

L'articolazione del programma di ricerca in due fasi distinte e successive, delle quali la prima è propedeutica alla seconda, consentirà di finalizzare le risorse dell'ultimo anno del progetto alla strategia terapeutica risultata più promettente e con le migliori caratteristiche di attuazione in uno studio clinico controllato di fase I-II.

Inoltre, un ulteriore valore aggiunto di questo progetto è rappresentato dal fatto che le diverse UO coinvolte sono altamente specializzate nello studio dei sarcomi muscoloscheletrici e/o nei vari campi d'indagine previsti dal programma di ricerca, da cui ne consegue un'elevata complementarità delle rispettive conoscenze e competenze.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi del progetto sono:

- *Generazione di un anticorpo umano specifico per CD99 utilizzabile clinicamente*
  - selezione di anticorpi monoclonali ricombinanti umani in forma di *single chain fragment variable* (scFv) diretti verso epitopi extracellulari del CD99;
  - aumento dell'affinità degli scFv-CD99 specifici per mezzo di processi di maturazione e generazione di minianticorpi divalenti e/o di IgG intere mediante ingegneria genetica;
  - analisi *in vitro* e *in vivo* per valutare l'efficacia antitumorale degli anticorpi isolati e per verificarne la potenziale applicabilità terapeutica e le interazioni con i più comuni chemioterapici.
- *Valutazione pre-clinica dell'efficacia di NBDHEX*
  - analisi dell'efficacia *in vitro* di NBDHEX e delle interazioni con i chemioterapici convenzionali;
  - analisi del meccanismo di morte cellulare indotto dal trattamento con NBDHEX;
  - analisi dell'efficacia *in vivo* (nell'animale da esperimento) di NBDHEX, usato sia come farmaco singolo che in associazione ai chemioterapici convenzionali. Tali analisi saranno anche volte ad identificare il profilo farmacocinetico e gli effetti di tossicità collaterale di NBDHEX per una eventuale pianificazione di studi di fase I-II.
- *Definizione del significato prognostico e terapeutico del proteoglicano NG2*
  - valutazione della capacità di NG2 di predire la presenza di metastasi occulte e/o l'evoluzione metastatica del tumore;
  - delucidazione dei meccanismi cellulari e molecolari tramite i quali NG2 controlla l'interazione cellula tumorale-microambiente ospite;
  - selezione di sequenze peptidiche di NG2 in grado di indurre una risposta immunologica citotossica in topi NOD-SCID "umanizzati", utilizzabili per pianificare sperimentazioni cliniche di fase I-II.
- *Definizione dell'efficacia di anticorpi umani ricombinanti contro il dominio EDB della Fibronectina*
  - studio immunoistochimico dell'espressione di EDB in sarcomi muscoloscheletrici umani e in modelli sperimentali murini;
  - studi preclinici di terapia con TNF-alpha coniugato ad anticorpo anti-EDB in almeno tre diversi modelli murini di sarcomi muscoloscheletrici;
  - sul modello nel quale si saranno ottenuti i risultati migliori, completamento degli studi *in vitro* e *in vivo* per la pianificazione di studi clinici di fase I-II.



## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Nel corso della prima fase di questo progetto sono state valutate, in parallelo, le potenzialità di tre diversi approcci immunoterapeutici indirizzati contro le molecole CD99 e Fibronectina, oltre che contro il proteoglicano NG2. Simultaneamente, è stata analizzata l'efficacia preclinica di un nuovo agente antitumorale di recente sintesi, il 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio) hexanol (NBDHEX), diretto contro l'enzima glutatione-S trasferasi, coinvolto nella detossificazione dei principali farmaci utilizzati nei regimi di polichemioterapia dei tumori muscoloscheletrici.

Le varie UO/Gruppi di Ricerca del progetto si sono integrate per effettuare e sviluppare gli studi inerenti agli approcci terapeutici sopra menzionati come segue:

- i gruppi di ricerca IOR-Scotlandi, IST-Borsi, CBA-Zardi, ISS-Cianfriglia e INT-Colombo si sono integrati per quanto riguarda il targeting immunoterapeutico dell'antigene di membrana CD99, al fine di generare un anticorpo umano CD99-specifico e, dopo identificazione di un modello animale adeguato, valutarne gli effetti di tossicità collaterale *in vivo*, in particolare a carico delle cellule del sangue periferico e della popolazione staminale del midollo osseo.
- i gruppi di ricerca IOR-Serra e UniRoma-Caccuri hanno cooperato per la parte del programma di ricerca inerente la valutazione pre-clinica e la definizione delle potenzialità terapeutiche di NBDHEX, in particolare per quanto riguarda l'efficacia *in vitro* e le interazioni con i farmaci chemioterapici convenzionali di questo agente antitumorale e per definirne le basi biomolecolari dell'interazione con le glutatione trasferasi umane.
- i gruppi di ricerca UniParma-Perris e IOR-Benassi si sono occupati del targeting immunoterapeutico del proteoglicano NG2, al fine di definire il ruolo di questa macromolecola nell'insorgenza di metastasi, consolidarne il valore prognostico e predittivo e identificare sequenze immunodominanti da riprodurre come vaccini peptidici in sostituzione di anticorpi anti-idiotipo, già clinicamente sperimentati su pazienti con melanoma.

Tutte queste attività di ricerca proseguiranno nel 2° anno del progetto, al termine del quale, in base alle evidenze ottenute, sarà selezionato l'approccio risultato come più promettente per un potenziale trasferimento nella pratica clinica, sul quale verranno focalizzati i successivi 12 mesi di attività di ricerca.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del progetto Sviluppo di nuove terapie nei sarcomi muscoloscheletrici: immunoterapia e target terapia a confronto**

<b>Proponente</b> ( <i>Cordinatore del progetto</i> )	<b>UO</b> ( <i>ente di appartenenza: responsabile</i> )	<b>Gruppi di ricerca afferenti</b>	<b>Responsabile scientifico del gruppo</b>	
IOR (Piero Picci)	UO1 (IOR: Piero Picci)	IOR	Katia Scotland	
		IOR	Massimo Serra	
		INT	Mario Colombo	
		Centro di Biotecnologie Avanzate (CBA), Genova	Luciano Zardi	
		ISTGE	Laura Borsi	
		ISS	Maurizio Cianfriglia	
		Università "Tor Vergata" (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche)	Anna Maria Caccuri	
		UO2	Roberto Perris	
		(CRO: Roberto Perris)	IOR	Maria Serena Benassi

## Publicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Benassi MS, Pazzaglia L, Chiechi A, Alberghini M, Conti A, Cattaruzza S., Wassermann B., Picci P., Perris R. NG2 expression predicts the metastasis formation in soft-tissue sarcoma patients. *J Orthop Res* 2009;27(1):135-40.
2. Pasello M, Michelacci F, Scionti I, Hattinger CM, Zuntini M, Caccuri AM, Scotlandi V, Picci P, Serra M. Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma. *Cancer Res* 2008;68:6661-8.

# TERAPIE BIOLOGICHE COMBinate E PERSONALIZZATE NEI TUMORI SOLIDI: STUDI DI FASE I-II

Giorgio Parmiani  
*Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor, Milano*

## Base di partenza e razionale

Precedenti studi hanno dimostrato che l'immunoterapia, mentre induce frequenti risposte biologiche nei pazienti trattati, raramente influenza la storia naturale del tumore. Esistono altri approcci terapeutici che, pur avendo da soli un'efficacia limitata, hanno la potenzialità di amplificare la funzione del sistema immunitario. Quindi proponiamo trials di fase I-II in cui la vaccinoterapia viene combinata con questi trattamenti, prevalentemente biologici che, utilizzando meccanismi rivelati da precedenti studi pre-clinici e clinici, possono migliorare la risposta immunologica e clinica in pazienti con neoplasie farmaco-resistenti. Inoltre verranno introdotte nei protocolli manipolazioni destinate a inibire fattori che recentemente si sono dimostrati capaci di ridurre la risposta immune alle terapie immuno-biologiche. Tra questi fattori i più importanti sono la presenza di linfociti T regolatori (Treg) e le cellule mieloidi soppressive (MSC). Infatti, cercheremo di aumentare tale risposta somministrando ATRA (All trans Retinoic Acid) per ridurre le MSC, e ciclofosfamide per impedire la funzione soppressiva dei linfociti T regs.

Valuteremo anche se il polimorfismo di alcuni geni può spiegare la variabilità individuale della risposta biologica e clinica al trattamento. Sarà anche analizzata la risposta immunologica sia anticorpale sia cellulare vaccino- e tumore-specifica nel sangue e, quando possibile, nei linfonodi e nell'infiltrato neoplastico. Poiché il ruolo dell'immunità innata è ignoto nell'attivazione della risposta adattativa dipendente, valuteremo l'utilità di monitorare la concentrazione di un pannello di citochine e chemochine seriche (mediante Bioplex) nonché di marcatori della immunità innata e di attivazione alternativa dei macrofagi.

Attiveremo quattro studi clinici che combinano la vaccinazione con i seguenti approcci terapeutici nelle patologie indicate:

1. Studio di fase II randomizzato di IFN- $\alpha$ 2b ad alte dosi somministrato per un mese in combinazione con un vaccino peptidico in pazienti con melanoma metastatico (razionale: recenti risultati indicano la capacità di IFN- $\alpha$  di amplificare le risposte immuni);
2. Studio di fase I-II di vaccinazione con oncolisato cellulare autologo associato ad IFN- $\alpha$  in pazienti con melanoma metastatico (razionale: gli antigeni unici espressi dal tumore autologo possono evocare forti risposte immuni amplificabili dall'IFN- $\alpha$ , iniettato ad alte dosi nella sede di inoculo del vaccino). In entrambi gli studi, obiettivi primari sono la tossicità e la risposta immune anticorpo e cellulo-mediata. Come obiettivo secondario verrà valutata la risposta clinica.
3. Studio di fase I-II di combinazione di chemio/tomoterapia e vaccino peptidico in pazienti con carcinoma spinocellulare della testa/collo localmente avanzato (razionale: il trattamento chemio/radiante migliora il controllo locale, induce rilascio di antigene delle cellule tumorali e aumenta l'espressione del complesso HLA/antigene sulla loro

membrana aumentando così il bersaglio per la risposta immune indotta dal vaccino che potrebbe migliorare il controllo delle metastasi a distanza).

4. Studio di fase I-II di combinazione di vaccino peptidico e del reagente anti-angiogenico NGR-hTNF attualmente in fase II, come aggiunta alla chemioterapia in pazienti con cancro del colon (razionale: risultati pre-clinici indicano un potenziamento dell'effetto antitumorale della vaccinazione in seguito alle alterazioni dell'endotelio tumorale). La risposta clinica verrà valutata secondo i criteri RECIST.

A livello pre-clinico si propongono tre studi i cui risultati potranno avere un rapido trasferimento clinico anche sui protocolli proposti. Il primo consiste nella ri-analisi della immunogenicità dei peptidi dell'antigene hTERT già utilizzato in clinica come vaccino con risultati discordanti. Nel secondo verranno identificati epitopi promiscui dell'antigene survivina riconosciuti da linfociti T CD4 così da poterli usare per stimolare linfociti dei pazienti. Nel terzo si verificherà se un trattamento de-metilante *in vitro* possa aumentare l'espressione di antigeni e quindi l'immunogenicità dei tumori e se ciò sia ottenibile anche *in vivo* utilizzando farmaci appropriati.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivo principale è di valutare se la combinazione di vaccino con altri agenti terapeutici (citochine, es. IFN- $\alpha$ ), chemio/radioterapia (tomoterapia), nuovo reagente anti-vascolare (NGR/TNF) può indurre una più forte e duratura risposta immunologica e una migliore risposta clinica in confronto (storico) alla sola vaccinazione già praticata con gli stessi vaccini peptidici in pazienti con le patologie e lo stadio di malattia indicato. Inoltre se la riduzione dei principali effetti soppressori indotti dalla presenza del tumore (MSC, linfociti T reg) può tradursi in un significativo miglioramento della risposta immunologica e clinica.

Obiettivi secondari sono:

- Nello studio di vaccinazione con oncolisato di cellule di melanoma autologo, valutare se, interferendo coi meccanismi soppressori (Treg e MSC) e migliorando l'attivazione delle cellule dendritiche mediante somministrazione *in vivo* di IFN- $\alpha$ , si ottengono risposte di linfociti T dirette anche contro gli antigeni unici (da mutazione) in confronto a quelli cross-reagenti "self";
- Valutare se la risposta immune al vaccino si associa a varianti alleliche (polimorfismo) di geni coinvolti nella risposta immune dei singoli pazienti;
- Valutare se l'effetto dell'IFN- $\alpha$  di amplificazione della risposta autoimmune può far aumentare anche la risposta al vaccino, condizione essenziale per ottenere anche una risposta clinica;
- Valutare l'utilità di molecole marcatrici innovative (Pentrassine) per il monitoraggio della risposta macrofagica/infiammatoria (immunità innata);
- Valutare la potenzialità immunogena *in vitro* di hTERT, un antigene universale già usato come vaccino in clinica con risultati contraddittori, con lo scopo di verificare se la immunizzazione genera CTL capaci di lisare cellule tumorali e non solo di riconoscere cellule presentanti l'epitopo;
- Valutare la possibilità di aumentare la risposta ad antigeni tumorali (soprattutto di melanoma) in seguito a stimolazione con cellule trattate con composti de-metilanti.

Obiettivo generale è di verificare se qualcuna delle combinazioni terapeutiche testate può generare una frequenza e intensità di risposta immune ai vaccini tale da tradursi in una significativa risposta clinica misurata come risposta del tumore (RECIST) o come tempi di sopravvivenza rispetto a controlli storici.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Il progetto è basato sull'attivazione di studi clinici di combinazione tra farmaci biologici e vaccinazione con peptidi, oltre a studi associati o paralleli di laboratorio destinati a migliorare le conoscenze sui meccanismi alla base della combinazione proposta o di monitoraggio biologico/immunologico. A seguito della rimodulazione del progetto, sono stati proposti tre studi clinici:

- Uno coordinato dall'Unità di IST di Genova: Studi di fase I-II di vaccinazione con oncolisato cellulare di melanoma autologo associato ad IFN- $\alpha$ 2b in pazienti con melanoma metastatico;
- Due coordinati da HSR (Milano) e comprendenti: a) Studio di fase II randomizzato di IFN- $\alpha$ 2b ad alte dosi in combinazione con vaccino peptidico in pazienti con melanoma metastatico (M1a/b); b) Studio di fase I-II di combinazione di vaccino peptidico e di NGR/TNF in pazienti con melanoma o carcinoma del colon.

Per quanto attiene agli studi clinici, si è proceduto alla stesura dei protocolli ma il loro inizio non è ancora potuto avvenire per un imprevisto ritardo relativo alla non disponibilità dei vaccini peptidici causato dalla ditta farmaceutica responsabile della produzione dei vaccini stessi (Merck Biosciences AG). Dopo molte discussioni che hanno interessato tutti i gruppi europei di questa area di ricerca si è identificata un'altra ditta che fornirà i peptidi necessari entro 4 mesi. Questo tempo verrà utilizzato per soddisfare i requisiti regolatori e per il coinvolgimento degli altri centri partecipanti.

Il progetto si è sviluppato attraverso l'attività di diversi gruppi di ricerca:

- *Gruppo di Ricerca Angelo Corti (HSR)*  
Studi sui modelli animali hanno dimostrato che il TNF- $\alpha$  possiede un'attività antitumorale che dipende da un meccanismo indiretto associato con la distruzione selettiva e danno vascolare del tumore e con l'attivazione di meccanismi immuni. Scopo dello studio è valutare se la combinazione di NGR-TNF con vaccino induce risposte immuni più forti e durevoli e una migliore risposta clinica e in confronto con la sola immunoterapia. Nel primo anno sono stati condotti studi in modelli animali per identificare biomarcatori per il monitoraggio dell'attività biologica di NGR-TNF. I risultati indicano che basse dosi di NGR-TNF inducono meglio del TNF varie citochine e chemokine in circolo (es. IL-2, IL-6, IP-10, linfotattina, MCP-1, MIP-1beta, oncostatina M, TIMP-1). In particolare, MIP-1beta veniva indotto da NGR-TNF ma non da TNF. L'induzione di queste citokine risultava più alta e persistente che quella ottenuta con TNF, essendo misurabile dopo 5 ore dal trattamento.
- *Gruppo di Ricerca Paolo Dellabona (HSR)*  
Compito di questo gruppo è l'identificazione di epitopi della proteina survivina (SVV) riconosciuti da linfociti T CD4+ e il loro utilizzo per lo studio della risposta spontanea in pazienti con tumori esprimenti SVV ed eventualmente da utilizzare in protocolli di vaccinazione antitumorale in associazione ad epitopi di classe I. Mediante l'utilizzo dell'algoritmo TEPITOPE abbiamo identificato 9 sequenze di SVV e sono stati sintetizzati peptidi sintetici corrispondenti. I peptidi sono stati utilizzati *in vitro* per stimolare linfociti T CD4+ isolati dal sangue di 7 soggetti normali e 7 pazienti con melanoma metastatico. I risultati sono in fase di elaborazione.

- *Gruppo di Ricerca Michele Maio (Ospedale Universitario, Siena)*  
Scopo di questo gruppo è di condurre studi pre-clinici per definire il potenziale immunomodulante del farmaco ipometilante il DNA 5-aza-2'-deossicitidina (5-AZA-CdR), e il suo eventuale sinergismo con citochine e inibitori dell'istone deacetilasi (HDACi), su linee cellulari di melanoma e carcinoma del colon. Nel primo anno della ricerca abbiamo dimostrato che cellule di melanoma esprimono gli antigeni di tipo Cancer Testis (CTA) e che l'espressione dei CTA correla con uno stato demetilato dei rispettivi promotori. La valutazione degli effetti sinergici fra 5-AZA-CdR e HDACi ha mostrato che la combinazione dei due farmaci porta ad un aumento di 2-4 volte nei livelli di espressione di diversi CTA rispetto al trattamento con la sola 5-AZA-CdR.
- *Gruppo di Ricerca Cecilia Garlanda (Istituto Clinico Humanitas, Milano)*  
Scopo di questo gruppo è il trasferimento clinico delle conoscenze acquisite sulle molecole infiammatorie da utilizzarsi quali biomarcatori diagnostici e/o prognostici e come co-adiuvanti delle terapie anti-tumorali convenzionali.  
Nel primo anno di attività questa Unità si è focalizzata sulla pentraxina lunga PTX3, identificata come nuova proteina di fase acuta che risulta espressa nella risposta infiammatoria e svolge il duplice ruolo di difesa contro i patogeni e di proteina strutturale della matrice extra-cellulare. Il progetto si prefigge di studiare i livelli di PTX3 in questi pazienti. Alcuni tumori umani esprimono PTX3, e il trasferimento genico di PTX3 in modelli sperimentali rallenta o inibisce la crescita del tumore. Quindi PTX3 può essere un importante marcatore del micro-ambiente infiammatorio di alcuni tumori.  
Tra i risultati ottenuti, è stato possibile distinguere forme tumorali che producono PTX3 (liposarcomi, condrosarcomi, gliomi) e altre che non producono PTX3 (tumori polmonari, tumori mammari).
- *Gruppo di Ricerca Licia Rivoltini (Fondazione IRCCS INT, Milano)*  
Il gruppo ha valutato l'influenza che cellule regolatorie del sistema immunitario svolgono nei confronti di risposte immunitarie indotte da vaccini anti-tumore. Abbiamo quindi analizzato, in uno studio di vaccinazione già in corso in pazienti con melanoma in stadio iniziale, la frequenza di cellule mieloidi soppressive (MDSC) e di Treg in campioni di sangue ottenuti prima del trattamento che consisteva nell'inoculo ripetuto di peptidi derivati da diversi antigeni tumorali. I peptidi venivano somministrati per via sottocutanea, emulsionati con Montanide, e l'inoculo veniva preceduto dalla somministrazione e.v. di basse dosi di ciclofosfamide, finalizzata a ridurre la frequenza di cellule soppressive. Questa immunizzazione ha indotto nel 60% dei pazienti trattati un incremento significativo e prolungato dei linfociti T specifici per gli antigeni vaccinali.  
Le MDSC, la cui frequenza nei donatori è di  $0,2\pm 0,3\%$ , risultano già espanse in pazienti con melanoma in stadio II e III con frequenze sovrapponibili a quelle di pazienti con malattia avanzata. Questi risultati suggeriscono che il melanoma è in grado, anche in fasi iniziali, di influenzare la mielopoiesi favorendo l'accumulo di cellule soppressive. Nonostante il numero dei pazienti analizzati sia ancora limitato, un'analisi preliminare suggerisce l'esistenza di correlazione inversa tra la frequenza di MDSC e la risposta immunitaria al vaccino. Una simile analisi è stata effettuata anche per le Treg, ma la frequenza nel sangue periferico delle Treg, ( $0,32\pm 0,51$  nei donatori) non mostra incrementi in pazienti con melanoma né una correlazione con la risposta immunologia.
- *Gruppo di Ricerca Maria Ferrantini/Enrico Proietti/Eleonora Aricò (ISS, Roma)*  
Questo gruppo ha condotto studi pre-clinici di validazione sull'analisi di Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) sul DNA dei pazienti per mettere a punto un sistema per valutare la presenza di SNP in geni codificanti per proteine associate a IFN-I e vedere se tali

poliformismi hanno un ruolo nella risposta al trattamento con vaccini e IFN- $\alpha$ . L'analisi viene condotta sui linfociti del sangue periferico dei pazienti e verificherà le possibili differenze in pazienti che riceveranno IFN ad alte dosi (HDI) o PEG-IntronA (24 ore) sulla modulazione del profilo di espressione genica dei linfociti stessi. Si studierà inoltre se la modulazione indotta da IFN- $\alpha$  sul profilo genico dei linfociti persiste nel tempo e se il fenomeno è indotto da HDI, PEG-IntronA o da entrambi i farmaci somministrati in combinazione col vaccino. La stessa analisi verrà condotta dopo la somministrazione del vaccino per verificare se l'espressione degli SNP è differenzialmente influenzata dalla precedente somministrazione di HDI or PEG-Intron. Si verificherà inoltre se queste eventuali "gene signatures" correlano con la risposta immunologica al vaccino e con quella clinica dei pazienti trattati.

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del progetto Terapie biologiche combinate e personalizzate nei tumori solidi: studi di fase I-II**

Proponente (Coordinatore del progetto)	UO (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
HSR (Giorgio Parmiani)	UO1 (HSR: Giorgio Parmiani)	HSR	Giorgio Parmiani
		HSR	Ferruccio Fazio
		HSR	Angelo Corti
		HSR	Paolo Dellabona
		INT	Licia Rivoltini
		Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena	Michele Maio
		ISS	Maria Ferrantini
		Humanitas	Cecilia Garlanda
		ISTGE	Paola Queirolo
		ISTGE	Paolo Bruzzi
		ISTGE	Silvano Ferrini
		IOV	Paola Zanovello
		IOV	Vanna Chiarion-Sileni
		Università di Padova	Carlo Riccardo Rossi
		UO2 (ISTGE: Paola Queirolo)	
UO3 (IOV: Paola Zanovello)			

## Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Mennuni C, Ugel S, Mori F, Cipriani B, Iezzi M, Pannellini T, Lazzaro D, Ciliberto G, La Monica N, Zanovello P, Bronte V, Scarselli E. Preventive vaccination with telomerase controls tumor growth in genetically engineered and carcinogen-induced mouse models of cancer. *Cancer Res* 2008;68(23):9865-74.

# NUOVE MOLECOLE E PEPTIDI QUALI FARMACI REGOLATORI DEL CICLO CELLULARE E DELLA RISPOSTA A CHEMIOTERAPICI NEI TUMORI EPITELIALI E CUTANEI

Gerry Melino

Laboratorio di Biochimica, Istituto Dermopatico dell'Immacolata IRCCS, Roma

## Base di partenza e razionale

La famiglia di p53 comprende tre membri: p53, p63 e p73. p53 è il gene mutato più frequentemente nei tumori umani. È un fattore trascrizionale, che è attivato rapidamente come risposta a danni genotossici od ad attivazione d'oncogeni, regolando l'espressione di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi. Analogamente a p53, p73 e p63 contengono un dominio di transattivazione (TA), un dominio di legame al DNA (DBD) e un dominio d'oligomerizzazione (OD). La struttura genica di p63 e p73 è molto complessa in quanto entrambi i geni codificano per diverse isoforme e per diverse varianti che derivano da splicing alternativi e da inizi di trascrizione diversi. In particolare, le varianti  $\Delta N$  mancano del dominio TA e quindi agiscono da dominanti negativi. Dal momento che p53, p63 e p73 sono altamente omologhi, questi geni dovrebbero avere funzioni ridondanti. Infatti, sia p53 che p73 sono in grado di bloccare la crescita cellulare e indurre apoptosi. Conseguentemente, sia p63 che p73 sono coinvolti nella tumorigenesi, in particolare nei tumori epiteliali. Le proteine p53/p63/p73 cooperano nella tumorigenesi regolando l'apoptosi. Lo "status" dei geni della famiglia di p53 è un fattore importante nella prognosi e chemiosensibilità tumorale: l'azione di p63/p73 diventa quindi essenziale nei frequenti casi di inattivazione di p53. Infatti, deregolazioni di p63/p73 inducono resistenza alla citotossicità da chemioterapici.

Similmente a p53, l'espressione di p63 e p73 è mantenuta a bassi livelli nelle cellule di mammiferi, e la loro induzione e attivazione cellulare è principalmente controllata a livello post-traduzionale. Sia p63 che p73 sono ubiquitinati *in vivo* e degradati attraverso la via proteolitica proteasoma-dipendente. Mentre p53 è degradato da mdm2, noi abbiamo scoperto che la degradazione di p63/p73 è regolata da Itch, una ubiquitina E3 ligasi contenente HECT e appartenente alla famiglia Nedd4. Itch ha come bersaglio sia le varianti TAp73 che  $\Delta Np73$ , tenendo i loro livelli proteici bassi in condizioni normali. Oltre a p63/p73, Itch reprime la via di Hedgehog e dei suoi trasduttori (proteine Gli), la cui attivazione è frequentemente responsabile dell'insorgenza di tumori neuroectodermici.

Oltre ai farmaci anti-Itch per regolare i livelli di p63/p73, genereremo inibitori delle interazioni molecolari di p73. Sono stati identificati peptidi sintetici (che rappresentano la sequenza del dominio di legame specifico al DNA della proteina p73) che interagendo con la proteina p53 mutata ripristinano la funzione apoptotica della proteina p73. Il bersaglio molecolare individuato è rappresentato dal complesso proteico mutp53/p73, la cui attività oncogenica e il diretto coinvolgimento nella chemioresistenza di tumori a p53 mutata è stato documentato da vari studi *in vitro* e *in vivo*. Oltre ad usare Itch come target farmacologico diretto, è possibile ipotizzare un'azione sinergica con altre molecole che regolano punti diversi della stessa via: cicline-chinasi dipendenti (*Cyclin-Dependent Kinases*, CDK) e regolatori di IKK/NF- $\kappa$ B. Nelle cellule tumorali si riscontra quasi costantemente un'aumentata attività delle



CDK e una modulazione negativa della loro attività/espressione può determinare inibizione della crescita tumorale *in vitro* e in modelli animali. Analogamente, la protein-chinasi RaLP regola proliferazione e sopravvivenza cellulare, promuovendo la tumorigenesi, e IKK/NF-kB è costitutivamente attivata nei tumori, dove NF-kB causa resistenza all'apoptosi da farmaci antitumorali. Inoltre, p63 e p73 regolano il ciclo cellulare, interagiscono con NF-kB e transattivano IKK.

La regolazione farmacologia di Itch su p63/p73/Hedgehog/Gli ed eventuali sinergie con CDK/IKK/NF-kB/RaLP è un'area totalmente inesplorata nel cancro e in particolare nei tumori epiteliali.

## Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

L'obiettivo principale di questo progetto è quello di sviluppare nuove molecole (da noi identificate) inibitori della E3-ubiquitina-ligasi Itch e di validare tali molecole nella via p63/p73 e nella via Hedgehog/Gli. Inoltre, valuteremo il potenziale terapeutico di peptidi capaci di disassemblare complessi proteici (mp53/p73) ad attività oncogenica, e studieremo il potenziale terapeutico di inibitori selettivi di NF-kB/IKK e di CDK, come singoli agenti e in associazione con gli inibitori di Itch e chemioterapici convenzionali. Analizzeremo l'espressione della proteina chinasi RaLP nei melanomi e caratterizzeremo la trasduzione del segnale da essa attivata. Il progetto è suddiviso nei seguenti obiettivi specifici.

- Valutazione dell'espressione di p63/p73/Itch in tumori cutanei/linfomi.
- Studio delle proprietà biochimiche delle proteine leganti/regolanti ITCH.
- Generazione topi transgenici che esprimono alti livelli di p63 nei tessuti epiteliali.
- Identificazione di inibitori della E3 ligasi Itch.
- Caratterizzazione del complesso proteico mutp53/p73 come bersaglio molecolare di peptidi sintetici; sintesi dei peptidi.
- Studio dell'effetto di piccole molecole ciclopentenoniche inibitrici della via IKK/NF-kB e caratterizzazione del sistema IKK/NF-kB e del *pathway* di HSF1 nei modelli prescelti.
- Identificazione delle molecole con proprietà agoniste di Numb, caratterizzarne l'interazione con Itch, Numb e le proteine Gli (Gli1, Gli2 e Gli3), e identificare i domini funzionali.
- Definizione degli effetti antitumorali di inibitori di CDK, come singoli agenti e in combinazione con chemioterapici convenzionali, su linee cellulari di melanoma umano e in modelli animali.
- Identificazione delle molecole coinvolte nella trasduzione del segnale migratorio mediato da RaLP, identificazione di inibitori della funzione di RaLP.

## Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Le diverse unità hanno raggiunto i seguenti obiettivi intermedi previsti per il primo anno del progetto.

Nell'ambito dello studio dei meccanismi che regolano l'espressione e quindi l'attività dell'E3 ubiquitina ligasi Itch abbiamo dimostrato che Itch è una proteina stabile con un'emivita superiore alle 8 ore (Scialpi *et al.*, 2008). La stabilità di Itch non è regolata dalla sua attività enzimatica poiché il mutante cataliticamente inattivo (Itch CI) ha un'emivita paragonabile al wt.

In accordo con questo dato, i livelli proteici di Itch wt e CI non sono regolati in maniera rilevante dall'attività del proteasoma.

Abbiamo inoltre dimostrato che l'inibizione dell'espressione di Itch, probabilmente attraverso la stabilizzazione del soppressore tumorale p73, aumenta al risposta apoptotica di cellule tumorali trattate con diversi agenti chemioterapici (Hansen *et al.*, 2007). Utilizzando simulazioni dinamiche e tecniche di modelli proteici in silico abbiamo verificato che i due lobi del dominio HECT di Itch sono utilizzati nell'interazione con UbcH7 (Raimondo *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda lo studio dei peptidi in grado di inibire l'attività oncogenica dei mutanti di p53, abbiamo dimostrato che in cellule tumorali esprimenti una p53 mutata, il pre-trattamento con tali peptidi induce l'espressione dei geni target di p73. Abbiamo, quindi, studiato l'effetto dei peptidi sull'efficienza di legame di p73 ai promotori dei suoi geni target. Attraverso analisi di immunoprecipitazione della cromatina abbiamo dimostrato che il pre-trattamento con i peptidi già di per sé causa un maggior reclutamento di p73 sui suoi promotori target. In seguito a danno al DNA, sia il legame di p73 e sia il reclutamento del cofattore trascrizionale p300 sul DNA è aumentato. Tali eventi inducono l'induzione della trascrizione dei geni target di p73, evidenziata da un aumento dell'acetilazione dell'istone H4 (Di Agostino *et al.*, 2008)

Per la caratterizzazione del "cross-talk" tra HSF1 e NF- $\kappa$ B, abbiamo dimostrato che in alcuni tipi di linfoma caratterizzati da attivazione costitutiva di NF- $\kappa$ B, l'attivazione di HSF1 in seguito a trattamento ipertermico inibisce l'attività di NF- $\kappa$ B. È stato inoltre dimostrato un effetto cooperativo nell'induzione di apoptosi tra il trattamento ipertermico e l'uso dell'inibitore del proteasoma di nuova generazione Bortezomib. Il ruolo determinante di NF- $\kappa$ B in questo modello è stato dimostrato silenziando la subunità p65 di NF- $\kappa$ B attraverso shRNA interference (Belardo *et al.*, inviato per la pubblicazione).

Per valutare il potenziale terapeutico degli inibitori della chinasi CDK (CDK-Is) si è deciso di utilizzare un pannello di linee di melanoma con differente sensibilità al temozolomide. In particolare, sono state impiegate le seguenti linee: i) linee MRS-proficienti CN-Mel, DR-Mel, GL-Mel, ed M10, con diversa attività MGMT e diverso grado di sensibilità al temozolomide come singolo agente e in combinazione con la BG; ii) la linea MRS-deficiente PR-Mel, totalmente resistente al temozolomide, sia dato come singolo agente che in combinazione con la BG; iii) la linea WM-155, non ancora caratterizzata per stato funzionale del MRS, ma altamente resistente al temozolomide anche se con attività MGMT al di sotto dei limiti di determinazione del saggio biochimico. Tutte le linee di melanoma testate possono considerarsi sensibili, almeno *in vitro*, ai CDK-Is, in quanto tutte hanno una IC50 decisamente al di sotto della concentrazione di picco plasmatico descritta per i due CDK-Is alle dosi utilizzate in clinica (1,2  $\mu$ M per il CDK2-I e 3,4  $\mu$ M per il pan-CDK-I). Il pan-CDK-I appare maggiormente attivo del CDK2-I in tre delle sei linee testate. In ogni caso, entrambi i CDK-Is sono in grado di inibire in modo significativo anche la proliferazione delle linee PR-Mel e WM-155, totalmente resistenti al temozolomide, e della linea CN-Mel, altamente resistente al temozolomide anche in presenza di BG. Tali dati suggeriscono un potenziale terapeutico dei due CDK-Is nel melanoma.

Per quanto riguarda lo studio del ruolo di alcuni miRNAs nello sviluppo del sistema nervoso e nella progressione tumorale neuronale, abbiamo condotto un'analisi di espressione dei miRNAs su una serie di campioni di medulloblastoma umani. Lo studio di espressione è stato condotto su 34 tumori suddivisi in 3 categorie immunoistochimiche: desmoplastici, classici e anaplastici. Come controlli di tessuto normale sono state utilizzati 14 RNA commerciali di cervelletto umano. Abbiamo identificato 19 "oncomiR" significativamente deregolati nei tessuti tumorali. In particolare il miR-106a e il miR-17-5p sono sovra-espressi nei tumori, mentre la maggior parte dei miRNAs sono meno espressi nei tumori e quindi con funzione oncosoppressoria.

Abbiamo inoltre identificato una serie di miRNAs deregolati in grado di distinguere i medulloblastomi tra i differenti istotipi (anaplastico, classico e desmoplastico), e anche i tumori con diverse caratteristiche molecolari (amplificazione dei geni ErbB2 o c-Myc) (Ferretti *et al.*, in corso di stampa).

Successivamente, abbiamo concentrato la nostra ricerca sui meccanismi di regolazione del signaling di Hedgehog e abbiamo dimostrato che tre miRNAs, miR-125b, miR-324-5p e miR-326, riconoscono, legano e sono in grado di regolare la funzione biologica di Smo e Gli1. (Ferretti *et al.*, 2008).

## Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

**Tabella 1. Articolazione del progetto Nuove molecole e peptidi quali farmaci regolatori del ciclo cellulare e della risposta a chemioterapici nei tumori epiteliali e cutanei**

Proponente (Coordinatore del progetto)	UO (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
IDI (Gerry Melino)	UO1 (IDI: Gerry Melino)	IDI	Gerry Melino
		Università Tor Vergata	Eleonora Candi
	UO2 (IRE: Giovanni Blandino)	IRE	Giovanni Blandino
		Università Tor Vergata	Maria Grazia Santoro
		IEO	Luisa Ianfrancone
	UO3 (IDI: Stefania D'Atri)	IDI	Stefania D'Atri
		ISTGE	Ulrich Pfeffer
		CNR	Ester Alvino

## Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Belardo G, Piva R, Santoro MG Hyperthermia inhibits constitutive NF-kB activity in human malignant B-cells and triggers apoptosis by impairing NF-kB survival signaling. *Leukemia* (inviato per la pubblicazione).
2. Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, Melino G. The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell* 2008;14:10-21.
3. Di Agostino S, Cortese G, Monti O, Dell'orso S, Sacchi A, Eisenstein M, *et al.* The disruption of the protein complex mutantp53/p73 increases selectively the response of tumor cells to anticancer drugs. *Cell Cycle* 2008;7(21):3440-7.
4. Ferretti E, De Smaele E, Miele E, Laneve P, Po A, Pelloni M, *et al.* Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *EMBO J* 2008;27:2616-27.
5. Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MSB, *et al.* microRNA profiling in human medulloblastoma. *Int J Cancer* 2009;124(3):568-77.
6. Hansen TM, Rossi M, Roperch JP, Ansell K, Simpson K, Taylor D, *et al.* Itch inhibition regulates chemosensitivity *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:33-36.

7. Melino G, Gallagher E, Aqeilan RI, Knight R, Peschiaroli A, Rossi M, *et al.* Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell Death Differ* 2008;15:1103-12.
8. Raimondo D, Giorgetti A, Bernassola F, Melino G, Tramontano A. Modelling and molecular dynamics of the interaction between the E3 ubiquitin ligase Itch and the E2 UbcH7. *Biochem Pharmacol* 2008;76(11):1620-7.
9. Scialpi F, Malatesta M, Peschiaroli A, Rossi M, Melino G, Bernassola F. Itch self-polyubiquitylation occurs through lysine-63 linkages. *Biochem Pharmacol* 2008;76(11):1515-21.

**PROGRAMMA 4**

**Promozione della collaborazione internazionale  
con particolare riferimento a quella europea**

*Coordinatori*

Filippo Belardelli, Claudio Lombardo



## **PROGRAMMA 4 DELL'ART. 3 DM 21 LUGLIO 2006: LE BASI RAZIONALI DELL'INTERVENTO**

Claudio Lombardo (a, b), Francesca d'Alessandro (a, b), Franca Moretti (c), Tania Rondanina (a, b),  
Maria Ferrantini (c), Filippo Belardelli (c)

(a) *Servizio Trasferimento Tecnologico Relazioni Internazionali, Istituto Nazionale per la Ricerca sul  
Cancro, Genova*

(b) *Alleanza Contro il Cancro, Roma*

(c) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### **Premessa**

Il cancro rappresenta la maggior sfida europea essendo responsabile del 25% di tutti i casi di morte. Tale percentuale, con lievi spostamenti, può essere considerata statisticamente compatibile con la situazione nazionale e locale. In Europa entro il 2020 si prevede un aumento di 3,2 milioni di nuovi casi di cancro/anno (+20% di aumento dal 2002), molti dei quali insorgeranno in età superiore ai 65 anni e come conseguenza dell'invecchiamento della popolazione.

Il panorama della ricerca oncologica è profondamente cambiato negli ultimi dieci anni: l'accelerazione nel processo di acquisizione di conoscenze grazie alla ricerca di base, la rivoluzione portata dalle biotecnologie nell'identificazione di bersagli molecolari e di farmaci ad essi mirati così come nella modulazione dei fenomeni mediati dal sistema immunitario hanno completamente modificato le opportunità e i concetti di trattamento oncologico, pur nel rispetto degli elementi di base che orientano tutt'oggi l'operatività dell'oncologo medico, del chirurgo e del radioterapista. Inoltre, l'attuale esplosione di nuovi concetti e tecniche emergenti dalla biologia molecolare e cellulare rende necessario e urgente superare il gap tra i vari settori della ricerca di base, l'epidemiologia e la clinica.

L'oncologia appare quindi sempre più legata ad un approccio multidisciplinare che allarga i confini della programmazione nazionale anche al di là di quella europea e dalla quale non può esulare la programmazione di un'Associazione di riferimento quale Alleanza Contro il Cancro (ACC) che, seppure agisca a livello nazionale, ha il dovere di guardare oltre i confini territoriali al fine di contribuire efficacemente al continuo divenire del progresso scientifico e tecnologico e di operare in sintonia con esso, in un'ottica di sviluppo che tenga conto delle aspettative dei pazienti e delle priorità stabilite dai programmi sanitari nazionali, e che esalti la professionalità dei ricercatori e di quanti operano nelle strutture che la compongono, innalzandone i livelli di eccellenza.

La realizzazione di tale scenario richiede il sostegno ad un intervento programmatico inteso ad armonizzare gli adempimenti di ricerca di ACC in un'ottica di partecipazione consapevole, coerente e critica alla costruzione dell'area europea della ricerca, con riferimento particolare a quella traslazionale, in oncologia: a questo scopo deve considerarsi asservito e in continuo divenire il Programma 4 dell'art. 3 del DM 21 luglio 2006.

## **Razionale dell'intervento di programmazione delle attività per l'internazionalizzazione istituzionale di ACC**

La “comunità oncologica”, così come la malattia oncologica, è per sua natura complessa e le attività di ricerca richiedono un approccio che normalmente non rientra nelle abitudini di un sistema poco consono al riconoscimento della diversità, delle competenze multidisciplinari e della non-supremazia di una classe particolare di professionisti. A livello nazionale si osservano molte disparità nelle possibilità terapeutiche che vengono offerte ai pazienti oncologici e le strutture di partecipanti ad ACC si devono attestare ai massimi livelli riscontrabili in Italia proprio per il ruolo di riferimento che viene loro riconosciuto a livello nazionale e internazionale. Tale collocazione può essere garantita privilegiando un approccio traslazionale e multidisciplinare che dia continuità all'evoluzione degli interventi clinici basati sulle evidenze in un contesto di sviluppo internazionale.

Per quanto sopra brevemente esposto e per il ruolo di centralità che viene assegnato al Presidente di ACC e a quanti sono stati assegnati ruoli di coordinamento nella programmazione delle attività di ricerca dell'Associazione, risulta improrogabile un impegno del governo rivolto a sostenere un processo di collaborazione coerente con il merito e con le prospettive della programmazione internazionale. Tale approccio contribuirà ad un rilancio dell'autorevolezza Paese nel difendere e sostenere delle scelte potenzialmente in grado di migliorare la qualità e la certezza della cura, e nel contempo di offrire ai nostri giovani ricercatori un futuro che risponda alle loro aspettative.

Tale processo potrà svilupparsi solo se sostenuto da un programma organico che offra agli enti preposti al finanziamento della ricerca chiare possibilità di intervento atte a premiare l'eccellenza e a promuovere programmi che abbiano concrete ipotesi di sviluppo. È altresì necessario ridare speranza all'industria nazionale e ai nostri malati oncologici considerando metaforicamente ACC al pari di una grande impresa il cui prodotto terminale è il “malato-curato” e la prevenzione dei tumori per il cittadino. Tale prodotto richiede l'iniezione continua di innovazione che può derivare solo da un programma a lungo termine concordato a livello nazionale, ma nel contesto di uno sviluppo integrato europeo per il quale ACC ha avuto la possibilità quasi unica di partecipare ai piani di sviluppo che mirano a costruire e armonizzare l'interazione delle infrastrutture di ricerca e cliniche.

Occorre tuttavia registrare che esistono ancora carenze e difficoltà di comunicazione tra i membri di ACC che devono essere superate per sviluppare al meglio un processo di internazionalizzazione della ricerca oncologica nazionale. Affrontare in modo organico tali difficoltà e sfide, con la lucidità derivante da una valutazione meritocratica e dalla conoscenza dell'esistente, può portare a raggiungere i traguardi che seguono:

- uso efficiente delle risorse;
- annullamento delle situazioni di “casualità” nel processo decisionale;
- miglioramento della qualità della ricerca oncologica;
- programmazione degli interventi con una visione globale e conseguente potenziamento dei risultati;
- aumento della fiducia dei pazienti;
- realizzazione di programmi di formazione continua per gli operatori che sviluppino concretamente il divenire delle professionalità di ricerca, cliniche e amministrative;
- inserimento a pieno titolo di ACC tra gli attori della programmazione nazionale ed europea.



Nell'ambito del Programma 4 del DM "ISS per ACC", sono stati individuati 13 macrosettori di attività che hanno cercato di focalizzare opportunità emergenti nella programmazione internazionale e attività (vedi Tabella 4 pag. 4), da sviluppare in un contesto già consolidato che richiedeva comunque una migliore partecipazione dell'oncologia italiana al fine di sostenere e valorizzare le competenze scientifiche che il Paese è in grado di esprimere. Nella grande maggioranza dei casi, le attività indicate si riferivano ad iniziative di sicuro respiro pluriennale, riguardanti la partecipazione ad importanti iniziative europee, mentre in casi specifici l'attività riguardava eventi specifici conclusi nel 2008.

Nel complesso, nel corso del primo anno di attività sono state avviate tutte le iniziative approvate dal Comitato Direttivo di ACC nella seduta del 27 aprile 2007. Non potendo prevedere in anticipo quali interventi avrebbero condotto a risultati più concreti e in che misura avrebbero dovuto essere sostenuti, in fase di attivazione si è proceduto ad una ripartizione finanziaria indicativa dei 3,2 milioni di euro. A conclusione del primo anno di attività si è resa necessaria una valutazione che ha indirizzato la ripartizione finanziaria per il secondo anno di attività. Tale ripartizione dovrà servire a consolidare le iniziative che hanno dimostrato una concreta possibilità di sviluppo, e a sostenere nuove ipotesi di lavoro anche a scapito di interventi già programmati che, seppure avessero buone prospettive operative, non hanno trovato nel Paese concreti interessi scientifici in grado di sostenerle nel loro processo di maturazione e realizzazione.

Il Programma 4 è direttamente collegato all'approccio pratico che i referenti di ACC hanno deciso di adottare per sostenere e migliorare la partecipazione della comunità scientifica del Paese alla ricerca oncologica e per superare le difficoltà che si incontrano nel processo di internazionalizzazione. Tale approccio mira anche a stimolare una riflessione interna al Paese che possa dare nuovo slancio agli aspetti traslazionali riformulando nel contempo la programmazione per renderla più consona alle esigenze applicative della ricerca clinica.

Il Programma 4 è formulato per dare continuità agli investimenti nazionali, premiare il merito conseguito e dimostrabile sia a livello nazionale che europeo, partecipare alla costruzione dell'Area Europea della Ricerca in oncologia e discipline biomediche correlate, offrire maggiori possibilità al Paese di svolgere un ruolo da protagonista nel contesto internazionale, stabilendo una sinergia tra merito e interazione con gli organi governativi di riferimento.

## **Attuazione del programma: strategia, risultati e prospettive**

Il concetto di internazionalizzazione, visto in una dimensione moderna di collaborazione transnazionale, ha comportato lo studio di un programma di attività che potesse attuare uno stimolo nazionale all'interazione multidisciplinare tra quanti avessero le caratteristiche di eccellenza necessarie a far emergere una posizione Paese nel contesto europeo. La maggior parte delle attività previste nel Programma 4 sono state disegnate per essere sviluppate in concomitanza con i progetti di rete finanziati nell'ambito del Programma 2 ("Integrazione delle attività di ricerca attraverso la costruzione di strutture e reti di collaborazione interistituzionali").

Nel complesso, l'esigenza di realizzare un progetto che ambisca a creare le condizioni necessarie a sviluppare in maniera sistematica l'abitudine a collaborare stabilendo interfacce formali con le istituzioni omologhe ad ACC presenti in altri Paesi e con i progetti europei

d'interesse oncologico in atto o in fase di progettazione sembra essere stata rispettata ad un anno dall'inizio del progetto stesso.

Particolare attenzione è stata posta allo sviluppo di alcune infrastrutture di ricerca che dovrebbero rispondere alla *roadmap* disegnata dallo *European Strategy Forum on Research Infrastructures*, nel cui ambito il Programma 4 ha consentito al Paese di colmare l'assenza in alcuni dei settori più promettenti per lo sviluppo dell'industria del futuro. Tale approccio, oltre a garantire il MUR nel processo di investimento per il sostegno alle infrastrutture nazionali, qualifica la partecipazione italiana che, da una fase di intervento spontaneo, si trasforma in programma di Governo da sostenere anche a livello regionale, proprio a conferma del concetto di globalizzazione della ricerca e dello sviluppo industriale che non può esulare da un sostegno nazionale e locale. Sempre maggiore sforzo dovrà essere dedicato in futuro alla promozione del collegamento alle infrastrutture europee in fase di preparazione e alla realizzazione di reti di ricerca transnazionali che possano giovare degli strumenti attualmente resi disponibili dall'UE.

Si può affermare che il Programma 4 abbia dato l'avvio ad un processo a cascata che si auspica possa consentire ai gruppi operanti nel contesto di ACC, supportati dall'Istituto Superiore di Sanità, di partecipare ad interventi di valenza sovranazionale, nazionale e locale, dai quali la comunità scientifica di riferimento e il Paese sarebbero probabilmente rimasti esclusi o per i quali si sarebbero potute verificare partecipazioni casuali e comunque non rientranti in una strategia nazionale.

A tal riguardo è necessario sottolineare come, per ragioni di opportunità, in molti casi è apparso necessario oltre che opportuno, privilegiare la partecipazione dell'Istituto Superiore di Sanità che, in qualità di braccio operativo del Ministero della Salute, aveva le caratteristiche di eleggibilità richieste dalla controparte europea. Tale opportunità è stata particolarmente applicata per la partecipazione alle infrastrutture di ricerca (dove rientra anche l'oncologia), per gli ERA-NET e per il progetto di formazione tramite la mobilità TRAIN (*Training through Research Application Italian iNitiative*).

Un altro aspetto qualificante del processo in corso è l'impiego di 7 unità di personale, a tempo determinato, specificamente dedicato alle attività collaborative internazionali e al loro sviluppo nazionale. È auspicabile che tale personale, al termine del periodo di contratto, possa essere confermato gravando su progetti acquisiti o nell'ambito di interventi previsti nel quadro di sviluppo delle attività collaborative che ACC e ISS hanno promosso. Appare, infatti, fondamentale, al fine di non disperdere competenze maturate e continuare a fornire il sostegno necessario alla progettualità in fase di realizzazione, garantire continuità al supporto offerto da personale efficiente ed esperto alle procedure di progettazione e gestionali in genere, funzione non riscontrabile in nessun IRCCS in maniera organizzata e coordinata con il sistema centrale e la direzione europea della ricerca.

Per quanto riguarda i risultati raggiunti in questo primo anno di attività del Programma 4, si desidera segnalare quanto segue.

La partecipazione all'infrastruttura europea per la ricerca traslazionale EATRIS (*European Advanced Translational Research Infrastructure in medicine*) ha dato l'avvio ad un processo di ampio respiro, caratterizzato da un ruolo leader del nostro Paese sugli aspetti regolatori ed etici per la ricerca traslazionale, che ha suggerito al tempo stesso di promuovere un'importante iniziativa congressuale internazionale co-organizzata da ISS e ACC, in accordo con il Ministero della Salute, che si è svolta a Roma nei giorni 1-3 ottobre e in occasione della quale si è tenuto un meeting parallelo tra i rappresentanti di "funding organizations" di 16 Paesi europei interessati allo sviluppo dell'ERA-NET per la ricerca traslazionale in oncologia. Inoltre, grazie alle attività sviluppate nell'ambito del Programma 4, sono state create le basi per un'importante partecipazione di ISS e aCC nelle fasi preparatorie dei progetti per la creazione di altre 2 infrastrutture europee nel settore della biomedicina – quella per i trial clinici e le bioterapie,

ECRIN (*European Clinical Research Infrastructures Network*), e quella sulle biobanche. Allo stesso tempo, è stata formalizzata la partecipazione di ACC ad altre importanti iniziative europee, quale il progetto ERA-NET sulle linee guida in oncologia (CoCanCPG, *Coordination of Cancer Clinical Practice Guidelines*), iniziative che devono trovare sempre più collegamento con i corrispettivi progetti di rete, finanziati nell'ambito del Programma 2.

L'evento OEIC (*Organisation of European Cancer Institutes*) 2008 tenutosi a Genova dal 20 al 24 maggio 2008 si è dimostrato essere l'iniziativa europea più importante nel settore oncologico dopo la conferenza dell'ECCO (*European Cancer Organisation*), fornendo un'ulteriore dimostrazione delle capacità di coordinamento che ACC può mettere in campo in un sistema organizzato che si giovi delle infrastrutture e delle competenze sviluppate dal Programma 4.

Per quanto concerne gli aspetti formativi, si è in attesa dei risultati di una proposta di mobilità per la formazione che potrebbe consentire al Paese di acquisire una progettualità che potrebbe dare l'avvio ad un processo di scambio in uscita e in entrata per un totale di 70 anni/uomo. Tale programma, oltre a posizionare ACC nel contesto internazionale tra le grandi istituzioni oncologiche, potrebbe significare l'avvio di un processo inverso all'abituale migrazione di scienziati verso altri Paesi europei o terzi.

Non si può nascondere che sono stati incontrati ritardi e difficoltà che, seppure attesi in un programma di vaste dimensioni e aspettative, potrebbero essere superati grazie ad un auspicabile maggiore impegno del Paese a disegnare e sostenere politiche di internazionalizzazione derivanti dalla definizione di una posizione Paese da difendere su tutti i tavoli di trattativa nazionali ed europei e in un processo di concertazione interministeriale.

Oltre ai risultati pratici conseguiti, al Programma 4 deve comunque essere assegnato il merito di aver avvicinato la programmazione del Ministero della Salute con la partecipazione al Programma Quadro di ricerca e sviluppo di competenza del Ministero della Ricerca dando vita ad un processo di collaborazione nel settore biomedico che costituisce l'elemento di maggior rilievo di tutto il processo avviato.

Grande importanza è stata e verrà data, al potenziamento delle sinergie con i Ministeri competenti: la ricerca biomedica italiana deve risentire maggiormente delle indicazioni provenienti da coloro che hanno il compito di indirizzare e sostenere gli interventi nazionali verso la programmazione europea e internazionale in genere, e che purtroppo sono spesso esclusi dalla comunità scientifica nella fase progettuale e raramente coinvolti in interventi che richiedono la loro diretta partecipazione.

In conclusione si può affermare che il Programma 4, ad un anno dall'avvio effettivo della sua attività, ha già fornito risposte concrete anche per gli aspetti di immagine a livello europeo che ne è scaturita. ACC viene citata dal progetto Eurocan+Plus come esempio positivo di coordinamento-Paese e si può pertanto immaginare che da questa promozione possano derivare benefici che in futuro potrebbero addirittura concretizzarsi nell'assegnazione al Paese di un ruolo di coordinamento in importanti iniziative per la ricerca traslazionale e clinica in oncologia, per le quali ACC si sta impegnando assieme all'ISS, e che prevedono tra l'altro la costituzione di un ERA-NET per la ricerca traslazionale in oncologia.

Per il secondo anno di attività si auspica un concreto sviluppo delle attività previste dal programma per potenziare la partecipazione del Paese allo sviluppo dell'area europea della ricerca in sintonia e in sinergia con gli investimenti nazionali.

## PROGRAMMA 4 DEL DM ISS PER ACC: RELAZIONE CONSUNTIVA 2008 E PROGRAMMATICA 2009

Claudio Lombardo (a, b), Filippo Belardelli (c)

(a) Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova

(b) Alleanza Contro il Cancro, Roma

(c) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

In totale il Programma 4 nel corso del primo anno di attività ha sostenuto circa 100 missioni di ricercatori di ACC che a vario titolo hanno partecipato ad incontri correlati ad una delle 13 attività previste dal programma. In Tabella 1 si riporta l'elenco delle attività e le relative previsioni di costi per l'anno 2009, così come presentati al Comitato Esecutivo di ACC del 19 dicembre 2009 ed approvate dal comitato stesso.

**Tabella 1. Tabella impegno di spesa secondo anno di attività (totale €2.373.265,67)**

Attività	Previsione di impegno 2009 (in euro)
<i>Focal Point</i> e integrazione web site	192.000,00
Promozione della mobilità in entrata e uscita	580.000,00
<i>General Assembly &amp; Scientific Conferences OECI 2008</i>	–
ERA-NET – registri tumori europei	250.000,00
<i>European Bio-Banking and Biomolecular Resources</i>	127.000,00
Programma ECRIN e <i>Infrastructure for Clinical Trials and Biotherapy</i>	153.550,00
Infrastruttura EATRIS	360.715,67
Infrastruttura INSTRUCT	30.000,00
Partecipazione a CoCanGPC	150.000,00
<i>Accreditation of European Comprehensive Cancer Centres</i>	100.000,00
Collaborazione con l'America Latina	100.000,00
Supporto ad iniziative emergenti a seguito di opportunità nella programmazione UE del VII PQ	230.000,00
Collaborazioni con Paesi extraeuropei	100.000,00

Sono di seguito indicati, punto per punto, seppur brevemente, i risultati conseguiti nel corso del primo anno di attività del Programma 4 e gli ostacoli che, in alcuni casi, hanno impedito di rispondere alle aspettative.

### ***Focal Point* e integrazione web site**

Nel corso del primo anno di attività è stata formalizzata la convenzione ISS-IST che ha permesso l'attivazione del *Focal Point International Affairs ACC* (FPIA). Sono stati definiti i contratti di collaborazione a tempo determinato per le seguenti figure professionali: 1 bio-

ingegnere, 1 economista, 1 linguista. Allo scopo di far conoscere le attività e i servizi svolti dal FPIA è stato realizzato il website del *Focal Point* accessibile all'indirizzo: [http://www.istge.it/fp\\_acc/index.htm](http://www.istge.it/fp_acc/index.htm). Il FPIA ha fornito supporto continuo non solo allo sviluppo di tutte le attività del Programma 4 ma anche alle iniziative dei soci di ACC che pur esulando da quanto previsto hanno trovato naturale motivazione e giustificazione.

***Proposta programmatico-finanziaria***

La convenzione ISS-IST per il *Focal Point* prevede per il secondo anno di attività l'impegno di 192.000 €.

## **Promozione della mobilità in entrata e in uscita**

Il progetto triennale europeo di formazione attraverso la mobilità TRAIN (è stato realizzato e presentato nel contesto della "Call for proposal" FP7-PEOPLE- 2007-2-3-COFUND. Tale progetto prevede la mobilità in entrata e uscita per un totale di 70 anni/uomo per attività di ricerca traslazionale in oncologia per un importo globale di 3,5 milioni di euro. Al momento attuale il progetto ha superato la valutazione scientifica e si attende la decisione della Commissione Europea per l'eventuale finanziamento.

***Proposta programmatico-finanziaria***

L'impegno di spesa è di 580.000 €, da prevedere nel caso in cui il progetto dovesse essere finanziato.

## **General assembly and scientific conference OECI 2008**

L'evento OECI Genova 2008 si è svolto come previsto a Genova dal 20 al 24 maggio.

Tutte le attività sviluppate sono accessibili all'indirizzo [www.oeci.org](http://www.oeci.org) o sul website del *Focal Point*.

In occasione dell'evento il Dott. Marco Pierotti ha assunto la carica di presidente OECI.

Circa 160 ricercatori e clinici afferenti ai membri di ACC hanno partecipato alle attività scientifiche e sociali della Settimana Europea esentati dal pagamento delle quote di iscrizione.

Il Numero 2-2008 della rivista *Tumori* è stato dedicato alla raccolta degli atti dell'evento riportando in copertina il logo di ACC.

***Proposta programmatico-finanziaria***

Grazie ad un'efficace attività di *fund raising* ad integrazione del contributo concesso da ACC e ad un'attenta gestione dei fondi, il Comitato Promotore Genova OECI 2008 ha realizzato un avanzo di circa 20,000 € che, tolte le spese di gestione e le spese previste per la chiusura del Comitato e in accordo con la presidenza ACC è stato così destinato:

- 1) 10.000 € per contribuire all'organizzazione dell'incontro per la costituzione di un gruppo di Paesi europei interessati a finanziare, quali fondatori, un ERA-NET sulla ricerca traslazionale in oncologia. Tale incontro si è svolto il 1° ottobre 2008 presso l'Istituto Superiore di Sanità nell'ambito della conferenza internazionale "Needs and Challenges in Translational Medicine"; entrambi gli eventi sono stati co-organizzati da ACC.

- 2) 3000 € per sostenere l'azione preparatoria al lancio di un progetto pilota europeo che affronti l'argomento "Applicazione di nanotecnologie in oncologia" che darà naturale seguito alla conferenza nanotecnologie in oncologia di Genova, e che potrebbe essere focalizzato sulle seguenti due aree tematiche principali: a) auto-assemblaggio di nano particelle per la diagnosi e terapia del cancro; b) terapie combinate (abbinare approcci biofarmaceutici e trattamenti con nuove molecole per migliorare la terapia del cancro). Il coordinamento dell'iniziativa sarà affidato al coordinatore della EFPIA (*European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations*).
- 3) La somma restante sarà utilizzata per sostenere in parte l'incontro che si svolgerà a Bruxelles nel febbraio 2009 durante il quale verranno presentati formalmente alla comunità scientifica europea, alle istituzioni europee e alla stampa la rete italiana Alleanza Contro il Cancro e il Programma di lavoro 2008-2011 della Presidenza italiana all'OECD, così come l'iniziativa di ERA-NET sulla ricerca traslazionale in oncologia, se tale strumento sarà previsto nell'ambito del primo bando 2009 del VII Programma Quadro della UE. Tale incontro si svolgerà in regime di co-finanziamento con l'Ambasciata d'Italia a Bruxelles e con l'OECD. Sarà inoltre da prevedere un ulteriore finanziamento a carico del Programma 4 come meglio descritto al punto 13 di questo documento.

Non si prevedono ulteriori richieste di contributo a valere sui fondi 2009.

## **ERA-NET – registri tumori europei**

Relativamente a questa attività e per poter rispondere alla "Call for proposal" lanciata nel contesto del VII Programma Quadro UE, sono stati identificati i possibili partecipanti alla rete europea ed è stato presentato un progetto nell'ambito del bando europeo. Nonostante la rete e il progetto presentato, designato EUCARES, avessero tutte le caratteristiche per accedere al finanziamento, la proposta non è stata ritenuta idonea ed è stato approvato il progetto competitor EUROCOURSE. Formale richiesta di chiarimenti è stata inoltrata alla Commissione Europea e le motivazioni addotte non hanno chiarito e giustificato il giudizio fornito dai valutatori. Su richiesta del consorzio EUROCOURSE, è in corso una trattativa informale per verificare la possibilità di una partecipazione di EUCARES al progetto ERA-NET associando le due reti. È stato altresì presentato un progetto per la realizzazione di una Infrastruttura di Ricerca Nazionale "Rete Registri Tumori" nell'ambito della costituenda *roadmap* italiana delle Infrastrutture per la Ricerca (IR) promossa dal MUR.

Inoltre, al fine di co-finanziare il lancio indipendente di EUCARES ed EUROCARE5 (v. appresso), è stato ottenuto un finanziamento di 700.000 € dalla Compagnia di San Paolo tramite INT e per conto del gruppo nazionale EUCARES.

### ***Proposta programmatico-finanziaria***

In data 10-12 marzo 2009 si svolgerà a Genova il Convegno Europeo Registri Tumori per la formulazione della rete e del nuovo progetto EUROCARE5, per co-finanziare la realizzazione del database EUCARES-EUROCARE5 e per sostenere il convegno degli 83 registri tumori europei che parteciperanno alla fase 5 di EUROCARE.

L'impegno di spesa è di 250.000 €.

## **European Bio-Banking and Biomolecular Resources**

Relativamente a questa attività e per poter partecipare alla “Call for proposal” lanciata nel contesto del VII Programma Quadro UE, è stato attivato il collegamento con il costituendo consorzio per la preparazione della proposta progettuale di fase preparatoria dell’Infrastruttura Europea. ISS/ACC, grazie anche all’acquisizione di un’unità di personale a contratto presso la Direzione Generale di ACC, ha partecipato attivamente alla fase progettuale; ciò ha permesso l’ingresso a pieno titolo tra i partner della fase preparatoria dell’Infrastruttura. Inoltre, grazie al finanziamento del Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita, è stato acquisito, presso l’ISS, il software per la gestione in rete dei campioni biologici. Nello stesso tempo è stato presentato un progetto per il riconoscimento di una Infrastruttura di Ricerca Nazionale “Bio-banche” nell’ambito della costituenda *roadmap* italiana delle IR del MUR.

### **Proposta programmatico/finanziaria**

Il Progetto, ormai avviato, potrebbe necessitare di un ulteriore finanziamento per il secondo anno di attività al fine di consentire alle unità operative presso i membri di ACC di partecipare al meglio anche garantendo la loro presenza in incontri e riunioni internazionali. Si prevede inoltre di realizzare un incontro dei centri di risorse oncologiche nazionali al fine di coordinare al meglio la partecipazione italiana all’infrastruttura europea. L’impegno di spesa è di 127.000 €.

## **Programma ECRIN e Infrastructure for Clinical Trials and Biotherapy**

Nell’ambito di questa attività è stato attivato il collegamento con il costituendo consorzio per la preparazione della proposta progettuale di fase preparatoria dell’Infrastruttura Europea e, grazie anche all’acquisizione di un’unità di personale a contratto presso la Direzione Generale di ACC, ISS/ACC ha partecipato attivamente alla fase progettuale; ciò ha permesso l’ingresso a pieno titolo tra i partner della fase preparatoria dell’Infrastruttura.

In particolare, l’ISS è responsabile del WP4 (*GMP facilities for biotherapy*). Le attività, di considerevole interesse per le prospettive di ricerca clinica di ACC, sono coordinate dal Dott. Filippo Belardelli e dalla Dott.ssa Maria Ferrantini dell’ISS. Inoltre, il coordinatore del FPIA partecipa quale rappresentante italiano al gruppo di lavoro per la definizione degli aspetti legali dell’infrastruttura europea.

ISS/ACC ha partecipato al kick-off meeting insieme agli altri partner nazionali (CIRM-IRFMN) con i quali è in fase di sviluppo un intervento di concertazione.

Nello stesso tempo è stato presentato un progetto per il riconoscimento di una Infrastruttura di Ricerca Nazionale Bio-CIRT (Centro Italiano per la Ricerca Traslazionale in Biomedicina) nell’ambito della costituenda *roadmap* italiana delle IR del MUR. Tale proposta è stata sviluppata in modo concertato con il Ministero del Welfare e prevede la creazione di un centro la cui missione sarà quella di promuovere la ricerca traslazionale nazionale in tutti i settori della biomedicina mediante attività di informazione, formazione, ricerca traslazionale e attività di servizio per gli IRCCS e in particolare di assistenza e consulenza su aspetti regolatori per l’allestimento di dossier per studi clinici FIM e di fase I e I-II. Il Bio-CIRT potrebbe rappresentare il contact point del collegamento italiano ad ECRIN.

***Proposta programmatico-finanziaria***

Per questo progetto si prevede, per il secondo anno di attività, un ulteriore impegno per favorire la realizzazione della rete italiana e per l'organizzazione di un ristretto incontro di lavoro in data da definire ed eventualmente avviare una prima sperimentazione pilota nell'ambito del programma dell'infrastruttura europea.

L'impegno di spesa è di 153.550 €.

## **Infrastruttura EATRIS**

Nell'ambito di questa attività è stato attivato il collegamento con il costituendo consorzio per la preparazione della proposta progettuale di fase preparatoria dell'Infrastruttura europea e, grazie anche all'acquisizione di un'unità di personale a contratto presso la Direzione Generale di ACC, ISS/ACC ha partecipato attivamente alla fase progettuale; ciò ha permesso l'ingresso a pieno titolo tra i partner della fase preparatoria dell'Infrastruttura.

In particolare, l'ISS è responsabile del WP8 (*Regulatory issues in translational research*). Le attività, di considerevole interesse per le prospettive di ricerca clinica di ACC, sono coordinate dal Dott. Filippo Belardelli dell'ISS, con l'importante contributo di altri ricercatori dell'ISS su aspetti specifici riguardanti gli aspetti regolatori ed etici (G. Migliaccio, M.C. Galli, A. Meneguz, C. Petrini, G. Calamandrei, A. Vitale). Inoltre, il coordinatore del FPIA partecipa quale rappresentante italiano al gruppo di lavoro per la definizione degli aspetti legali dell'infrastruttura europea.

ISS/ACC ha partecipato al *kick-off meeting* insieme agli altri referenti nazionali (CNR-CRFMN) con i quali sono stati realizzati due incontri di lavoro presso l'ISS al fine di sviluppare un intervento di concertazione. Va inoltre ricordato l'impegno di ISS/ACC nel promuovere la partecipazione al progetto EATRIS del Ministero del Welfare che figura ora tra i partner governativi della fase preparatoria dell'Infrastruttura.

Nello stesso tempo, come sopra menzionato, è stato presentato il progetto per la realizzazione dell'infrastruttura Bio-CIRT nell'ambito della costituenda *roadmap* italiana delle IR del MUR. Il Bio-CIRT intende rappresentare il contact point del collegamento italiano ad EATRIS.

Infine, è stata organizzata insieme al Ministero del Welfare la conferenza internazionale "Needs and Challenges in Translational Medicine", tenutasi presso l'ISS dal 1 al 3 ottobre 2008.

***Proposta programmatico-finanziaria***

Per questo progetto si prevede un ulteriore impegno per sostenere la fase di fattibilità e la presentazione della componente italiana all'infrastruttura europea EATRIS ovvero di IATRIS che si svilupperà nel contesto di attivazione del Bio-CIRT.

Il contributo richiesto è di 360.715,67 €.

## **Infrastruttura INSTRUC T**

Nell'ambito di questa attività è stata realizzata l'interazione con il contact point nazionale Prof. Ivano Bertini e sono state identificate possibili aree di intervento. Sono al momento in fase di progettazione le possibili ipotesi di rete nazionale per gli aspetti oncologici che potrebbero in futuro interagire con l'IR INSTRUC T e con l'IR nazionale Bio-CIRT.



### ***Proposta programmatico-finanziaria***

Seppure per questo progetto non si siano osservati particolari sviluppi per una carenza specifica di ACC nel settore di riferimento, al fine di dare comunque l'opportunità alla rete di ACC di integrarsi nella fattibilità di INSTRUCT che in parte potrebbe anche essere di supporto allo sviluppo del Bio-CIRT, si rende necessario prevedere un finanziamento. In particolare si ritiene auspicabile che grazie al sostegno dell'ISS e di ACC, la proposta formulata in occasione dell'ultimo incontro di INSTRUCT a Monaco dal dottor Camillo Rosano dell'IST e dal Dott. Andrea Musacchio dell'IEO al coordinatore scientifico per l'Italia, Prof. Bertini, possa trovare un'eventuale momento di verifica e parziale attivazione. Tale proposta prevede di costruire un "Associated Center" in Italia che si occupi di produzione e caratterizzazione di macromolecole biologiche. Si ritiene infatti che un tale centro possa avere un interesse strategico per il Paese anche in funzione di possibili (e auspicabili) infrastrutture nel campo del "Drug Design and Delivery" e delle nanobioteologie. Tale intervento consentirebbe di evitare che vengano proposti centri non Nazionali quali Associated Center al nodo di INSTRUCT diretto dal professor Bertini perdendo un'occasione di sviluppo della Ricerca Sanitaria Nazionale. L'impegno di spesa è di 30.000 €.

## **Partecipazione a CoCanGPC**

Durante il primo anno di attività è stata lanciata la proposta di inserimento di ISS/ACC quali nuovi partner dell'ERA-NET esistente. In questo contesto rappresentanti di ISS/ACC hanno partecipato alla riunione di presentazione che si è tenuta a Edimburgo il 14-16 maggio 2007. In seguito è stata presentata tutta la modulistica necessaria al riconoscimento di ISS e ACC quali referenti nazionali in aggiunta alla Regione Emilia Romagna e quindi ISS/ACC sono stati formalmente accolti quali nuovi partner dell'ERA-NET CoCanGPC. Al momento attuale è in fase di sviluppo un'ipotesi di programma di lavoro per la realizzazione di GCP europee per gli istituti afferenti all'OECI.

### ***Proposta programmatico-finanziaria***

Nel corso del secondo anno di attività si potrebbe prevedere la formulazione di una proposta di ERA-NET-Plus. Si ritiene necessario prevedere un impegno per la partecipazione alla stesura di un primo contributo per la realizzazione di GCPs europee e per l'avvio della preparazione della versione italiana. Il contributo richiesto è di 150.000 €.

## **Accreditation of European Comprehensive Cancer Centres**

Nell'ambito di questo progetto è stata curata l'organizzazione del primo "Accreditation Training Course", Genova 28 maggio 2007 per la seconda fase di sperimentazione del tool elettronico di validazione.

In seguito all'inclusione dell'Istituto Oncologico di Bari tra i 4 CCC riconosciuti nel progetto pilota di OECI si è ritenuto opportuno provvedere ad un contributo all'Istituto oncologico di Bari per favorire una migliore partecipazione alla fase pilota. Nel corso del primo anno di attività è stato garantito un costante supporto alla partecipazione dei delegati degli istituti di

ACC alle attività formative per l'accreditamento realizzate a Genova e a Budapest. Tale impegno ha portato all'ingresso formale del dottor Angelo Paradiso nello *Steering Committee* del progetto *Accreditation*. Infine, è stato organizzato nell'ambito dell'evento Genova OECI 2008 il secondo "Accreditation Training Course", tenutosi il 23 maggio.

***Proposta programmatico-finanziaria***

Si ritiene necessario continuare a supportare l'Istituto Oncologico di Bari nella partecipazione al progetto di accreditamento europeo con l'obiettivo di traslare i risultati europei a livello nazionale. Si svolgeranno a Roma in data 27 gennaio 2009 e 10-11 febbraio 2009, presso l'ISS, due incontri internazionali per discutere il programma di accreditamento istituzionale in concertazione a quanto sviluppato dall'OECI. L'impegno di spesa è di 100.000 €.

## **Collaborazione con l'America Latina**

In questo ambito è stata individuata una rete di ricerca Europa - America Latina per lo studio dell'eziologia della leucemia pediatrica in Europa e America Latina ed è stato preparato e presentato il progetto denominato STELLAE, come previsto da programma e in risposta al bando specifico. La proposta, per un errore non chiarito in fase di inserimento dati nel sistema EPSS della Commissione Europea, non è risultata eleggibile. In alternativa è stato presentato un progetto speciale al Ministero degli Esteri per la costituzione della rete Italia-Brasile per lo studio dell'eziologia dei tumori pediatrici nei due Paesi. Il progetto è in attesa di valutazione.

***Proposta programmatico-finanziaria***

Per il secondo anno di attività, nel caso il progetto presentato al Ministero degli Esteri venisse approvato, è da prevedersi un co-finanziamento a carico del Programma 4. Il co-impegno di spesa è di 100.000 €.

## **Supporto ad iniziative emergenti a seguito di opportunità nella programmazione UE del VII PQ**

Sono in fase di studio possibili progettualità da indirizzare alla programmazione europea in funzione delle esigenze emergenti dalla comunità scientifica di ACC e dalla programmazione europea. Di seguito sono indicate alcune attività in fase di sviluppo e per le quali si ritiene necessario prevedere un adeguato contributo per l'anno 2009.

***Proposta programmatico-finanziaria***

Questa attività si articola in:

- a) Organizzazione, nel corso del 2009, della seconda riunione del gruppo di lavoro europeo su "Nanotecnologie in oncologia" già finanziato dal Comitato Genova OECI 2008. Sostegno della fase preparatoria del progetto che verrà bandito nel primo bando 2009 del VII PQ della UE nell'ambito del Tema 4: Nanoscienze, nanotecnologie, materiali e nuove tecnologie di produzione. Impegno di spesa: 20.000 €

- b) Supporto all'organizzazione della conferenza *Exploitation of Research Outcomes towards Cancer Patients' Expectations: European Perspectives*. L'incontro è previsto a Bruxelles il 17 marzo 2009 e si realizzerà in collaborazione con l'Ambasciata d'Italia. Nel corso del convegno è prevista una Tavola Rotonda sul coordinamento della ricerca traslazionale in Europa e alla quale parteciperanno la CE e le maggiori organizzazioni internazionali operanti nel settore oncologico. In occasione dell'evento verrà presentata alla stampa internazionale, la rete italiana ACC e il Programma di lavoro 2008-2011 della Presidenza italiana all'OECD.  
Impegno di spesa: 40.000 €
- c) Supporto all'organizzazione a Bruxelles in data 16 marzo 2009, in concomitanza con l'evento di cui al punto b, dell'incontro dei rappresentanti delle *funding organization* dei Paesi membri interessati a partecipare all'ERA-NET per la ricerca traslazionale.  
Impegno di spesa: 20.000 €
- d) Supporto alla preparazione del progetto ERA-NET per la ricerca traslazionale e attivazione delle fasi preliminari alla preparazione di futuri bandi europei.  
Impegno di spesa: 100.000 €
- e) Supporto all'organizzazione del III *International Cancer Control Congress (ICCC-3)*. ACC partecipa in qualità di co-organizzatore dell'evento che si svolgerà a Cernobbio dal 7 all'11 novembre 2009. Tale conferenza alla quale parteciperanno circa 2000 ricercatori tratterà i seguenti temi:
- promozione della collaborazione internazionale tra Paesi sviluppati e Paesi in via di sviluppo;
  - promozione della collaborazione internazionale per favorire l'uso dei dati e dei sistemi di sorveglianza per elaborare le statistiche, e degli indicatori del cancro basati sulla popolazione;
  - sostenibilità economica delle azioni di lotta contro il cancro per la pianificazione dei programmi di controllo del cancro sia nei Paesi sviluppati e Paesi in via di sviluppo;
  - promozione delle politiche nella prevenzione primaria contro i fattori di rischio professionali, del comportamento e di stile di vita per abbattere i costi connessi con il cancro.
- La ICC-3 è un'occasione unica per sottolineare ulteriormente il ruolo di ACC nel contesto internazionale.  
Impegno di spesa: 50.000 €

## Collaborazione con i Paesi extraeuropei

In questo ambito sono già in fase avanzata di progettazione interventi bilaterali per la promozione della rete di bioinformatica e di altri settori particolarmente sviluppati negli USA e nel Regno Unito.

### ***Proposta programmatico-finanziaria***

Si ritiene necessario sostenere il processo di interazione nel settore bioinformatico con UK ed estenderlo al rapporto con il gruppo di bioinformatica del NCI. Tale approccio si deve realizzare in collaborazione con lo sviluppo del Bio-CIRT a supporto del processo di apertura di ACC e di ISS all'infrastruttura europea per la ricerca traslazionale.  
L'impegno di spesa è di 100.000 €.

## **CONSUNTIVO DELLE ATTIVITÀ CONGRESSUALI, LETTURE PLENARIE, ATTIVITÀ PROPEDEUTICA ALLA REALIZZAZIONE DI INCONTRI SCIENTIFICI, PUBBLICAZIONI**

Claudio Lombardo (a, b), Filippo Belardelli (c)

(a) *Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova*

(b) *Alleanza Contro il Cancro, Roma*

(c) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### **Organizzazione di convegni e conferenze**

Sono di seguito elencate le numerose iniziative convegnistiche organizzate nel contesto del Programma 4:

- 25 giugno 2007 – Roma, Istituto Superiore di Sanità  
“La costruzione dell’area europea della ricerca in biomedicina e il contributo degli enti di ricerca del servizio sanitario nazionale”
- 21 aprile 2008 – Roma, Istituto Superiore di Sanità  
Convegno di presentazione delle attività iniziate dei programmi 1, 2, 3, 4 ISS per ACC.  
“Rete nazionale solidale e collaborazioni internazionali”
- 20-24 maggio 2008 – Genova, Palazzo Ducale  
“The OECD 2008 Scientific Week”
- 11 giugno 2008 – Roma, Istituto Superiore di Sanità  
1° incontro dei partecipanti italiani al progetto EATRIS
- 10 settembre 2008 – Roma, Istituto Superiore di Sanità  
2° incontro dei partecipanti italiani al progetto EATRIS
- 8 ottobre 2007- Roma, Istituto Superiore di Sanità  
“Rete Nazionale solidale e collaborazioni internazionali del Programma Straordinario Oncologia 2006 (ISS per ACC)”
- 1-3 ottobre 2008 – Roma, Istituto Superiore di Sanità  
“Needs and challenges in translational medicine: Filling the gap between basic research and clinical applications”
- 1 ottobre 2008 – Roma, Istituto Superiore di Sanità  
Simposio satellite “Toward an ERA-NET on Translational Cancer Research”
- 27 ottobre 2008 – Londra, Italian Cultural Institute  
Conferenza “e-Oncology: a bi-lateral Italy-UK Workshop”
- 28 novembre 2008 – Milano, Fondazione Istituto Tumori  
Conferenza “Nanotechnologies in oncology”

## Conferenze in preparazione

Sono di seguito elencate le conferenze in preparazione programmate nell'immediato futuro:

- 27 gennaio 2009 (Roma, ISS): “OECEI educational activities: perspectives in the accreditation of European CCCs”
- 9-10 febbraio 2009 (Roma, ISS): “Sviluppo della rete oncologica nazionale per il progresso della ricerca sanitaria- Consuntivo Attività Scientifica 2007 ISS per ACC”
- 10-11 febbraio 2009 (Roma, ISS): “Meeting of the OECEI Accreditation project”
- 10-12 marzo 2009 (Genova): Conferenza degli 83 rappresentanti dei registri tumori europei per la messa a punto del nuovo progetto EURO CARE5 finanziato dalla Compagnia di San Paolo
- 16 marzo 2009 (Bruxelles, Jolly Hotel Sablon): “II meeting of the funding agencies involved in the setting-up of the ERA-NET for translational research”
- 17 marzo 2009 (Bruxelles, Centro Congressi MPS): Conferenza “Research and exploitation: toward cancer patients expectations”
- 7-11 novembre 2009 (Cernobbio): “3<sup>rd</sup> International Cancer Control Congress”.

## Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Belardelli F, D'Alessandro F, Ferrantini M, Lombardo C, Moretti F (Ed.). *Costruzione dell'area europea della ricerca in biomedicina e contributo degli enti di ricerca del Servizio Sanitario Nazionale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/27).
2. Belardelli F. Contributo dell'Istituto Superiore di Sanità nella costruzione dell'area europea della ricerca biomedica: esperienze, iniziative e prospettive. In: Belardelli F, D'Alessandro F, Ferrantini M, Lombardo C, Moretti F (Ed.). *Costruzione dell'area europea della ricerca in biomedicina e contributo degli enti di ricerca del Servizio Sanitario Nazionale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/27). p. 26-32.
3. Berrino F, Lombardo C, *et al.* The need of comparative survival information in Europe: Why do we need population based survival studies? *The European Journal of Cancer* (inviato per la pubblicazione).
4. Boyle P, Anderson BO, Andersson LC, Ariyaratne Y, Auleley GR, Barbacid M, Bartelink H, Baselga J, Behbehani K, Belardelli F, Berns A, Bishop J, Brawley O, Burns H, Clanton M, Cox B, Currow D, Dangou JM, de Valeriola D, Dinshaw K, Eggermont A, Fitzpatrick J, Forstman M, Garaci E, Gavin AT, Kakizoe T, Kasler M, Keita N, Kerr D, Khayat D, Khleif S, Khuhaprema T, Knezevic T, Kubinova R, Mallath M, Martin-Moreno J, McCance D, McVie JG, Merriman A, Ngoma T, Nowacki M, Orgelbrand J, Park JG, Pierotti M, Ashton LP, Puska P, Escobar CV, Rajan B, Rajkumar T, Ringborg U, Robertson C, Rodger A, Roovali L, Santini LA, Sarhan M, Seffrin J, Semiglazov V, Shrestha BM, Soo KC, Stamenic V, Tamblyn C, Thomas R, Tuncer M, Tursz T, Vaitkiene R, Vallejos C, Veronesi U, Wojtyla A, Yach D, Yoo KY, Zatonski W, Zaridze D, Zeng YX, Zhao P, Zheng T. Need for global action for cancer control. *Ann Oncol* 2008;19(9):1519-21.
5. Ferrantini M, Lombardo C, Moretti F, Belardelli F. Biotherapy of cancer. Break the barriers to foster translation of Knowledge. *Tumori* 2008;94(2):182-7.

6. Ferrantini M, Moretti F, Belardelli F. Il ruolo dell'Istituto Superiore di Sanità nel coordinamento della ricerca sul cancro e nello sviluppo di infrastrutture. *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* 2007;20(11):15-8.
7. Ferrantini M, Moretti F, Belardelli F. Infrastruttura europea EATRIS (European Advanced Translational Research Infrastructure in Medicine). In: Belardelli F, D'Alessandro F, Ferrantini M, Lombardo C, Moretti F (Ed.). *Costruzione dell'area europea della ricerca in biomedicina e contributo degli enti di ricerca del Servizio Sanitario Nazionale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/27). p. 55-8.
8. Lombardo C, Campione B, Albanese D, D'Alessandro F, Rondanina T. Il contributo italiano nella costruzione dello spazio europeo della ricerca: le aspettative per l'oncologia. In: *Collaborazione sanitaria internazionale e programmi europei*. Roma: Ministero della Salute; 2008. p. 95-102.
9. Lombardo C, Cope J, De Andres Medina R, Ferrantini M, Guillemette B, Wetteraurer B. Coordinating Cancer Research in Europe: the role of Member States. In: Moretti F, Romero M, Belardelli F (Ed.). *International Meeting. Needs and Challenges in Translational Medicine: filling the gap between basic research and clinical applications. Istituto Superiore di Sanità. Rome, Italy, October 1-3, 2008. Abstract Book*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (ISTISAN Congressi 08/C7). p.71
10. Lombardo C, D'Alessandro F. Considerazioni conclusive. In: Belardelli F, D'Alessandro F, Ferrantini M, Lombardo C, Moretti F (Ed.). *Costruzione dell'area europea della ricerca in biomedicina e contributo degli enti di ricerca del Servizio Sanitario Nazionale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/27). p. 83-84.
11. Lombardo C, D'Alessandro F. Costruzione e internazionalizzazione delle reti di ricerca nazionali in oncologia: il contributo italiano e la strategia per la competitività. In: Belardelli F, D'Alessandro F, Ferrantini M, Lombardo C, Moretti F (Ed.). *Costruzione dell'area europea della ricerca in biomedicina e contributo degli enti di ricerca del Servizio Sanitario Nazionale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/27). p. 17-22.
12. Lombardo C., Rondanina T, D'Alessandro F, Albanese D. Training and mobility, a priority for the network of European Comprehensive Cancer Centers. How a national mobility initiative could enhance the EU cooperation in cancer research contributing to ERA development: the example of the Alleanza Contro il Cancro Italian CCCs Network. *Tumori* 2008;94(2):147-53.
13. Maio M, Nicolay HJ, Ascierto P, Belardelli F, Camerini R, Colombo MP, Queirolo P, Ridolfi R, Russo V, Anzalone L, Fonsatti E, Parmiani G. The Italian Network for Tumor Biotherapy (NIBIT): getting together to push the field forward. *J Transl Med* 2008;6:8
14. Micheli A, Di Salvo F, Lombardo C, Ciampichini R, Baili P, Pierotti MA. The Italian performance in cancer research. *Tumori* (inviato per la pubblicazione).
15. Moretti F, Romero M, Belardelli F (Ed.). *International meeting. needs and challenges in translational medicine: filling the gap between basic research and clinical applications. Istituto Superiore di Sanità. Rome, Italy, October 1-3, 2008. Abstract Book*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (ISTISAN Congressi 08/C7).
16. Pierotti MA, Lombardo C, Rosano C. Nanotechnology: going small for a giant leap in cancer diagnostics and therapeutics. *Tumori* 2008;94(2):191-6.
17. Ringborg U, De Valeriola D, van Harten W, Bosch AL, Lombardo C, Nilsson K, Philip T, Pierotti MA, Riegman P, Saghatchian M, Storme G., Tursz T, Verellen D. Improving translational research in oncology: the role of the network of comprehensive cancer centres *Tumori* 2008;94(2):143-6.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.  
Le richieste possono essere inviate a: [pubblicazioni@iss.it](mailto:pubblicazioni@iss.it).*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl  
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

*Roma, gennaio-marzo 2009 (n. 1)*