

MODULO 1 - Dati generali

TITOLO DEL PROGETTO

Applicazione della chemioterapia alla rimodulazione della risposta immune antitumorale: studio dei meccanismi e “proof of concept” nell’uomo

COSTO COMPLESSIVO DEL PROGETTO	3.983.011
FINANZIAMENTO RICHIESTO AD ACC/ISS	1.800.000
RISORSE PROPRIE	2.183.011
COFINANZIAMENTI :	910.000

(SPECIFICARE ENTE EROGATORE, DATA INIZIO DISPONIBILITÀ FONDI E RELATIVO IMPORTO)

MIUR/FIRB	2007	350.000
ISS/NIH	2007	80.000
AIRC	PENDING	100.000
AIRC	PENDING	80.000
AIRC	PENDING	300.000
TOTALE		910.000

DURATA (in mesi, massimo 36): **36**

COORDINATORE DEL PROGETTO:

Nominativo: **Enrico Proietti**

Struttura di appartenenza: **Istituto Superiore di Sanità**

Funzione: **Direttore di Reparto**

Indirizzo: **Viale Regina Elena, 299 00161 - Roma**

N. tel: **0649903356**

N. fax: **0649903641**

indirizzo e-mail: enrico.proietti@iss.it

DESTINATARIO ISTITUZIONALE PROPONENTE

Destinatario Istituzionale **Istituto Superiore di Sanità (ISS)**

Rappresentante legale **Enrico Garaci**

Responsabile Scientifico UO 1 **Enrico Proietti**

Gruppi di ricerca afferenti al DI (Dipartimento/Sezione e nominativo del Responsabile Scientifico)

1.1	Dip. Biol. Cell. e Neuroscienze/Immunoregolazione	Enrico Proietti
1.2	Dip. Malattie Infet, Parass e Immunomediata (MIPI)/Patogenesi Molecolare	Angela Battistini
1.3	Dip. Ambiente e Prevenzione Primaria/Cancerogenesi Molecolare	Margherita Bignami
1.4	Dip. Biol. Cell. e Neuroscienze (DBCN)/Imaging Molecolare e Cellulare	Franca Podo
1.5	Dip. Biol. Cell. e Neuroscienze (DBCN)/Immunoterapia Sperimentale	Eleonora Aricò

Gruppi di ricerca afferenti ad altre Istituzioni di Ricerca (Istituzione e nominativi del Responsabile Scientifico e del Rappresentante Legale)

1.6	CNR, Istituto Neurobiol. e Medicina Mol.	Responsabile Scientifico: Gino Doria Rappresentante Legale: Pietro Calissano
-----	--	---

DESTINATARI ISTITUZIONALI PARTECIPANTI

Destinatario Istituzionale **Istituto Regina Elena (IRE)**

Rappresentante legale **Marino Nonis**

Responsabile Scientifico UO 2 **Paola Nisticò**

Gruppi di ricerca afferenti al DI (Dipartimento/Sezione e nominativo del Responsabile Scientifico)

2.1	Laboratorio Immunologia	Paola Nisticò
2.2	Laboratorio Immunologia/Patologia Molecolare	Piergiorgio Natali
2.3	Oncologia medica A	Virginia Ferraresi

Gruppi di ricerca afferenti ad altre Istituzioni di Ricerca (Istituzione e nominativi del Responsabile Scientifico e del Rappresentante Legale)

2.4	Istituto S. Gallicano.	Responsabile Scientifico: Caterina Catricalà Rappresentante Legale: Marino Nonis
2.5	Università di Roma “Tor Vergata”/Dip. Neuroscienze	Responsabile Scientifico: Ornella Franzese Rappresentante Legale:

MODULO 1

Destinatario Istituzionale	Istituto Scientifico Fondazione San Raffaele del Monte Tabor (HSR)
Rappresentante legale	Renato Botti
Responsabile Scientifico UO 3	Marco Bregni

Gruppi di ricerca afferenti al DI (Dipartimento/Sezione e nominativo del Responsabile Scientifico)

3.1	Programma di Ricerca Strategica di Terapia Sperimentale in Oncologia, Dipartimento di Oncologia, HSR	Marco Bregni
-----	---	--------------

Gruppi di ricerca afferenti ad altre Istituzioni di Ricerca (Istituzione e nominativi del Responsabile Scientifico e del Rappresentante Legale)

3.2	Istituto Nazionale Tumori di Milano	Responsabile Scientifico: Licia Rivoltini Rappresentante Legale: Stefano Zurrida
3.3	Istituto Europeo di Oncologia	Responsabile Scientifico: Maria Rescigno Rappresentante Legale: Carlo Ciani

MODULO 2 - DESCRIZIONE DEL PROGETTO (SINTESI DELLE ATTIVITÀ DI TUTTE LE UNITÀ OPERATIVE)

BASE DI PARTENZA E RAZIONALE

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 ostacolata da una serie di fenomeni quali l'immunosoppressione indotta da tumore e la limitata generazione di cellule effettrici antitumorali efficaci. 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. In questa ottica è possibile riconsiderare l'uso di alcuni chemioterapici per i loro effetti sull'organismo ed 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 alcuni 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 ed agire sulle cellule deputate al loro processamento (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. E' 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 linfopoietico; 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 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 in condizioni GMP, 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.

METODOLOGIA

Il progetto prevede il disegno e la realizzazione di due trial clinici di chemio- immunoterapia.

Il primo studio è articolato in due fasi: vaccinazione e immunoterapia adottiva. Lo studio sarà eseguito in pazienti con melanoma in stadio III e IV in cui il tumore è stato rimosso chirurgicamente. Il tessuto tumorale verrà in parte utilizzato per la caratterizzazione istologica e immunoistochimica e, in parte per verificare la fattibilità e la riproducibilità della preparazione di corpi apoptotici da usare per caricare le DC. Per il vaccino da utilizzare nello studio saranno invece utilizzati i corpi apoptotici derivati da cellule di melanoma allo geniche, che saranno caricati su cellule dendritiche ottenute dai monociti del sangue e coltivate in presenza di GM-CSF e IFN-alfa in condizioni GMP (IFN-DC). Nella prima fase dello studio i pazienti verranno suddivisi in due bracci (il numero di pazienti per braccio verrà stabilito in base a metodi predittivi della significatività delle risposte attese): un gruppo riceverà le sole IFN-DC caricate con corpi apoptotici (vaccino); il secondo riceverà il vaccino in associazione con la DTIC seguendo uno schema di trattamento già utilizzato in un precedente studio coordinato dall'ISS. I pazienti in cui la risposta immunitaria antitumorale indotta dal trattamento avrà raggiunto livelli elevati saranno sottoposti ad aferesi. I leucociti così ottenuti saranno congelati per essere reinfusi, 6 mesi dopo negli stessi individui (10^{11} cellule per paziente) un giorno dopo la somministrazione di Cy (60 mg/Kg). Le risposte cellulari e umorali specifiche contro il vaccino/tumore saranno valutate sia durante la vaccinazione che dopo il trasferimento adottivo dei linfociti. Saranno valutati anche gli effetti del trattamento chemioterapico sulle diverse sottopopolazioni cellulari responsabili dell'immunità innata e adattativa e sulla produzione di citochine e chemiochine. Infine, saranno valutati la tollerabilità del trattamento e la risposta clinica.

Il secondo studio prevede il trattamento di pazienti affetti da ca ovarico e da ca coloretale con i ad attività antitumorale. Tali linfociti saranno isolati dal sangue dei pazienti ed educati in vitro con opportune metodiche colturali (secondo Montagna e coll.). Raggiunto il numero sufficiente (ca. 10^{11} cellule) i linfociti saranno reinfusi i.v. nello stesso paziente dopo trattamento linfopenizzante con Cy e fludarabina. Anche in questi pazienti sarà effettuata una valutazione dei parametri immunologici e ematologici per misurare l'entità e la qualità delle risposte antitumorali e la tossicità dei trattamenti. End point secondari saranno l'intervallo libero da malattia e il tempo totale di sopravvivenza. Il numero dei pazienti da arruolare sarà stabilito in base a metodi predittivi della significatività delle risposte attese.

In parallelo verranno effettuati degli studi in modelli murini per valutare la capacità di diversi chemioterapici, caratterizzati da diversi meccanismi di azione, di potenziare l'attività antitumorale dell'immunoterapia. L'espressione genica indotta dai vari chemioterapici sarà valutata mediante microarray allo scopo di chiarire i meccanismi attraverso i quali la chemioterapia rende l'immunoterapia in grado di eradicare il tumore. Sarà inoltre valutato l'effetto della somministrazione dei chemioterapici sull'attivazione di cellule presentanti l'antigene, quali le DC, così come l'effetto dei farmaci sul numero e sull'attività di linfociti T regolatori. Sarà valutata anche l'induzione dell'apoptosi delle cellule tumorali da parte di ciascun chemioterapico e la correlazione tra l'induzione dell'apoptosi e l'incremento dell'efficacia antitumorale della chemio-immunoterapia.

RISULTATI ATTESI

UO1-ISS.

Nell'uomo:

- Disegno del trial clinico di vaccinazione con IFN-DC e immunoterapia adottiva in pazienti con melanoma.
- Preparazione dei corpi apoptotici dal tessuto tumorale.
- Messa a punto e validazione dei metodi di preparazione e “loading” delle DC in condizioni GMP nella “Cell factory” dell'Istituto Superiore di Sanità.
- Monitoraggio clinico, raccolta, conservazione e analisi dei dati clinici.
- Aspetti del monitoraggio immunologico relativi alla valutazione dei fattori prodotti durante il “Cytokine storm” indotto dal trattamento chemioterapico.

In modelli animali:

- Studio dell’effetto del “Cytokine storm” indotto dal trattamento chemioterapico sulle DC in modelli murini.
- Studio comparativo dell’effetto dei diversi chemioterapici sulle risposte immunitarie indotte dalla vaccinazione e in seguito a trasferimento adottivo di linfociti dotati di attività antitumorale.
- Effetto sulla vaccinazione dell’apoptosi delle cellule tumorali indotta in vivo dal trattamento chemioterapico
- Misurazione del numero e dell’attività delle Treg nei pazienti trattati, studio dell’influenza del fattore di trascrizione IRF1 sulle Treg.
- Effetto del trattamento con diversi chemioterapici sulle cellule T regolatorie e studio del ruolo dei fattori indotti da IFN I, con particolare riferimento a IRF-8, in modelli murini.
- Studio del ruolo dei sistemi di riparazione al danno genotossico da chemioterapici sull’induzione di meccanismi omeostatici del sistema linfo-emopoietico

UO2-IRE.

- Arruolamento dei pazienti con melanoma.
- Somministrazione della terapia
- Raccolta e invio dei campioni dai pazienti.
- Caratterizzazione istologica e immunoistologica dei tumori.

Monitoraggio immunologico standard.

Questa unità sarà affiancata da “Gruppi di ricerca di supporto” per svolgere le attività relative a:

- Aferesi e storage PBL utilizzati per il trasferimento adottivo.
- Trasferimento adottivo dei PBL.
- Marcatura con [111]I per il monitoraggio dell’homing dei PBL trasferiti.
- Monitoraggio della senescenza molecolare di linfociti T (funzione ed espressione di HTERT e dei livelli di SOCS-1 e SOCS-3) nei pazienti in studio (O. Francese, Univ. Tor Vergata, Roma)

UO3-HSR

- Disegno e lo svolgimento del trial clinico di chemio-immunoterapia con linfociti ad attività antitumorale in pazienti con ca dell’ovaio e del colon-retto
- Monitoraggio immunologico dei pazienti.
- Standardizzazione di alcune metodiche di valutazione dei correlati immunologici della risposta antitumorale
- Valutazione di meccanismi immunosoppressori e del loro impatto sulla risposta antitumore.
- Analisi dell’impatto di polimorfismi in geni immuno-relati e loro effetti sulla modulazione della risposta al vaccino.

Modello murino:

- Caratterizzazione di un modello murino di tumore intestinale (villin-K-RasV12G)
- Analisi dell’effetto combinato di Chemio-Immunoterapia sulla crescita del tumore
- Esame fenotipico e funzionale dell’infiltrato leucocitario

COMPOSIZIONE DEL COSTO COMPLESSIVO DEL PROGETTO

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	1.605.743	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	1.058.268	775.000
3. Missioni	150.000	64.000
4. Attrezzature	44.000	44.000
5. Materiale di Consumo	1.036.000	845.000
6. Pubblicazioni/ organizzazione convegni, ecc.	38.000	26.000
7. Elaborazione dati (specificare)	40.000	36.000
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)	11.000	10.000
TOTALE	3.983.011	1.800.000

Curriculum Vitae del Coordinatore del progetto

(INDICARE ANCHE LE 10 PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE RITENUTE PIÙ SIGNIFICATIVE, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO A QUELLE DELL'AREA TEMATICA SCIENTIFICA SULLA QUALE INSISTE IL PROGETTO)

Name: Enrico Proietti	Position : Research Director
------------------------------	-------------------------------------

Date of Birth	April 9, 1953		
Education and Training (include degrees and post-doctoral training)			
Institution and Location	Degree	Year	Field
University “La Sapienza”	M.D.	1972-1978	Medicine (Magna cum laude)
University “La sapienza”	Board certification	1979-1981	Immunology
University “La sapienza”	Board certification	1988-1991	Oncology

Present position	
Head of the “Immunoregulation Unit” Department of Cell Biology and Neurosciences, Istituto Superiore di Sanità	
RESEARCH, POSITION AND ACCADEMIC APPOINTMENTS	
1978-1979	MD assistant, unit of general medicine of the S. Giovanni Calibita Hospital “Fatebenefratelli”, Rome
1979-1981	Holder of a fellowship from "Istituto Superiore di sanità" (Laboratory of Bacterial and Viral Diseases, ISS, Rome)
1982-1992	Investigator of the Istituto Superiore di Sanità, Department of Virology
1988-1990	Visiting Scientist at the Laboratory of Viral Oncology, Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, Villejuif, France. (Director Prof. Ion Gresser)
1990-1995	Head of the Section "Respiratory viral infection" (Dept. of Virology, ISS)
1992-2000	Senior Investigator, Department of Virology, ISS, Rome
2000-to date	Director of Research, Department of Virology, ISS, Rome
2004-to date	Head of the Section "Immunoregulation" (Dept. of Cell Biology and Neurosciences, ISS)
PATENTS	
European Patent entitled: "Vaccines including as an adjuvant type I IFN and processes related thereto" Date of filing: April 17,2001.	
COORDINATION OF PROJECTS	
- Coordinator of an Operative Unit (OU) in the project “HIV pseudotype production to study the viral expression regulation in murine cells for the development of animal models” of the Italian Ministry of Health (1991). - Coordinator of the project “SCID xenochimeric models implanted with human cell lines susceptible of acute and persistent HIV infection for the study of antiretroviral therapies” of the Italian Ministry of Health (1993). - Coordinator of an Operative Unit (OU) on “IFN I and IL-12 as immune adjuvants in the influenza vaccination model” within the project “Cytokines as adjuvants for the preparation of new generation vaccines” of the Italian Ministry of Health (1995). - Coordinator of an OU on “ Novel antiviral and antitumor strategies by means of cytokine administration in combination with conventional drugs and immunotherapy strategies” within the project “ New emerging drugs for the biological response modification: development of new clinical strategies” of the Italian Ministry of Health (1998) - Coordinator of an OU on “ Emerging vaccination strategies: DNA immunization and adjuvant effect of type I interferon” within the project “Novel strategies for the development of viral vaccines” of the Italian Ministry of Health (2000) - Coordinator of an OU on “Experimental and clinical dissection of innate immunity against intracellular pathogens” within the 5th European Framework “Quality of life and management of living resources ”(2002) - Coordinator of the project “ Development of new strategies of immunotherapy and combined therapies against cancer” of the Italian Ministry of Health (2002) As coordinator of this project Dr. Proietti designed and coordinated the fist Italian clinical trial on the combination of chemotherapy (dacarbazine) and antitumor vaccination in melanoma patients.	
REFERENCES FROM THE LAST YEARS RELEVANT TO THE TOPIC AREA OF THIS RESEARCH PROPOSAL	
Nistico’ P., P.G. Natali, B. Palermo, D. Del Bello, A. Ranieri, V. Ferraresi, F. Cognetti, M.Ciccarese, G. Vercillo,	

M. Valentini, L. Bracci, F. Moschella, M. Roselli, E. Fossile, F. Belardelli, I. Capone, **E. Proietti**. Dacarbazine treatment enhances vaccine-mediated antitumor immunity in melanoma patients. Submitted for publication.

Bracci L., Moschella F., Sestili P., La Sorsa V., Valentini M., Canini I., Baccarini S., Maccari S., Ramoni C., Belardelli F. and **Proietti E**. Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B and T cell homeostatic proliferation and specific tumor infiltration.. 2007. Clin Cancer Res. 13: 644-53.

Schiavoni, G. Mauri, C. Carlei, D. Belardelli, F. Castellani Pastoris, M. and **Proietti, E**. Type I IFN protects permissive macrophages from *Legionella pneumophila* infection through an IFN-gamma-independent pathway. 2004, Journal of Immunology, 173: 1266-1275.

Proietti E, Bracci L, Puzelli S, Di Pucchio T, Sestili P, De Vincenzi E, Venditti M, Capone I, Seif I, De Maeyer E, Tough D, Donatelli I, Belardelli F. Type I Interferon as a natural adjuvant for a protective immune response: lessons from the influenza vaccine model. 2002, Journal of Immunology, 169: 375-383.

Belardelli F, Ferrantini M, **Proietti E**, Kirkwood JM. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. 2002, Cytokine Growth Factor Rev. 13: 119-34.

Gallo D., Ferlini C., Distefano M., Cantelmo F, Gaggini C., Fattorossi A., Riva A, Bombardelli E, **Proietti E.**, Mancuso S., Scambia G. Anti-tumour activity of a panel of taxanes toward a cellular model of human cervical cancer. 2000, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 45: 127-132.

Schiavoni G., F. Mattei, T. Di Pucchio, S. M. Santini, L. Bracci, F. Belardelli and **E. Proietti**. Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44^{hi} T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer. 2000, Blood, 95: 2024-2030.

Rozera C., Mecchia M., Gresser I., Bandu M.T., **E. Proietti.**, Venditti M., Sestili P., Santini S.M., Fais S., Belardelli F., and Ferrantini M.. Murine IFN- α/β gene -transduced ESb tumor cells rejected by host-mediated mechanisms despite the resistance of the parental tumor to IFN- α/β therapy. 1999, Cancer Gene Therapy 3: 246-253.

Belardelli F., Ferrantini M., Santini S.M., Baccarini S., **E. Proietti.**, Colombo M.P., Sprent J. and Tough D.F. The induction of in vivo proliferation of long-lived CD44^{hi} CD8⁺ T cells after the injection of tumor cells expressing IFN-alpha1 into syngeneic mice. 1998, Cancer Res. 58, 5795-5802.

Proietti E., G. Greco, B. Garrone, S. Baccarini, C. Mauri , M. Venditti, D. Carlei F. Belardelli. Importance of cyclophosphamide-induced bystander effect on T cells for a successful tumor eradication in response to adoptive immunotherapy in mice. 1998, J. Clinical Investigation, 101, 429-441.

MODULO 3: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUNA UNITÀ OPERATIVA

UNITÀ OPERATIVA: UO1 – ISS

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Enrico Proietti**

struttura di appartenenza : ISS funzione: Direttore di reparto

indirizzo : Viale Regina Elena, 299 00161 - Roma

N. tel: 0649903356 N. fax: 0649903641

indirizzo E-mail: enrico.proietti@iss.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Enrico Garaci**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

La UO1 disegnerà e coordinerà un trial clinico di chemio-immunoterapia in pazienti con melanoma articolato in due fasi: vaccinazione e immunoterapia adottiva. In particolare, si occuperà della preparazione di vaccini costituiti da cellule dendritiche autologhe (DC), caricate con corpi apoptotici derivati dal tumore autologo, da somministrare ai pazienti in combinazione con un trattamento standard (6 cicli) con dacarbazina (DTIC). Il trial clinico sarà accompagnato da una valutazione clinica, da una valutazione immunologica e molecolare. La valutazione molecolare avrà come fine ultimo quello di individuare, mediante microarray sui PBMC dei pazienti, i fattori modulati dal chemioterapico implicati nella regolazione della risposta immune e l'eventuale presenza di specifici profili di espressione genica che possano essere associati all'efficacia delle terapie. In pazienti con melanoma ed altri tumori solidi sono presenti diversi tipi di cellule immunosoppressive, fra le quali i linfociti T regolatori (Treg), che possono fortemente limitare l'efficacia dell'immunoterapia. Pertanto saranno studiati il numero e l'attività delle cellule Treg nei pazienti in seguito al trattamento chemioterapico.

In parallelo verranno effettuati studi in modelli murini atti a definire meglio i meccanismi coinvolti nel potenziamento della risposta immune da parte dei chemioterapici. A tal fine verranno analizzati i profili di espressione genica indotti nella milza e nel midollo osseo dal trattamento con diversi chemioterapici mediante microarray. In aggiunta, verrà valutato l'effetto dei chemioterapici sulla capacità delle DC di stimolare risposte T CD4⁺ e CD8⁺ contro il tumore e di cross-presentare antigeni tumorali. I meccanismi d'azione della chemioterapia saranno esaminati anche in relazione all'attività funzionale delle sottopopolazioni di cellule T helper e Treg. In particolare, saranno studiati gli effetti del trattamento chemioterapico sull'espressione del fattore di trascrizione IRF-1 e conseguentemente di FOXP3 nelle cellule Treg. Sarà inoltre approfondito il ruolo dei sistemi di riparazione del danno al DNA provocato da chemioterapici nell'omeostasi del sistema linfo-emopoietico ed il ruolo del PH tumorale sulla sensibilità ai chemioterapici.

METODOLOGIA

Il trial clinico prevede l'arruolamento di circa 30 pazienti con melanoma in stadio III-IV, nei quali sia possibile asportare la totalità del tumore. Il tessuto tumorale prelevato sarà utilizzato per la preparazione, mediante irraggiamento, dei corpi apoptotici con cui caricare le cellule dendritiche. Le DC, derivate da monociti autologhi, prelevati mediante aferesi, saranno preparate in strutture idonee secondo modalità GMP per essere reinfuse nel paziente dopo ogni trattamento con DTIC. In una seconda fase, ai pazienti che avranno mostrato risposte immuni antitumorali significative, saranno prelevati, mediante aferesi successive, i PBMC. I leucociti così ottenuti verranno congelati e reinfusi negli stessi individui un giorno dopo la somministrazione di ciclofosfamide (adoptive cell transfer). Gli end points primari dello studio sono la valutazione della tollerabilità e della tossicità del

trattamento e la misurazione delle risposte immunologiche contro marcatori tumorali. I pazienti saranno seguiti nel tempo per valutare anche le risposte cliniche, il tempo libero da malattia e la sopravvivenza complessiva.

Tali valutazioni saranno accompagnate da indagini molecolari. L’RNA antisense proveniente dai PBMC dei pazienti trattati verrà ibridato su vetrini di microarray contenenti cDNA rappresentativi di circa 17.000 geni. Analisi statistiche permetteranno di identificare i geni modulati dal trattamento chemioterapico e di evidenziare eventuali correlazioni tra i profili di espressione e l’efficacia della terapia. Accanto al monitoraggio immunologico classico saranno valutate le caratteristiche fenotipiche e funzionali delle cellule T reg mediante analisi al FACS e saggi di soppressione *in vitro*.

Studi in modelli animali saranno condotti per stabilire quali classi di chemioterapici siano ottimali nell’indurre risposte efficaci in seguito a immunoterapia in topi portatori di tumore. L’analisi fine dei meccanismi attraverso cui i chemioterapici stimolano la risposta immune antitumorale sarà effettuata mediante ibridazione di RNA antisense marcati provenienti da milza e midollo osseo a piattaforme microarray contenenti più di 13000 geni. Saranno anche descritti il fenotipo delle DC murine mediante FACS e l’abilità delle stesse di stimolare risposte T CD4⁺ e CD8⁺ contro il tumore e di cross-presentare antigeni tumorali mediante ELISPOT, multimer staining e test di citotossicità.

Inoltre saranno determinati, attraverso l’analisi al FACS, il fenotipo e l’espressione di marcatori di differenziamento/ attivazione delle cellule Treg CD4⁺CD25⁺ nonché la loro attività soppressoria *in vitro*.

Si utilizzeranno infine tecniche di spettroscopia e di risonanza magnetica *in vitro* e localizzata *in vivo* per rivelare e monitorare nei tumori specifiche alterazioni biochimiche considerate indicative della progressione tumorale.

COMPOSIZIONE DEL COSTO COMPLESSIVO DEL PROGETTO

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	755.743	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	511.268	344.000
3. Missioni	47.500	37.500
4. Attrezzature	34.000	34.000
5. Materiale di Consumo	526.000	493.000
6. Pubblicazioni/ organizzazione convegni, ecc.	15.500	7.500
7. Elaborazione dati (specificare)	20.000	20.000
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)	5.000	4.000
TOTALE	1.915.011	940.000

Curriculum Vitae del Responsabile Scientifico dell'Unità Operativa

(PERIODO DI RIFERIMENTO: ULTIMI 5 ANNI; INDICARE ANCHE LE 10 PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE RITENUTE PIÙ SIGNIFICATIVE, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO A QUELLE DELL'AREA TEMATICA SCIENTIFICA SULLA QUALE INSISTE IL PROGETTO)

Name: Enrico Proietti	Position : Research Director
------------------------------	-------------------------------------

Date of Birth	April 9, 1953		
Education and Training (include degrees and post-doctoral training)			
Institution and Location	Degree	Year	Field
University “La Sapienza”	M.D.	1972-1978	Medicine (Magna cum laude)
University “La sapienza”	Board certification	1979-1981	Immunology
University “La sapienza”	Board certification	1988-1991	Oncology

Present position	
Head of the “Immunoregulation Unit” Department of Cell Biology and Neurosciences, Istituto Superiore di Sanità	
RESEARCH, POSITION AND ACCADEMIC APPOINTMENTS	
1978-1979	MD assistant, unit of general medicine of the S. Giovanni Calibita Hospital “Fatebenefratelli”, Rome
1979-1981	Holder of a fellowship from "Istituto Superiore di sanità" (Laboratory of Bacterial and Viral Diseases, ISS, Rome)
1982-1992	Investigator of the Istituto Superiore di Sanità, Department of Virology
1988-1990	Visiting Scientist at the Laboratory of Viral Oncology, Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, Villejuif, France. (Director Prof. Ion Gresser)
1990-1995	Head of the Section "Respiratory viral infection" (Dept. of Virology, ISS)
1992-2000	Senior Investigator, Department of Virology, ISS, Rome
2000-to date	Director of Research, Department of Virology, ISS, Rome
2004-to date	Head of the Section "Immunoregulation" (Dept. of Cell Biology and Neurosciences, ISS)
PATENTS	
European Patent entitled: "Vaccines including as an adjuvant type I IFN and processes related thereto" Date of filing: April 17,2001.	
COORDINATION OF PROJECTS	
- Coordinator of an Operative Unit (OU) in the project “HIV pseudotype production to study the viral expression regulation in murine cells for the development of animal models” of the Italian Ministry of Health (1991). - Coordinator of the project “SCID xenochimeric models implanted with human cell lines susceptible of acute and persistent HIV infection for the study of antiretroviral therapies” of the Italian Ministry of Health (1993). - Coordinator of an Operative Unit (OU) on “IFN I and IL-12 as immune adjuvants in the influenza vaccination model” within the project “Cytokines as adjuvants for the preparation of new generation vaccines” of the Italian Ministry of Health (1995). - Coordinator of an OU on “ Novel antiviral and antitumor strategies by means of cytokine administration in combination with conventional drugs and immunotherapy strategies” within the project “ New emerging drugs for the biological response modification: development of new clinical strategies” of the Italian Ministry of Health (1998) - Coordinator of an OU on “ Emerging vaccination strategies: DNA immunization and adjuvant effect of type I interferon” within the project “Novel strategies for the development of viral vaccines” of the Italian Ministry of Health (2000) - Coordinator of an OU on “Experimental and clinical dissection of innate immunity against intracellular pathogens” within the 5th European Framework “Quality of life and management of living resources ”(2002) - Coordinator of the project “ Development of new strategies of immunotherapy and combined therapies against cancer” of the Italian Ministry of Health (2002) As coordinator of this project Dr. Proietti designed and coordinated the fist Italian clinical trial on the combination of chemotherapy (dacarbazine) and antitumor vaccination in melanoma patients.	

REFERENCES FROM THE LAST YEARS RELEVANT TO THE TOPIC AREA OF THIS RESEARCH PROPOSAL

Nistico' P., P.G. Natali, B. Palermo, D. Del Bello, A. Ranieri, V. Ferraresi, F. Cognetti, M.Ciccarese, G. Vercillo, M. Valentini, L. Bracci, F. Moschella, M. Roselli, E. Fossile, F. Belardelli, I. Capone, **E. Proietti**. Dacarbazine treatment enhances vaccine-mediated antitumor immunity in melanoma patients. Submitted for publication.

Bracci L., Moschella F., Sestili P., La Sorsa V., Valentini M., Canini I., Baccarini S., Maccari S., Ramoni C., Belardelli F. and **Proietti E**. Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B and T cell homeostatic proliferation and specific tumor infiltration.. 2007. Clin Cancer Res. 13: 644-53.

Schiavoni, G. Mauri, C. Carlei, D. Belardelli, F. Castellani Pastoris, M. and **Proietti, E**. Type I IFN protects permissive macrophages from *Legionella pneumophila* infection through an IFN-gamma-independent pathway. 2004, Journal of Immunology, 173: 1266-1275.

Proietti E, Bracci L, Puzelli S, Di Pucchio T, Sestili P, De Vincenzi E, Venditti M, Capone I, Seif I, De Maeyer E, Tough D, Donatelli I, Belardelli F. Type I Interferon as a natural adjuvant for a protective immune response: lessons from the influenza vaccine model. 2002, Journal of Immunology, 169: 375-383.

Belardelli F, Ferrantini M, **Proietti E**, Kirkwood JM. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. 2002, Cytokine Growth Factor Rev. 13: 119-34.

Gallo D., Ferlini C., Distefano M., Cantelmo F, Gaggini C., Fattorossi A., Riva A, Bombardelli E, **Proietti E.**, Mancuso S., Scambia G. Anti-tumour activity of a panel of taxanes toward a cellular model of human cervical cancer. 2000, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 45: 127-132.

Schiavoni G., F. Mattei, T. Di Pucchio, S. M. Santini, L. Bracci, F. Belardelli and **E. Proietti**. Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44^{hi} T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer. 2000, Blood, 95: 2024-2030.

Rozera C., Mecchia M., Gresser I., Bandu M.T., **E. Proietti.**, Venditti M., Sestili P., Santini S.M., Fais S., Belardelli F., and Ferrantini M.. Murine IFN- α/β gene -transduced ESb tumor cells rejected by host-mediated mechanisms despite the resistance of the parental tumor to IFN- α/β therapy. 1999, Cancer Gene Therapy 3: 246-253.

Belardelli F., Ferrantini M., Santini S.M., Baccarini S., **E. Proietti.**, Colombo M.P., Sprent J. and Tough D.F. The induction of in vivo proliferation of long-lived CD44^{hi} CD8⁺ T cells after the injection of tumor cells expressing IFN-alpha1 into syngeneic mice. 1998, Cancer Res. 58, 5795-5802.

Proietti E., G. Greco, B. Garrone, S. Baccarini, C. Mauri, M. Venditti, D. Carlei F. Belardelli. Importance of cyclophosphamide-induced bystander effect on T cells for a successful tumor eradication in response to adoptive immunotherapy in mice. 1998, J. Clinical Investigation, 101, 429-441.

GRUPPO DI RICERCA: 1.1 ISS/DBCN/Immunoregolazione

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Enrico Garaci**

Sudi in modelli animali saranno condotti per stabilire quali classi di chemioterapici funzionano meglio per indurre risposte efficaci in seguito a immunoterapia in topi portatori di tumore.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente _____ _____ _____	115.000	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio _____ _____ _____	220.000	220.000
3. Missioni _____ _____ _____	20.000	10.000
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing): _____ _____ _____	25.000	25.000
5. Materiale di consumo _____ _____ _____	310.000	310.000
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc. _____ _____ _____	10.000	5.000
7. Elaborazione dati (specificare) _____ _____ _____	20.000	20.000
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) _____ _____	_____	_____
TOTALE	720.000	590.000

MODULO 3BIS: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUN GRUPPO DI RICERCA

GRUPPO DI RICERCA: 1.2 ISS/MIPI/Patogenesi Molecolare

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Angela Battistini**

struttura di appartenenza : ISS funzione: Direttore di reparto

indirizzo : Viale Regina Elena, 299 00161 - Roma

N. tel: N. fax:

indirizzo E-mail: angela.battistini@iss.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Enrico Garaci**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

La presente proposta ha come obiettivo principale la definizione dei meccanismi e dei marcatori molecolari dell'effetto del trattamento chemioterapico sulle cellule T regolatorie e se essi includano fattori di trascrizione quali IRF-1 un fattore di trascrizione a valle del *signaling* dell'interferone e considerato un oncosoppressore e recentemente da noi dimostrato in grado di reprimere in maniera specifica il marcatore genetico delle cellule T regolatorie FOXP3. Nell'ambito del progetto proposto, questi studi possono, pertanto, contribuire da un lato alla delucidazione dei meccanismi di azione dei chemioterapici in uno studio comparativo dell'effetto dei diversi chemioterapici sulle risposte immunitarie indotte dalla vaccinazione o dall'immunoterapia, sia sul materiale clinico che nei modelli animali preclinici, dall'altra può aprire a nuove strategie di intervento da affiancare ai protocolli di immunoterapia nei trial clinici.

METODOLOGIA

Gli studi proposti prevedono l'utilizzo sia di modelli animali preclinici che l'analisi in vitro del materiale proveniente dai pazienti inclusi nei due trials clinici.

Saranno studiati gli effetti immunomodulatori del trattamento chemioterapico sulle diverse sottopopolazioni cellulari responsabili dell'immunità innata ed adattativa. In particolare saranno analizzate le caratteristiche delle cellule T regolatorie CD4⁺CD25⁺ dette “natural” dopo loro purificazione mediante selezione positiva. Sarà determinato attraverso l'analisi al FACS il loro fenotipo e l'espressione di marcatori di differenziazione/attivazione e capacità di homing. Verrà inoltre valutata la loro capacità funzionale soppressoria attraverso saggi di soppressione in vitro contro linfociti T autologhi. Verrà valutato l'effetto del trattamento chemioterapico anche sulla risposta proliferativa a IL-2 e a stimoli antigenici specifici. Infine verrà determinata l'espressione di IRF-1 e FOXP3 in relazione ai trattamenti chemioterapici. Abbiamo infatti recentemente dimostrato che IRF-1 è in grado di reprimere in maniera assolutamente specifica l'espressione del FOXP3 marcatore genetico delle cellule Treg. Inoltre verrà valutata la capacità dopo i trattamenti terapeutici, delle cellule CD4⁺CD25⁻ di differenziare in cellule Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ attraverso un protocollo sperimentale che permette di ottenere da cellule CD4⁺CD25⁻ un numero discreto e sufficientemente elevato di cellule Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ da utilizzare per studi funzionali e molecolari.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente _____ _____	167.043	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio _____ _____	127.268	_____
3. Missioni _____	5.000	5.000
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing): _____ _____	-	-
5. Materiale di consumo _____ _____	108.000	75.000
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.	3.000	-
7. Elaborazione dati (specificare) ____ _____ _____	-	-
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) _____ _____		
TOTALE	410.311	80.000

MODULO 3BIS: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUN GRUPPO DI RICERCA

GRUPPO DI RICERCA: 1.3 ISS/DA/Cancerogenesi Molecolare

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Margherita Bignami**

struttura di appartenenza : ISS funzione: Direttore di reparto

indirizzo : Viale Regina Elena, 299 00161 - Roma

N. tel: N. fax:

indirizzo E-mail: margherita.bignami@iss.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Enrico Garaci**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

Studio del ruolo dei sistemi di riparazione del danno al DNA indotto da farmaci chemioterapici sull'induzione di meccanismi omeostatici del sistema linfo-emopoietico.

METODOLOGIA

In considerazione del fatto che i farmaci chemioterapici utilizzati nel protocollo appartengono alla classe degli agenti alchilanti verrà analizzata l'attività della O6-metilguanina DNA metiltransferasi (MGMT), di geni coinvolti nella riparazione del DNA via “base excision repair”, del “mismatch repair” e della riparazione via ricombinazione. I livelli di espressione dei geni coinvolti verranno analizzati a diversi tempi dal trattamento in popolazioni cellulari del sistema linfo-emopoietico attraverso real-time PCR utilizzando low-density arrays (Applera). L'attività riparativa della MGMT verrà seguita utilizzando substrati sintetici di DNA contenenti O6-metilguanina radioattiva. In parallelo verranno svolti studi sia sui livelli che sul timing dell'induzione di apoptosi da parte del trattamento, utilizzando l'analisi via FACS di popolazioni cellulari annessina V-positive.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente dirigente 12 mesi _____ 2x CTD 12 mesi _____ _____	180.000	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio _contratto x 2 anni _____ _____ _____	50.000	50.000
3. Missioni _____ _____ _____	_____	_____
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing): _____ _____ _____	_____	_____
5. Materiale di consumo _____ _____ _____	20.000	20.000
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc. _____ _____ _____	_____	_____
7. Elaborazione dati (specificare) _____ _____ _____	_____	_____
8. Spese generali delle strutture coinvolte (10%) _____	_____	_____
TOTALE	250.000	70.000

MODULO 3BIS: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUN GRUPPO DI RICERCA

GRUPPO DI RICERCA: 1.4 ISS/BCN/Imaging Molecolare e Cellulare

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Franca Podo**

struttura di appartenenza : ISS funzione: Direttore di reparto

indirizzo : Viale Regina Elena, 299 00161 - Roma

N. tel: N. fax:

indirizzo E-mail: franca.podo@iss.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Enrico Garaci**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

Evidenze sperimentali concordano sul ruolo del pH tumorale sulla sensibilità ai chemioterapici (Luciani L et al J Natl Cancer Inst 2004) in relazione a meccanismi di regolazione dell'acidità tumorale. Questo progetto prevede di analizzare sia in vitro che in vivo, effetti metabolici (Podo et al Curr Med Image Rev 2007) e la capacità di binding di anticorpi monoclonali usati nel trattamento di pazienti con tumore (e.g. Herceptin) in condizioni di vario pH ambientale, in presenza od in assenza di farmaci (inibitori delle pompe protoniche) in grado di bloccare le ATPasi vacuolari.

METODOLOGIA

Si utilizzeranno tecniche di spettroscopia di risonanza magnetica in vitro e localizzata in vivo in topi scid portatori di tumori umani.

Il pH extracellulare sarà determinato dagli spettri ^1H , ^{19}F e ^{31}P localizzati in vivo per mezzo dell'uso di composti impermeabili alla membrana cellulare, rispettivamente, 3-APP e ZK150471 (Ojugo et al NMR Biomed 1999) e IEPA (Garcia-Martin et al Cancer Res 2001). Dalla posizione del segnale del fosfato inorganico negli spettri ^{31}P si determinerà il pH intracellulare e quindi il gradiente di pH attraverso la membrana plasmatica.

Dai profili spettrali sarà possibile rivelare e monitorare nei tumori in vivo specifiche alterazioni biochimiche oggi considerate indicatori diagnostici e possibili bersagli farmacologici. Per esempio il segnale della colina negli spettri ^1H e i segnali dei fosfomonoesteri e dei fosfodiesteri negli spettri ^{31}P sono indicatori di progressione tumorale e possibili indicatori di risposta alla terapia.

Apparecchiature utilizzate (Reparto Imaging Molecolare e Cellulare, Dipt. BCN, ISS): apparato per imaging e spettroscopia Varian Inova 200/183 e spettrometri in vitro NMR Bruker Avance 400 e 700.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente _____ _____	120.000	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio _____ _____	44.000	44.000
3. Missioni _____	6.000	6.000
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing): _____ _____	9.000	9.000
5. Materiale di consumo _____ _____	19.000	19.000
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.	2.000	2.000
7. Elaborazione dati (specificare) _____ _____		
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) _____ _____ _____ _____		
TOTALE	200.000	80.000

MODULO 3BIS: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUN GRUPPO DI RICERCA

GRUPPO DI RICERCA: 1.5 ISS/BCN/Immunoterapia Sperimentale

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Eleonora Aricò**

struttura di appartenenza : ISS funzione: Ricercatore

indirizzo : Viale Regina Elena, 299 00161 - Roma

N. tel: 0649903004 N. fax: 0649903641

indirizzo E-mail: enrico.proietti@iss.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Enrico Garaci**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

Questo gruppo di lavoro si occuperà di studiare i meccanismi di azione dei protocolli di chemio-immunoterapia analizzando le eventuali modulazioni indotte dai trattamenti sull'espressione genica dei PBMC dei pazienti. Oltre a caratterizzare quali famiglie geniche vengano più intensamente interessate da fenomeni di incremento o flessione, si valuterà la possibile correlazione tra l'efficacia delle terapie esaminate e la presenza di specifici profili di espressione genica nei PBMC dei pazienti, che possano diventare marcatori predittivi dell'efficacia delle terapie stesse.

METODOLOGIA

L'impatto dei trattamenti chemio-immunoterapici sull'espressione genica dei PBMC dei pazienti verrà studiato confrontando campioni di sangue prelevati prima e a diversi tempi dopo i trattamenti stessi. Dall'RNA totale isolato dai PBMCs verrà ottenuto RNA antisense, successivamente sottoposto a marcatura fluorescente mediante retrotrascrizione in presenza di Cy5. L'RNA isolato da una miscela di PBMC di donatori sani verrà utilizzato come campione di riferimento, e sottoposto ad analoga marcatura in presenza di Cy3. Le sonde così ottenute verranno miscelate in parti uguali e co-ibridate su vetrini di microarray contenenti cDNA rappresentativi di circa 17000 geni. La valutazione colorimetrica dell'entità di ibridazione dei campioni da testare rispetto al campione di riferimento rivelerà i livelli di espressione di ciascuno dei 17000 geni rappresentati sui vetrini. Ulteriori analisi statistiche permetteranno di identificare gruppi di geni specificamente modulati dai trattamenti, e di valutare l'esistenza di correlazioni tra la risposta immunologica e clinica dei pazienti ed i profili di espressione genica osservata nei PBMC da essi isolati.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente ____N.1 Ricercatore____ ____N.1 Tecnico____ _____ _____	123700	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio _____ _____ _____ _____	_____	_____
3. Missioni _____ _____ _____	15000	15000
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing): _____ _____ _____ _____	_____	_____
5. Materiale di consumo _____ _____ _____	64500	64500
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc. _____ _____ _____	500	500
7. Elaborazione dati (specificare) _____ _____ _____	_____	_____
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) _____ _____ _____	_____	_____
TOTALE	203700	80000

MODULO 3BIS: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUN GRUPPO DI RICERCA

GRUPPO DI RICERCA: 1.6 CNR/Istituto Neurobiol. Med. Molecolare

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Gino Doria**

struttura di appartenenza : CNR-INMM

funzione: Professore di Immunologia

indirizzo : Via Fosso del Cavaliere

N. tel: 0672594242 N. fax: 0602023500

indirizzo E-mail: gino.doria@uniroma2.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Pietro Calissano**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

Il blocco della funzione delle cellule CD4⁺ CD25⁺ T regolatorie (Treg) può essere un aiuto per sconfiggere i tumori. La presente ricerca prevede uno studio sugli effetti del trattamento con ciclofosfamide sullo sviluppo delle cellule Th e Treg, sull'omeostasi periferica e sulla loro funzione prima e dopo il trattamento con ciclofosfamide. Il progetto ha lo scopo di identificare i meccanismi cellulari e molecolari. Gli effetti di questo farmaco saranno analizzati anche in termini di attivazione e di funzione effettrici di cellule Th CD4⁺ naive dopo trattamento.

METODOLOGIA

Il presente studio è basato su modelli di ricerca murini. Topi C57Bl/6 o Balb/c saranno trattati con un singolo inoculo di ciclofosfamide (100mg/Kg, i.p.). Dopo il trattamento, gli animali saranno sacrificati e le cellule purificate dal midollo osseo, timo, milza, e linfonodi saranno analizzati in citofluorimetria, per valutare le frequenze delle diverse popolazioni linfocitarie prima e dopo la condizione di linfopenia indotta dalla somministrazione di ciclofosfamide.

Per valutare gli effetti della ciclofosfamide sull'attivazione delle cellule Th CD4⁺, alcuni gruppi sperimentali saranno inoculati con cellule transgeniche T CD4⁺ naive (D011.10) dopo somministrazione di ciclofosfamide. Questi topi successivamente saranno immunizzati con l'antigene OVA. La risposta immune sarà valutata in termini di frequenze di cellule D011.10+, e produzione di citochine Th1/Th2 in seguito a restimolazione con l'antigene *ex vivo*.

Questi risultati preliminari saranno confermati nel modello tumorale EG7-OVA. Gli effetti della ciclofosfamide saranno valutati in termini di frequenza e attività di cellule Treg infiltranti.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente Prof. ordinario	50000	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio 1 Ricercatore a contratto, 3 dottorandi	70000	30000
3. Missioni Partecipazione a congressi	1500	1500
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):	_____	_____
5. Materiale di consumo Reagenti e consumabile	4500	4500
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.	_____	_____
7. Elaborazione dati (specificare)	_____	_____
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) 5 %_(OVERHEADS)per spese di gestione	5000	4000
TOTALE	131000	40 000

MODULO 3: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUNA UNITÀ OPERATIVA

UNITÀ OPERATIVA: UO2 - IRE

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Paola Nisticò**

struttura di appartenenza : Istituto Regina Elena, lab. immunologia funzione: dirigente i livello

indirizzo : via delle messi d'oro 156 – 00158 roma

n. tel: +39-06-52662539 fax: +39-06-52662600

indirizzo E-mail: nistico@ifo.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Marino Nonis**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

Questa U.O. contribuirà al disegno e allo svolgimento di un trial clinico di fase I/II nel melanoma umano che include trattamenti integrati di chemioterapia con agenti alchilanti quali la DACARBAZINA e vaccinazioni tumorali. Si avvale di una esperienza già maturata che ha visto l'interazione clinico-scientifica tra l'ISS e l'Istituto Tumori Regina Elena nel disegno e svolgimento di un precedente trial clinico di combinazione terapeutica di DACARBAZINA (DTIC) e vaccino peptidico.

Tale trial ha posto le basi per nuovi approcci terapeutici che impiegano il pre-trattamento con alcune classi di chemioterapici quali potenziali induttori della risposta immunitaria anti-tumore.

Il progetto vedrà coinvolte diverse unità che rappresentano una consolidata rete che ha inizio con la collaborazione con l'ISG (Dr.ssa Catricalà) struttura a cui afferisce una elevata casistica di melanomi, documentata in database. Tale UO è strettamente relata all'UO clinica dell'Oncologia Medica (Dr.ssa Ferraresi) che arruolerà e seguirà clinicamente i pazienti, e altre due Unità del Laboratorio di Immunologia (Dr. Natali, Dr.ssa Nisticò) del Dipartimento di Oncologia Sperimentale IRE, che svolgeranno il monitoraggio immunologico e lo studio fenotipico e molecolare di lesioni tumorali e popolazioni linfocitarie.

Un dettagliato monitoraggio immunologico con caratterizzazione fenotipica e funzionale delle popolazioni eventualmente attivate dal trattamento di combinazione terapeutico, in parallelo allo studio delle caratteristiche fenotipiche del tumore e del suo microambiente potranno rappresentare un potenziale criterio di predittività di risposta alla terapia combinata.

L'UO operativa della Dr.ssa Franzese dell'Università Tor Vergata contribuirà all'identificazione del ruolo della senescenza molecolare di sottopopolazioni linfocitarie dei pazienti sottoposti al screening ed eventuale trattamento chemioterapico combinato a vaccinazione antitumorale.

METODOLOGIA

Lo svolgimento di questo trial clinico nel melanoma umano di fase I/II si baserà su una forte interazione tra Unità cliniche e sperimentali, che già hanno lavorato in sinergia nello svolgimento di trias clinici di immunoterapia combinata nel melanoma umano. In particolare pazienti afferenti alla struttura complessa di Dermatologia Oncologica dell'Istituto San Gallicano i cui dati relativi alla casistica sono archiviati in un database, saranno immessi con schede relative all'anamnesi personale e familiare, alle caratteristiche fenotipiche del soggetto, alle abitudini di vita, alle modalità di esposizione al sole, sia con schede relative alle caratteristiche macroscopiche e microscopiche del melanoma primitivo, allo staging, alla terapia chirurgica ed al follow up clinico-strumentale.

I pazienti affetti da melanoma III, IV stadio, afferenti alla Oncologia Medica e di cui si conosce il precedente follow-up, verranno informati della possibilità di entrare nel trial di chemioterapia (Dacarbazina) inoculata prima della vaccinazione. Si prevede lo screening di circa 80 pazienti, i quali saranno sottoposti ad un primo prelievo

ematico per valutare l’aplotipo HLA. Questa fase avviene in stretta collaborazione con il Laboratorio di Immunologia del Dipartimento di Oncologia Sperimentale.

L’unità clinica di Oncologia contribuirà alla esecuzione di prelievi ematici dei pazienti, prima e a diversi tempi durante i cicli di chemioterapia somministrata prima della vaccinazione. I pazienti arruolati saranno monitorati per la tossicità, per ripresa della malattia e “overall survival”. I dati clinici, correlati di adeguata analisi statistica, saranno interfacciati con i dati del monitoraggio immunologico.

In parallelo, in collaborazione con le Anatomie Patologiche di ISG e IRE verranno ampiamente caratterizzate le lesioni primitive e l’eventuali metastasi sincrone o metacrone dei pazienti sottoposti allo screening. Quando possibile alcune lesioni saranno criopreservate. Il tessuto, incluso in paraffina, sarà comunque disponibile per l’analisi immunoistochimica delle lesioni. In particolare, avvalendosi della precedente esperienza di dati ottenuti nel melanoma umano in ampie casistiche di lesioni benigne e maligne, tale gruppo di ricerca contribuirà all’identificazione delle caratteristiche fenotipiche e molecolari delle lesioni neoplastiche e del loro microambiente tumorale. Impiegando un ampio pannello di anticorpi monoclonali verrà effettuata l’analisi del profilo antigenico delle lesioni (Antigeni del differenziamento melanocitico, di istocompatibilità “Cancer Testis Ag”) ed uno studio dei componenti molecolari e cellulari del microambiente tumorale inclusa, la caratterizzazione dell’infiltrato linfocitario e della matrice extracellulare.

Tutti i pazienti arruolati saranno tipizzati per fenotipo HLA di classe I e II. Il monitoraggio immunologico di cellule del sistema immunitario (linfociti, cellule NK, cellule NKT) e della risposta anticorpale nei sieri ottenuti dal sangue periferico, sarà ampiamente determinato mediante diverse metodiche. Il monitoraggio della risposta immunitaria e la sua cinetica prima, durante (a diversi tempi) e dopo il trattamento sarà effettuato mediante analisi fenotipica e funzionale di popolazioni effettrici della memoria immunologica eventualmente indotte dal trattamento combinato. Verranno impiegate metodologie che includono analisi citofluorimetriche con tetrameri e anticorpi specifici, metodiche di ELISPOT computer assistito. In parallelo le popolazioni linfocitarie verranno caratterizzate molecolarmente e funzionalmente nelle lesioni tumorali dopo isolamento mediante tecniche di microlaser capture assay. I dati del monitoraggio delle popolazioni periferiche ed intratumorali saranno correlate ai dati clinici.

Al fine di valutare il ruolo della senescenza di sottopopolazioni linfocitarie, l’attività telomerasica verrà valutata mediante TRAP Assay e testata in estratti cellulari totali e frazionati nucleari e citoplasmatici. La distribuzione intracellulare di hTERT verrà valutata mediante Western Blot e Immunoprecipitazione. L’espressione di hTERT mRNA verrà misurata mediante RT e Real Time PCR. La lunghezza dei telomeri verrà determinata mediante Flow-Fish. I linfociti marcati con anticorpi anti CD4 o CD8 saranno incubati con un probe telomerico PNA (C3TA2)₃ ed analizzati mediante FACScalibur. I livelli di SOCS1/3 saranno valutati mediante citofluorimetria e Western Blot.

Tutti i dati sugli studi molecolari e funzionali saranno correlati con il follow up clinico dei pazienti inclusi nello studio.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DELL'UNITÀ OPERATIVA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	790.000,00	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	365.000,00	335.000,00
3. Missioni	32.500,00	14.500,00
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):	10000,00	10.000,00
5. Materiale di consumo	250.000,00	180.000,00
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.	9.500,00	7.500,00
7. Elaborazione dati (specificare)	12.000,00	12.000,00
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)	1.000,00	1.000,00
TOTALE	1.470.000,00	560.000,00

Curriculum Vitae del Responsabile Scientifico dell’Unità Operativa

(PERIODO DI RIFERIMENTO: ULTIMI 5 ANNI; INDICARE ANCHE LE 10 PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE RITENUTE PIÙ SIGNIFICATIVE, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO A QUELLE DELL’AREA TEMATICA SCIENTIFICA SULLA QUALE INSISTE IL PROGETTO)

Name **PAOLA NISTICO'**
 Date and place of birth 30/07/1958 Catanzaro
 Position Senior Researcher
 Doctoral Degree Medical Doctor
 Date of Doctoral Degree 30/3/1983

EDUCATION AND TRAINING (INCLUDE DEGREES AND POST-DOCTORAL TRAINING)

YEARS	STUDY	INSTITUTION AND LOCATION	DEGREE	FIELD OF
1976-83	University of Rome “La Sapienza”		MD summa cum laude	Medicine
1981-83	Regina Elena Cancer Institute		Intern Student	Tumor Immunology
1983-86	Regina Elena Cancer Institute		Research Fellows	Tumor Immunology
1984	Memorial Sloan Kettering New York, Dept. of Pathology		Visiting Scientist	Tumor Immunopathology Pathology
1985-89	University of Parma		Postgrad. Degree	Tumor Immunology
1986-to date	Regina Elena Cancer Institute Immunology Laboratory		Senior Researcher	
1987	University of Torino Laboratory Cell Biology		Guest Researcher	Production of bispecific monoclonal antibodies
1995	University of Mainz Medizinische Klinik und Poliklinik Johannes Gutenberg		Guest Researcher	Tumor Immunology and ELISPOT assay
1999	Ludwig Cancer Institute at Memorial Sloan Kettering, New York		Guest Researcher	SEREX approach in breast cancer

RESEARCH AND PROFESSIONAL EXPERIENCE:

1981-83 Intern, Immunology Laboratory. Regina Elena Cancer Institute, Rome.
 1983 Guest Researcher, Immunology Lab., Regina Elena Cancer Institute, Rome
 1983-86 Research Fellowship , Immunology Lab., Regina Elena Cancer Institute, Rome.
 1983 Visiting Scientist, Department of Pathology, Memorial Sloan Kettering, New York, N.Y., USA
 1987-to date Senior Researcher, Dept. Of Experimental Research, Regina Elena Cancer Institute, Rome
 1995 Visiting Scientist, Medizinische Klinik und Poliklinik, Johannes Gutenberg- Univ., Mainz, Germany
 1999 Visiting Scientist, Ludwig Institute for Cancer Research at Memorial Sloan-Kettering, New York.

AWARDS:

1993 Awarded SIC, Italian Society of Cancer Research

EDITORIAL BOARD:

J. Immunotherapy

PROFESSIONAL SOCIETIES:

Network Italiano per la Bioterapia dei Tumori (NIBIT)
 Italian Society of Cancerology (SIC)
 Society of Immunology (SI)
 American Association for Cancer Research (AACR)
 Participant and contributor of the SEREX Program of the Ludwig Cancer Institute

PUBLICATIONS

1. Di Modugno F, DeMonte L, Balsamo M, Bronzi G, Nicotra MR, Alessio M, Jager E, Condeelis JS, Santoni A, Natali PG and Nisticò P. Cancer Research 67(6):2657-65, 2007.
2. Di Modugno F, Mottolese M, Di Benedetto a, Conidi A, Novelli F, Perracchio L, Venturo I, Botti Jager E, Santoni A, Natali PG, Nisticò P. Clin. Cancer Res., 12(5), 2006.
3. Di Modugno F, Bronzi G, Scanlan MJ, Del Bello D, Cascioli S, Venturo I, Botti C, Nicotra MR, Mottolese M, Natali PG, Santoni A, Jager E, Nisticò P. Int. J. Cancer, 109: 909-918, 2004.
4. Di Modugno F, Buglioni S, Mottolese M, Del Bello D, Cascioli S, Chersi A, Santoni A, Nisticò P. J. Immunother., 24: 221-231, 2001.

MODULO 3BIS: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUN GRUPPO DI RICERCA

GRUPPO DI RICERCA: 2.1 IRE-Nistico

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Paola Nistico**

struttura di appartenenza : Istituto Regina Elena, lab. immunologia funzione: dirigente i livello

indirizzo : via delle messi d'oro 156 – 00158 roma

n. tel: +39-06-52662539 fax: +39-06-52662600

indirizzo E-mail: nistico@ifo.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Marino Nonis**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

Il monitoraggio immunologico rappresenta uno dei maggiori strumenti, se adeguatamente eseguiti, nell'identificazione di:

- 1) risposta immunitaria indotta dal trattamento
- 2) definizione dei meccanismi molecolari e funzionali che possono essere associati ad una efficace risposta terapeutica.

Questa U.O. contribuirà allo studio monitorando sistematicamente i pazienti che saranno arruolati nel trial clinico. La frequenza e la specificità anti-tumore della risposta linfocitaria T, eventualmente ottenuta nei pazienti trattati, sarà sempre analizzata correlandola al fenotipo, al microambiente tumorale e alla risposta clinica ottenuta.

METODOLOGIA

I prelievi dei pazienti arruolati saranno inizialmente utilizzati per la definizione dell'aplotipo HLA. Tutti i pazienti arruolati saranno tipizzati per fenotipo HLA di classe I e II. Il monitoraggio immunologico di cellule del sistema immunitario (linfociti, cellule NK, cellule NKT) e della risposta anticorpale nei sieri ottenuti dal sangue periferico, sarà ampiamente determinato mediante diverse metodiche. Il monitoraggio della risposta immunitaria e la sua cinetica prima, durante (a diversi tempi) e dopo il trattamento sarà effettuato mediante analisi fenotipica e funzionale di popolazioni effettrici della memoria immunologica eventualmente indotte dal trattamento combinato. Verranno impiegate metodologie che includono analisi citofluorimetriche con tetrameri e anticorpi specifici, metodiche di ELISPOT computer assistito. In parallelo le popolazioni linfocitarie verranno caratterizzate molecularmente e funzionalmente nelle lesioni tumorali dopo isolamento mediante tecniche di microlaser capture assay. I dati del monitoraggio delle popolazioni periferiche ed intratumorali saranno correlate ai dati clinici.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente 2 Dirigenti medici, 3 Dirigenti biologi, 1 Tecnico di laboratorio _____ _____	240.000,00	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio 2 borsisti biologi, 2 tecnici di laboratorio _____ _____ _____	170.000,00	140.000,00
3. Missioni _____ _____ _____	15.000,00	12.000,00
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing): _____ _____ _____	10.000,00	10.000,00
5. Materiale di consumo _____ _____ _____	150.000,00	95.000,00
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc. _____ _____ _____	5.000,00	3.000,00
7. Elaborazione dati (specificare) _____ _____ _____	_____	_____
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) _____ _____ _____	_____	_____
TOTALE	€ 590.000,00	€ 260.000,00

MODULO 3BIS: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUN GRUPPO DI RICERCA

GRUPPO DI RICERCA: 2.2 IRE-Natali

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Piergiorgio Natali**

struttura di appartenenza : IST. REGINA ELENA, lab. Immunologia funzione: DIRIGENTE II LIVELLO

indirizzo : Via delle messi d'oro 156 – 00158 roma

N. tel: +39-06-52662583-2527 N. fax: +39-06-52662600

indirizzo E-mail: natali@ifo.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: Marino Nonis

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

Questo gruppo di ricerca, con una documentata esperienza di analisi fenotipica e molecolare del melanoma umano, contribuirà al progetto caratterizzando, in collaborazione con il Laboratorio di Anatomia Patologica del nostro Istituto, le lesioni primitive, ed eventualmente metastatiche dei pazienti che, sottoposti allo screening delle U.O. afferenti al progetto verranno arruolati nel trial clinico. Le caratteristiche fenotipiche del tumore e del suo microambiente potranno rappresentare un potenziale criterio di predittività di risposta alla terapia combinata.

METODOLOGIA

Lesioni asportate ai pazienti afferenti nella nostra Istituzione saranno, quando possibile, criopreservate. Il tessuto, incluso in paraffina, sarà comunque disponibile per l'analisi immunoistochimica delle lesioni. In particolare, avvalendosi della precedente esperienza di dati ottenuti nel melanoma umano in ampie casistiche di lesioni benigne e maligne, tale gruppo di ricerca contribuirà all'identificazione delle caratteristiche fenotipiche e molecolari delle lesioni neoplastiche e del loro microambiente tumorale. Impiegando un ampio pannello di anticorpi monoclonali verrà effettuata l'analisi del profilo antigenico delle lesioni. (Antigeni del differenziamento melanocitico, istocompatibilità “Cancer Testis AG”) verrà inoltre effettuato uno studio dei componenti molecolari e cellulari del microambiente tumorale inclusa la caratterizzazione dell'infiltrato linfocitario e della matrice extracellulare.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente 2 <i>Dirigenti Medici</i> , 1 <i>Dirigente biologo</i> , 1 <i>tecnico di laboratorio</i> _____ _____	200.000,00	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio 1 <i>borsista biologo</i> , 1 <i>tecnico di laboratorio</i> _____ _____ _____	95.000,00	95.000,00
3. Missioni _____ _____ _____	15.000,00	0
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing): _____ _____ _____	_____	_____
5. Materiale di consumo _____ _____ _____	50.000,00	35.000,00
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc. _____ _____ _____	_____	_____
7. Elaborazione dati (specificare) _____ _____ _____	_____	_____
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) _____ _____ _____	_____	_____
TOTALE	€ 360.000,00	€ 130.000,00

MODULO 3BIS: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUN GRUPPO DI RICERCA

GRUPPO DI RICERCA: 2.3 IRE-Ferraresi

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Virginia Ferraresi**

struttura di appartenenza : DIP. ONCOLOGIA MEDICA I – IST. REGINA ELENA

funzione: DIRIGENTE I LIVELLO

indirizzo : VIA ELIO CHIANESI 53 – 00144 ROMA

N. tel: +39-06-52666919 N. fax: +39-06-52665637

indirizzo E-mail: ferraresi@ifo.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Marino Nonis**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

Questo gruppo di ricerca afferente all’Oncologia Medica A dell’Istituto Regina Elena arruolerà pazienti affetti da melanoma (II, III e IV stadio) nel trial clinico di vaccinazione preceduto da trattamento con Dacarbazina. L’esperienza già maturata da questo team clinico nello svolgimento di uno studio di fase I che ha rappresentato il primo di chemioterapia somministrata prima della vaccinazione, permetterà oltre allo svolgimento del trial secondo GLP, un’adeguata collaborazione con le Unità del progetto che effettueranno il monitoraggio immunologico.

METODOLOGIA

I pazienti affetti da melanoma III, IV stadio, afferenti alla nostra Oncologia, verranno informati della possibilità di entrare nel trial di chemioterapia (Dacarbazina) inoculata prima della vaccinazione. Si prevede lo screening di circa 80 pazienti affetti da melanoma, i quali saranno sottoposti ad un primo prelievo ematico per valutare l’aplotipo HLA. Questa fase avviene in stretta collaborazione con il Laboratorio di Immunologia del Dipartimento di Oncologia Sperimentale. Prelievi ematici verranno ripetuti, prima del trattamento e a diversi tempi durante i cicli di chemioterapia somministrata prima della vaccinazione. I pazienti arruolati saranno monitorati per la tossicità, per ripresa della malattia e “overall survival”. I dati clinici, correlati di adeguata analisi statistica, saranno interfacciati con i dati del monitoraggio immunologico.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente 2 dirigenti medici I livello	80.000	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio 2 unità a contratto	50.000	50.000
3. Missioni		
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):		
5. Materiale di consumo	2.000	2.000
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.		
7. Elaborazione dati (specificare) Realizzazione di programmi specifici per gestire ed elaborare i dati	8.000	8.000
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)		
TOTALE	€ 140.000,00	€ 60.000,00

MODULO 3BIS: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUN GRUPPO DI RICERCA

GRUPPO DI RICERCA: 2.4 S. Gallicano-Catricala

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Caterina Catricalà**

struttura di appartenenza : ISTITUTO SAN GALLICANO IRCCS

funzione: Direttore dipartimento clinico-sperimentale dermatologia oncologica i.s.g.

indirizzo : Via Elio Chianesi , 53 00144 Roma

N. tel: +39-06-52665264 N. fax: +39-06-52665221

indirizzo E-mail: catricala@ifo.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Marino Nonis**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

La Struttura Complessa di Dermatologia Oncologica dell’Istituto San Gallicano ha diagnosticato 3102 casi di melanoma cutaneo, con un follow up mediano di 53 mesi. I dati relativi alla casistica sono archiviati in un software dedicato, che ha la funzione di database.

La casistica totale comprende: l’82,3% (2553 casi) di melanoma sporadico, il 10,4% (322 casi) di melanoma familiare e il 7,3% (227 casi) di melanoma primitivo multiplo. sulla casistica totale, inoltre, l’1,6% 50 casi sono melanomi primitivi multipli con familiarità.

METODOLOGIA

I dati attualmente presenti nel database mostrano il seguente staging: IA 57%, 1B 10%, IIA 5%, IIB 2%, IIC 2%, III 2%. Verranno selezionati tutti i casi incidenti o in evoluzione di malattia con stadio IIB, IIC, IIIA, IIIB. I casi verranno archiviati in apposito database con schede relative all’anamnesi personale e familiare del paziente, alle caratteristiche fenotipiche del soggetto, alle abitudini di vita, alle modalità di esposizione al sole, sia con schede relative alle caratteristiche macroscopiche e microscopiche del melanoma primitivo, allo staging, alla terapia chirurgica ed al follow up clinico-strumentale.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente <i>1 Dirigente Medico II livello</i> <i>2 Dirigenti Medici I Livello</i>	150.000	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	50.000	50.000

3. Missioni	_____	_____

4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):	_____	_____

5. Materiale di consumo	2.000	2.000

6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.	3.000	3.000

7. Elaborazione dati (specificare)	4.000	4.000

8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)	1.000	1.000

TOTALE	250.000	60.000

MODULO 3BIS: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUN GRUPPO DI RICERCA

GRUPPO DI RICERCA:

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Ornella Franzese**

struttura di appartenenza : Dipartimento di Neuroscienze, Cattedra di Farmacologia, Univ. Roma “Tor Vergata”

funzione: Funzionario Tecnico

indirizzo: Via Montpellier 1, 00133 Roma

N. tel:+39-06-7259-6322 / 6333 N. fax: +39-06-7259-6323

indirizzo E-mail: franzese@med.uniroma2.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Maria Grazia Marciani**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

Il programma consiste nel monitoraggio della senescenza molecolare delle sottopopolazioni CD4+ e CD8+ dei T linfociti ottenuti dai pazienti in studio. In rapporto all'età e alla terapia dei pazienti, verranno valutati i seguenti parametri: espressione di molecole costimolatorie e di marcatori di differenziamento, attività telomerasica, lunghezza dei telomeri, fosforilazione e traslocazione di hTERT, livelli di SOCS-1/SOCS- 3 molecole inibitorie dei segnali di traduzione delle citochine.

METODOLOGIA

Sottopopolazioni linfocitarie verranno isolate mediante biglie immuno-magnetiche anti-CD4 e CD8. L'attività telomerasica nei linfociti è regolata dalla fosforilazione della subunità hTERT e dal suo trasferimento dal citoplasma al nucleo. La senescenza linfocitaria appare legata ad una disregolazione del “pathway” di fosforilazione e traslocazione nucleare di hTERT. L'attività telomerasica verrà valutata mediante TRAP Assay e testata in estratti cellulari totali e frazionati nucleari e citoplasmatici. La distribuzione intracellulare di hTERT verrà valutata mediante Western Blot e Immunoprecipitazione. L'espressione di hTERT mRNA verrà misurata mediante RT e Real Time PCR. La lunghezza dei telomeri verrà determinata mediante Flow-Fish. I linfociti marcati con anticorpi anti CD4 o CD8 saranno incubati con un probe telomerico PNA (C3TA2)₃ ed analizzati mediante FACScalibur. I livelli di SOCS1/3 saranno valutati mediante citofluorimetria e Western Blot.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente <i>1 Dirigente Biologo: 20.000 Euro</i> <i>1 Dirigente Medico: 80.000 Euro</i> <i>1 Tecnico Biologo: 20.000 Euro</i>	120.000	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio _____ _____ _____	_____	_____
3. Missioni <i>Partecipazione a congresso/i argomento pertinente</i> _____ _____	2.500	2.500
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing): _____ _____ _____	_____	_____
5. Materiale di consumo <i>Biglie per separazione sottopopolazioni , terreni di coltura, anticorpi per WB e citofluorimetria, probe, kit real time PCR e TRAP Assay</i> _____ _____	46.000	46.000
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc. <i>Pubblicazioni</i> _____ _____	1.500	1.500
7. Elaborazione dati (specificare) _____ _____ _____	_____	_____
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) _____ _____	_____	_____
TOTALE	170.000	50.000

MODULO 3: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUNA UNITÀ OPERATIVA

UNITÀ OPERATIVA: UO3 – HSR

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Marco Bregni**

struttura di appartenenza : Istituto Scientifico Fondazione San Raffaele del Monte Tabor (HSR)

funzione: Direttore Programma

indirizzo : _Via Olgettina, 60

N. tel:_02-26432357 N. fax:_02-26437126

indirizzo E-mail: marco.bregni@hsr.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Renato Botti**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

L'immunoterapia adottiva è una strategia terapeutica utilizzata in passato con scarso successo, in gran parte a causa delle insufficienti conoscenze della biologia del sistema immunitario e delle diverse funzioni della cellula T. Si osservò tuttavia che l'infusione di elevate quantità di cellule attivate ex-vivo con IL-2 (LAK) insieme alla somministrazione di alte dosi di IL-2 era in grado di indurre regressioni tumorali in una piccola frazione di pazienti con melanoma metastatico, a spese di una considerevole tossicità (Rosenberg et al. 1987). In seguito gli stessi investigatori scoprirono che la stessa attività antitumorale poteva essere ottenuta mediante l'infusione di linfociti T infiltranti il melanoma (TIL) espansi ex-vivo in presenza di IL-2 (Rosenberg et al, 1988). Questa strategia recentemente è stata rivalutata grazie alle nuove conoscenze sugli antigeni tumorali, sulla immunobiologia delle cellule T, e sul ruolo prognostico dell'infiltrato tumorale in tumori quali il carcinoma dell'ovaio e del colon-retto (Zhang et al., 2003; Parmiani, 2005; Galon et al., 2006). Infatti studi recenti di immunoterapia adottiva, con TIL selezionati ed espansi ex-vivo e reinfusi dopo chemioterapia linfoablative, suggeriscono che risposte tumorali complete e parziali possono essere ottenute anche in lesioni viscerali e del sistema nervoso centrale in pazienti con melanoma in fase avanzata (Dudley et al, 2002). E' soprattutto rilevante il contributo della chemioterapia linfoablative, non mieloablative, 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. In una esperienza analoga di infusione di linfociti T espansi ex-vivo e reinfusi senza precedente chemioterapia linfoablative le risposte cliniche sono state decisamente minori, e limitate alle lesioni sottocutanee e non viscerali (Mackensen et al., 2006). Infatti i pazienti con melanoma ed altri tumori solidi presentano in circolo e nel microambiente tumorale diversi tipi di cellule immunosoppressive, le più rilevanti delle quali sono i linfociti T regolatori (Javira and Rosenberg, 2003; Viguiet et al., 2004) e le cellule mieloidi soppressorie (Valenti et al., 2006; Parmiani et al., 2006). Poiché queste cellule possono limitare in modo significativo l'efficacia delle manipolazioni immuni, è importante controllarne la presenza, la funzionalità e le modalità di eliminazione nei pazienti sottoposti a studi di immunoterapia adottiva.

METODOLOGIA

L’associazione di immunoterapia adottiva e di chemioterapia linfoablativa ha solide basi scientifiche e precliniche, e noi intendiamo verificarne la fattibilità e l’efficacia in uno studio clinico pilota in due tumori epiteliali (carcinoma dell’ovaio e carcinoma del colon-retto) resistenti alle terapie standard (chirurgia, chemioterapia) e senza alternative terapeutiche valide. Il nostro studio prevede il trattamento di pazienti affetti da ca ovarico e da ca coloretale con i linfociti citotossici circolanti (CTL) selezionati ed espansi *ex-vivo*. CTL tumore-specifici e/o antigene-specifici saranno isolati dal sangue periferico ed espansi *ex vivo* con opportune metodiche colturali (Turin et al, 2007). Raggiunto il numero sufficiente (ca. 10^{11} cellule) i linfociti saranno reinfusi *e.v.* nello stesso paziente dopo trattamento linfopenizzante con ciclofosfamide e fludarabina. In questi pazienti sarà effettuata una valutazione dei parametri immunologici e ematochimici per misurare l’entità e la qualità delle risposte antitumorali e la tossicità dei trattamenti. Il fatto e la funzione dei CTL reinfusi verranno valutati mediante *spectratyping*; l’analisi della frequenza dei CTL tumore-specifici e dei linfociti secernenti IFN-gamma verrà valutata a vari tempi dopo l’infusione. L’attività antitumorale dei CTL verrà valutata mediante i criteri RECIST e le risposte obiettive verranno confermate ad un minimo intervallo di 4 settimane. Obiettivi secondari saranno l’intervallo libero da malattia e la durata della sopravvivenza. Il numero dei pazienti da arruolare sarà stabilito in base a metodi predittivi della significatività delle risposte attese.

In parallelo verranno effettuati degli studi in modelli murini per valutare la capacità di diversi chemioterapici, caratterizzati da diversi meccanismi di azione, di potenziare l’attività antitumorale dell’immunoterapia. L’espressione genica indotta dai vari chemioterapici sarà valutata mediante microarray allo scopo di chiarire i meccanismi attraverso i quali la chemioterapia rende l’immunoterapia in grado di eradicare il tumore. Sarà inoltre valutato l’effetto della somministrazione dei chemioterapici sull’attivazione di cellule presentanti l’antigene, quali le cellule dendritiche, e l’effetto dei farmaci sul numero e sull’attività di linfociti T regolatori. Sarà valutata anche l’induzione dell’apoptosi delle cellule tumorali da parte di ciascun chemioterapico e la correlazione tra l’induzione dell’apoptosi e l’incremento dell’efficacia antitumorale della chemio-immunoterapia.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DELL'UNITÀ OPERATIVA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente __Dirigenti medici, biologi e tecnici (12 mesi/uomo)____ _____ _____	60.000,00	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio __Borsisti, post-doctoral fellows e tecnici_____ _____ _____	182.000,00	96.000,00
3. Missioni _____ _____ _____	70.000,00	12.000,00
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing): _____ _____ _____	_____	_____
5. Materiale di consumo __Validazione in GMP della procedura di espansione____ Costi di produzione in GMP dei CTL per uso clinico____ __ Materiale disposable, tetrameri, peptidi, anticorpi, radioattivo, kit ELISA, etc._____ _____	260.000,00	172.000,00
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc. _____ _____ _____	13.000,00	11.000,00
7. Elaborazione dati (specificare) __Preparazione IMPD per approvazione dell'ISS_____ _____ _____	8.000,00	4.000,00
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) __OVERHEAD_____ _____ _____	5.000,00	5.000,00
TOTALE	598.000,00	300.000,00

Curriculum Vitae del Responsabile Scientifico dell'Unità Operativa

(max 1 pagina)

(PERIODO DI RIFERIMENTO: ULTIMI 5 ANNI; INDICARE ANCHE LE 10 PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE RITENUTE PIÙ SIGNIFICATIVE, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO A QUELLE DELL'AREA TEMATICA SCIENTIFICA SULLA QUALE INSISTE IL PROGETTO)

Gli interessi scientifici del dottor Bregni sono sempre stati rivolti all'oncologia e alle terapie cellulari, con particolare riguardo al trasferimento in clinica delle ricerche di laboratorio. Negli anni trascorsi all'Istituto Nazionale Tumori di Milano ha lavorato sotto la guida del dottor Gianni Bonadonna e del professor Massimo Gianni all'impostazione di terapie innovative con autotrapianto di cellule ematopoietiche in pazienti con linfomi e tumori solidi. Nel periodo trascorso presso l'Istituto San Raffaele si è dedicato all'impostazione scientifica e alla sperimentazione clinica di programmi clinici originali nel carcinoma del rene, della mammella, e dell'ovaio. E' responsabile europeo del Solid Tumor Working Party del Gruppo Europeo Trapianto di Midollo Osseo (EBMT). Ha collaborato all'ideazione e alla implementazione di programmi multicentrici clinici e di laboratorio di terapia cellulare e di trapianto allogenico di cellule ematopoietiche nel carcinoma della mammella e dell'ovaio. E' coordinatore clinico dei programmi di immunoterapia del melanoma in corso presso l'Istituto San Raffaele. Negli anni 2000-2005 ha ricevuto più di 450.000 euro in finanziamenti alla ricerca.

DIECI PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE PIU' SIGNIFICATIVE NEGLI ULTIMI 5 ANNI:

1. Ciceri F, Bonini C, Marktel S, et al. Anti-tumor effects of HSV-TK engineered donor lymphocytes after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2007 Feb 27; [Epub ahead of print]
2. Clementi R, Chiochetti A, Cappellano G, et al. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood*. 2006, 108:3079-84.
3. Barkholt L, Bregni M, Remberger M, et al, French ITAC group and the EBMT Solid Tumour Working Party. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for metastatic renal carcinoma in Europe. *Ann Oncol*. 2006, 17:1134-40.
4. Bengala C, Zamagni C, Pedrazzoli P, et al; Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO) Group. Cardiac toxicity of trastuzumab in metastatic breast cancer patients previously treated with high-dose chemotherapy: a retrospective study. *Br J Cancer*. 2006, 94(7):1016-20.
5. Corradini P, Zallio F, Mariotti J, et al. Effect of age and previous autologous transplantation on nonrelapse mortality and survival in patients treated with reduced-intensity conditioning and allografting for advanced hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2005, 23:6690-8.
6. Clementi R, Locatelli F, Dupre L, et al. A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. *Blood*. 2005, 105:4424-8.
7. Pagano L, Pulsoni A, Vignetti M, et al; GIMEMA. Secondary acute myeloid leukaemia: results of conventional treatments. Experience of GIMEMA trials. *Ann Oncol*. 2005, 16:228-33.
8. Clementi R, Dagna L, Dianzani U, et al. Inherited perforin and Fas mutations in a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome and lymphoma. *N Engl J Med*. 2004, 351:1419-24.
9. Corradini P, Doderio A, Zallio F, et al. Graft-versus-lymphoma effect in relapsed peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphomas after reduced-intensity conditioning followed by allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J Clin Oncol*. 2004, 22:2172-6.
10. Bonini C, Grez M, Traversari C, et al. Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. *Nat Med*. 2003, 9:367-9.

MODULO 3BIS: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUN GRUPPO DI RICERCA

GRUPPO DI RICERCA: 3.1 HSR-Dip. Oncologia-Bregni

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Dr. Marco Bregni**

struttura di appartenenza : HSR funzione: Direttore Programma

indirizzo : Via Olgettina, 60

N. tel:02-26432357 N. fax: 02-26437126

indirizzo E-mail: marco.bregni@hsr.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Dr. Renato Botti**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

Questa Unità contribuirà al progetto con l'implementazione dello studio clinico di immunoterapia adottiva dopo chemioterapia linfoablativa in pazienti con carcinoma dell'ovaio e del colon-retto.

Gli steps che verranno implementati sono:

1. la validazione della procedura di isolamento, selezione, espansione e clonaggio dei CTL secondo gli standard GMP adatti per l'uso clinico;
2. approvazione del protocollo clinico da parte del Comitato Etico dell'HSR;
3. la preparazione del dossier IMPD (Investigational Medicinal Product Dossier) per la approvazione da parte dell'Istituto Superiore di Sanità;
4. selezione dei pazienti candidati;
5. prelievo di biopsia tumorale necessaria per la preparazione dei CTL;
6. leucaferesi da sangue periferico;
7. chemioterapia linfoablativa con ciclofosfamide e fludarabina;
8. reinfusione dei CTL espansi ex-vivo;
9. monitoraggio immunologico.

METODOLOGIA

Disegno dello studio, endpoints.

Lo studio clinico di Fase I-II prevederà l'arruolamento di 20 pazienti (10 con carcinoma dell'ovaio, 10 con carcinoma del colon-retto). Le caratteristiche cliniche dei pazienti candidati sono: età >18 e <70 anni, buone condizioni generali, possibilità di eseguire una biopsia di tessuto tumorale vitale, non compromissione della funzionalità epatica, renale e cardiaca, malattia misurabile, in recidiva e/o in progressione dopo chemioterapia di seconda linea. L'endpoint principale dello studio è la fattibilità della procedura di prelievo, espansione e reinfusione dei CTL antitumore in dosi adeguate; endpoints secondari sono la tossicità, in particolare gli effetti autoimmuni, l'efficacia della terapia linfoablativa nell'eliminare le cellule immunosoppressive, la permanenza in circolo dei CTL reinfusi, il tasso di risposte complete più parziali, la durata delle risposte, la sopravvivenza libera da progressione di malattia.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente 1 Dirigente Medico (coordinamento studio clinico, _____ _4 mesi/uomo)_____	20.000,00	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio _1 borsista (assistenza pazienti) _____ _1 post-doctoral fellow (2°-3° anno) _____ _____	62.000,00	32.000,00
3. Missioni _Congressi e meetings di oncologia e immunologia _____ _____	50.000,00	2.000,00
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing): _____ _____ _____	_____	_____
5. Materiale di consumo _Validazione in GMP della procedura di espansione_____ Costi di produzione in GMP dei CTL per uso clinico_____ _Materiale per monitoraggio immunologico _____	150.000,00	106.000,00
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc. _Organizzazione di riunioni periodiche _____ _____	3.000,00	1.000,00
7. Elaborazione dati (specificare) _Preparazione IMPD _____ _____	8.000,00	4.000,00
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) _OVERHEAD _____ _____	5.000,00	5.000,00
TOTALE	298.000,00	150.000,00

MODULO 3BIS: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUN GRUPPO DI RICERCA

GRUPPO DI RICERCA: 3.2 INT Milano - Rivoltini

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Licia Rivoltini**

struttura di appartenenza : FONDAZIONE IRCCS ISTITUTO NAZIONALE TUMORI __ funzione: dirigente medico

indirizzo : Via G. Venezian 1, 20133 Milano

tel:02.23903245 fax: __02.23902154

indirizzo E-mail: licia.rivoltini@istitutotumori.mi.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Stefano Zurrida**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

L'unità mette a disposizione le proprie competenze per fornire servizi ed organizzare attività mirate a: 1) standardizzare e validare le metodiche di monitoraggio immunologico nell'ambito delle bioterapie effettuate a livello nazionale; 2) promuovere il confronto costruttivo dei vari approcci utilizzati per tale monitoraggio, al fine di delineare specifiche linee guida; 3) mediante il coordinamento con le altre Unità del Progetto, favorire la formazione del personale dedicato agli studi immunologici di pazienti sottoposti a bioterapie.

METODOLOGIA

- Metodica di Elispot (identificazione dei linfociti T effettori presenti a livello del sangue periferico o nei linfonodi drenanti di pazienti).
- Utilizzo di tetrametri HLA (metodologia di monitoraggio). Con l'analisi citofluorimetrica, la colorazione con tetrametri identifica e di quantifica a livello del sangue periferico o nei linfonodi drenanti la frequenza di linfociti T CD8+ specifici per determinati antigeni tumorali. Colorazioni per citochine intracellulari o per molecole citotossiche per valutare anche lo stato funzionale dei linfociti identificati.
- Test di mobilitazione del CD107a (indicazione sulla capacità litica dei linfociti attivati in vivo dal trattamento).
- Tecniche di CBA, Luminex e Searchlight Array.
- Valutazioni fenotipiche e funzionali di cellule del sistema immunitario di tipo regolatorio-negativo (T reg e cellule mieloidi soppressorie).

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u> EURO	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u> EURO
1. Personale dipendente	20.000,00	NULLA
<i>_2 Dirigenti medici, 1 dirigenti biologo e 1 tecnico laboratorio</i> <i>_(4 mesi/uomo)_____</i>		
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	60.000,00	32.000,00
<i>____ 1 tecnico di laboratorio _____</i> _____		
3. Missioni	10.000,00	5.000,00

4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):	_____	_____

5. Materiale di consumo <i>Materiale disposable, tetrameri, peptidi, anticorpi,</i> <i>radioattivo, kit ELISA, etc.</i>	55.000,00	33.000,00

6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.	5.000,00	5.000,00

7. Elaborazione dati (specificare)	_____	_____

8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)	_____	_____

TOTALE	150.000,00	75.000,00

MODULO 3BIS: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUN GRUPPO DI RICERCA

UNITÀ OPERATIVA: 3.3 – IEO - Rescigno

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Maria Rescigno**

struttura di appartenenza : Istituto Europeo di Oncologia

funzione: Group Leader

indirizzo :Via Ripamonti, 435 - 20141 Milano

N. tel: 02/57489925 N. fax: 02/57489851

indirizzo E-mail: maria.rescigno@ifom-ieo-campus.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Dott. Carlo Ciani**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO

Il progetto in questione si articola in tre fasi:

- Caratterizzazione di un modello murino di tumore intestinale (villin-K-Ras^{V12G}). Questo include la valutazione della crescita, localizzazione e penetranza del tumore
- Analisi dell'effetto combinato di Chemio-Immunoterapia sulla crescita del tumore, basato sull'utilizzo di Salmonella coime agente antitumorale.
- Esame fenotipico e funzionale dell'infiltrato leucocitario

METODOLOGIA

L'espressione di K-Ras V12G nelle cellule epiteliali intestinali sotto controllo del promotore della proteina villin porta alla formazione spontanea di tumori nell'intestino tenue. Nella prima fase del progetto ci occuperemo di caratterizzare lo sviluppo di tumori nelle nostre colonie di topi. Infatti, diverse condizioni d'allevamento possono influenzare sia la crescita che il numero delle formazioni neoplastiche. Nella seconda fase valuteremo se la somministrazione orale di diversi ceppi attenuati di Salmonella ha un effetto sulla crescita del tumore. Nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato che la somministrazione intratumorale di Salmonella nel melanoma porta anche alla regressione completa della lesione. Successivamente saranno valutati gli effetti di chemioterapici più in uso nella terapia dei tumori intestinali. Infine, testeremo l'approccio combinato di chemio più immunoterapia e valuteremo gli effetti sia sulla crescita tumorale, che sulle popolazioni immunitarie reclutate.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u> EURO	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u> EURO
1. Personale dipendente	20.000,00	NULLA
<u>1 dirigente biologo</u> <u>(4 mesi/uomo)</u> _____		
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	60.000,00	32.000,00
<u>1 tecnico di laboratorio</u> _____		

3. Missioni	10.000,00	5.000,00

4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):	_____	_____

5. Materiale di consumo	55.000,00	33.000,00
<i>Materiale disposable, tetrameri, peptidi, anticorpi,</i> <i>radioattivo, kit ELISA, etc.</i>		

6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.	5.000,00	5.000,00

7. Elaborazione dati (specificare)	_____	_____

8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)	_____	_____

TOTALE	150.000,00	75.000,00