



Rapporti ISTISAN

10/1



PROGRAMMA STRAORDINARIO ONCOLOGIA 2006

Art. 3 "Rete nazionale solidale
e collaborazioni internazionali (ISS per ACC)"
Consuntivo dell'attività scientifica
(2008-2009)



ISSN 1123-3117

A cura di F. Moretti, A. Guderzo,
A. Ferrigno e F. Belardelli

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

PROGRAMMA STRAORDINARIO ONCOLOGIA 2006

**Art. 3 “Rete nazionale solidale
e collaborazioni internazionali (ISS per ACC)”
Consuntivo dell’attività scientifica
(2008-2009)**

A cura di
Franca Moretti, Angela Guderzo, Anna Ferrigno e Filippo Belardelli
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
10/1

Istituto Superiore di Sanità

Programma Straordinario Oncologia 2006. Art. 3 “Rete nazionale solidale e collaborazioni internazionali (ISS per ACC)”. Consuntivo dell’attività scientifica (2008-2009).

A cura di Franca Moretti, Angela Guderzo, Anna Ferrigno e Filippo Belardelli
2010, vi, 194 p. Rapporti ISTISAN 10/1

Con il DM 21 luglio 2006, il Ministero della Salute ha lanciato il “Programma Straordinario Oncologia 2006” e, tramite l’art. 3 (“Rete nazionale solidale e collaborazioni internazionali”), sono state tracciate le linee di un intervento globale per favorire una nuova strategia di collaborazione tra i membri di Alleanza contro in cancro (ACC) attraverso lo sviluppo di progetti coordinati per l’oncologia. L’art. 3 ha stabilito, infatti, l’assegnazione all’Istituto Superiore di Sanità (ISS) di 30 milioni di euro per attuare quattro programmi oncologici con finalità diverse ma complementari. Il programma ha permesso di promuovere nuove sinergie attraverso la condivisione delle migliori competenze, conoscenze e capacità in diversi campi dell’oncologia. Questo volume contiene il consuntivo dei primi due anni dell’attività scientifica relativa all’art. 3 del programma (presentate al convegno tenutosi a Roma il 21 gennaio 2010) sullo stato di avanzamento dei lavori e testimonia l’ampiezza delle iniziative a livello nazionale e internazionale e la qualità del livello scientifico dei progetti di ricerca avviati.

Parole chiave: Neoplasie; Ricerca biomedica; Programmi sanitari nazionali

Istituto Superiore di Sanità

2006 Extraordinary Oncology Programme. Art. 3 “National Support Network and International Cooperation (ISS for ACC)”. 2008-2009 Report on Scientific Activity.

Edited by Franca Moretti, Angela Guderzo, Anna Ferrigno and Filippo Belardelli
2010, vi, 194 p. Rapporti ISTISAN 10/1 (in Italian)

On July 21st, 2006, the Ministry of the Health issued a ministerial decree launching a national initiative called the “2006 Extraordinary Oncology Programme”. In particular, the article 3 of the decree (“National Support Network and International Cooperation”) established a national agenda to favour a new strategy of collaboration between the members of ACC. Moreover, the article 3 granted an allocation of 30 million euro to the Istituto Superiore di Sanità (ISS, the National Institute of Health in Italy) to implement four oncology programmes with various but complementary purposes. The initiative has allowed to promote new synergies through the sharing of best skills, knowledge and competence in various fields of oncology. This volume reports the main results of the scientific activities carried out during the first two years by each partner project (presented during a conference held in Rome on 21 January 2010) and testifies the quality of the scientific level and the scope of the initiatives at national and international level.

Key words: Neoplasms; Biomedical research; National Health Programs

Per informazioni su questo documento scrivere a: franca.moretti@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Moretti F, Guderzo A, Ferrigno A, Belardelli F (Ed.). *Programma Straordinario Oncologia 2006. Art. 3 “Rete nazionale solidale e collaborazioni internazionali (ISS per ACC)”. Consuntivo dell’attività scientifica (2008-2009)*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010. (Rapporti ISTISAN 10/1).

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

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

© Istituto Superiore di Sanità 2010

INDICE

Lista delle abbreviazioni	iii
Presentazione	v
Introduzione	1

PROGRAMMA 1

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

Qualità di vita e ICF in pazienti oncologici <i>Giuseppina Majani, Anna Giardini</i>	7
Metastasi ossee: miglioramento della qualità di vita e di assistenza <i>Stefano Liverani</i>	10
Modelli interdisciplinari d'intervento per la cura dei pazienti oncologici in età geriatrica <i>Umberto Tirelli</i>	12
Database clinico e biobanca per lo studio di pazienti oncologici anziani e delle patologie età-correlate <i>Fiorella Guadagni, Francesco Schittulli</i>	18
Approccio socio-assistenziale alle problematiche del paziente oncologico anziano <i>Stefano Vella</i>	22
Comunicazione e strutture informative in oncologia <i>Francesco De Lorenzo, Stefano Vella</i>	29
Basi scientifiche per la definizione di linee guida in oncologia <i>Rosella Silvestrini</i>	33
Portale di Alleanza Contro il Cancro <i>Paolo Roazzi, Claudio Di Benedetto</i>	38

PROGRAMMA 2

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

Rete nazionale biobanche per l'oncologia <i>Angelo Paradiso, Giovanni Migliaccio</i>	43
Rete nazionale per studi clinici e di strutture GMP per le bioterapie dei tumori <i>Giorgio Parmiani, Enrico Proietti</i>	48
Rete nazionale "Progetto START": stato dell'arte in oncologia <i>Lisa Licitra, Ruggero De Maria</i>	54
Rete nazionale dei registri tumori: indicatori e controllo del cancro in Italia <i>Riccardo Capocaccia, Marina Vercelli, Eugenio Paci, Piero Picci</i>	58
Rete nazionale su modelli sperimentali e "facilities" animali <i>Gennaro Citro, Stefano Fais</i>	62
Network nazionale italiano Tumori Eredo-Famigliari (InTEF) <i>Paolo Radice, Liliana Varesco, Franca Podo, Margherita Bignami</i>	70
Rete Nazionale di Bioinformatica Oncologica (RNBIO) <i>Paolo Romano, Marco Crescenzi</i>	75
Rete nazionale telepatologia (TESEO) <i>Antonino Carbone, Claudio Di Benedetto</i>	84
Rete nazionale per la cura e la ricerca dei sarcomi muscoloscheletrici <i>Piero Picci</i>	89

PROGRAMMA 3

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

Nuove molecole dell'infiammazione: trasferimento dal laboratorio al letto del paziente <i>Alberto Mantovani</i>	95
Base molecolare delle malattie mieloproliferative croniche e sviluppo di nuove terapie <i>Mario Cazzola</i>	104
Immunoterapia con il peptide EGFRvII nel Glioblastoma multiforme e in altri tumori solidi <i>Gaetano Finocchiaro</i>	111
Sviluppo vaccini idiotipici per studi di fase I-II di immunoterapia "subset specifica" per pazienti con disordini linfoproliferativi a cellule B <i>Riccardo Dolcetti</i>	115
Applicazione della chemioterapia alla rimodulazione della risposta immune antitumorale: studio dei meccanismi e "proof of concept" nell'uomo <i>Enrico Proietti</i>	123
Identificazione di marcatori per la predizione della risposta a nuovi farmaci antitumorali (inibitori di HDAC, tirosino chinasi e pompe ioniche) <i>Pier Giuseppe Pelicci</i>	128
Il microambiente tumorale come bersaglio terapeutico <i>Alessandro Gianni</i>	136
Sviluppo di nuovi farmaci capaci di alterare il microambiente tumorale e ripristinare la risposta immune anti-tumorale <i>Vincenzo Bronte</i>	142
Recettori per chemochine come marcatori biologici e molecolari di risposta clinica e target diagnostico terapeutico <i>Stefania Scala</i>	150
Sviluppo di nuove terapie nei sarcomi muscoloscheletrici: immunoterapia e target terapia a confronto <i>Piero Picci</i>	156
Terapie biologiche combinate e personalizzate nei tumori solidi: studi di fase I-II <i>Giorgio Parmiani</i>	161
Nuove molecole e peptidi quali farmaci regolatori del ciclo cellulare e della risposta a chemioterapici nei tumori epiteliali e cutanei <i>Gerry Melino</i>	166

PROGRAMMA 4

Promozione della collaborazione internazionale con particolare riferimento a quella europea

Programma 4 dell'art. 3 DM 21 luglio 2006: le basi razionali dell'intervento <i>Claudio Lombardo, Francesca d'Alessandro, Tania Rondanina, Nadia Nasso, Daniela Majerna, Maria Ferrantini, Franca Moretti, Maria Romero, Ugo Visconti, Filippo Belardelli</i>	175
Programma 4 del DM ISS per ACC: Relazione consuntiva 2009 <i>Claudio Lombardo, Filippo Belardelli</i>	181
Consuntivo delle attività congressuali, letture plenarie, attività propedeutica alla realizzazione di incontri scientifici, pubblicazioni <i>Claudio Lombardo, Filippo Belardelli</i>	191

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

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

PRESENTAZIONE

Si registra oggi un crescente impegno dei governi nazionali ad incoraggiare la costruzione di reti finalizzate all'ottimizzazione e al coordinamento delle risorse destinate alla ricerca biomedica e agli interventi di sanità pubblica. Questa tendenza è fortemente motivata dalla necessità, sempre più crescente in un contesto di risorse economiche limitate, di evitare inutili duplicazioni e favorire al massimo il sinergismo tra tutti i principali attori della ricerca stessa. In particolare, un'attenzione specifica è oggi concentrata sull'importanza di sviluppare reti finalizzate alla promozione della ricerca traslazionale, intesa come sviluppo di strategie idonee a tradurre i rapidi progressi delle conoscenze in applicazioni cliniche che soddisfino le aspettative dei pazienti e della società. La ricerca traslazionale in biomedicina mira infatti a trasferire le scoperte scientifiche dal laboratorio alla pratica clinica, trasformandole in nuovi strumenti preventivi, diagnostici e terapeutici e migliorando l'arsenale degli strumenti disponibili per la lotta contro le malattie. Il problema principale è costituito dai tempi lunghi, circa dieci anni, che il processo di trasferimento richiede, troppo lunghi per quei pazienti con patologie con brevi aspettative di vita, o con malattie per le quali non sono stati ancora individuati trattamenti efficaci.

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

I progetti finanziati hanno terminato il secondo anno di attività nell'ottobre 2009.

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

Il convegno *The development of networks for cancer research: a national need and a European challenge*, che si tiene a Roma presso l'ISS il 21 gennaio 2010, ha una duplice finalità:

- i) continuare una riflessione generale sull'importanza delle reti monotematiche degli IRCCS alla luce dell'evoluzione del panorama nazionale e internazionale della ricerca biomedica e della recente esperienza di ACC;
- ii) presentare e monitorare i progressi delle varie attività recentemente intraprese nell'ambito del secondo anno di finanziamento promosso con l'art. 3 del DM 21 luglio 2006 ("ISS per ACC"), con un'attenzione critica ai risultati raggiunti ed alle nuove sfide in ambito nazionale ed internazionale.

Il consuntivo scientifico del secondo anno di attività, le iniziative promosse e i risultati ottenuti raccolti nel presente volume mostrano una ricchezza di azioni miranti a promuovere la

cooperazione e l'interazione tra gli IRCCS e l'impatto delle iniziative di ACC a livello nazionale e internazionale. L'analisi dei risultati ottenuti evidenzia elementi di successo, ma anche alcuni aspetti critici relativi all'interazione tra le parti interessate e al controllo e valutazione delle attività svolte. Il successo di alcuni progetti ed iniziative è evidenziato non solo dal numero e dalla qualità delle pubblicazioni, ma anche dalla realizzazione di attività, siti web, servizi ed infrastrutture importanti per lo sviluppo della ricerca oncologica nazionale ed europea. Inoltre, grazie allo sviluppo di progetti di rete e al supporto dell'ISS sugli aspetti regolatori per la sperimentazione clinica sui nuovi farmaci, si registra già oggi un nuova capacità degli IRCCS di sviluppare protocolli clinici per trials di fase I disegnati sulla base di risultati e brevetti prodotti dagli enti stessi. Tutto ciò dimostra un processo di sviluppo della ricerca traslazionale degli IRCCS, evidenziando i benefici di una nuova strategia di cooperazione tra varie istituzioni e tra i vari attori della ricerca, nell'interesse ultimo dei pazienti e del Servizio Sanitario Nazionale. Occorre sottolineare che iniziative importanti anche in ambito europeo, quali la partecipazione italiana alla creazione delle nuove infrastrutture per la ricerca biomedica (EATRIS, ECRIN, BBMRI), programmi di training e coordinamento di progetti europei, si sono sviluppate grazie al programma "ISS per ACC", promuovendo un ruolo internazionale di ACC e aprendo nuovi scenari di crescente interesse per gli IRCCS e la ricerca oncologica nazionale in generale. È quindi necessario che le attività più rilevanti sviluppate in questi due anni trovino la possibilità di essere sostenute e sviluppate, permettendo un sempre maggior impatto sanitario e sociale della ricerca oncologica nazionale ed una sempre più qualificata ed autorevole partecipazione ed integrazione nelle nuove iniziative europee per la lotta contro il cancro.

Enrico Garaci

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

INTRODUZIONE

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

Il Programma 1, "Riduzione delle disparità nell'accesso dei pazienti ai mezzi diagnostici e alle terapie" – coordinato da L.G. Spagnoli (ACC), S. Vella (ISS) –, si prefigge di predisporre gli strumenti necessari per migliorare la qualità della vita dei pazienti mediante il coinvolgimento di competenze epidemiologiche, cliniche e assistenziali, attuare modelli organizzativi più adatti di quelli attuali alla gestione del paziente oncologico anziano e migliorare la comunicazione tra ricercatori, medici oncologi, pazienti e società in generale con riferimento particolare alle terapie sperimentali. I sette *Work Package* (WP) (alcuni dei quali hanno subito un'ulteriore articolazione) necessari a raggiungere gli obiettivi (generali e specifici) sono indicati nella Tabella 1.

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

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

Il Programma 2, "Integrazione delle attività di ricerca attraverso la costruzione di strutture e reti di collaborazione interistituzionali" – coordinato da M. Pierotti (INT) –, ha la finalità di

costituire reti nazionali ritenute prioritarie per lo sviluppo della ricerca e la promozione dell'innovazione.

Nell'ambito del Programma 2, sono state considerate prioritarie quelle reti nazionali funzionali a facilitare il lavoro degli Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) oncologici e a favorire la realizzazione e l'integrazione di reti regionali e interregionali nel contesto di una progettualità nazionale ispirata al disegno europeo e quindi in sinergia con il Programma 4, il cui obiettivo è quello di promuovere l'internazionalizzazione delle attività di ricerca di ACC. I progetti di rete selezionati per il finanziamento, insieme con l'indicazione dei coordinatori e dei referenti istituzionali corrispondenti sono elencati nella Tabella 2.

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

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

Il Programma 3, "Trasferimento delle conoscenze allo sviluppo di interventi volti a prevenire, diagnosticare e trattare il cancro (trial nazionali in terapie innovative e in prevenzione, e in terapie non d'interesse industriale in collaborazione con AIFA)" – coordinato da F. Belardelli (ISS) e P.G. Pelicci (IEO) –, si prefigge di promuovere lo sviluppo di terapie innovative in oncologia stimolando l'avvio di studi clinici di fase I che in Italia sono sensibilmente inferiori in numero rispetto ad altri Paesi avanzati. È quindi prioritario avviare un progetto nazionale (*task force*) che possa favorire la promozione del trasferimento alla clinica dei risultati della ricerca di base e pre-clinica (con particolare riferimento all'identificazione di marcatori biologici e molecolari di predizione della risposta alle nuove terapie) e lo sviluppo di sperimentazioni di terapie oncologiche innovative (studi di fase I e I-II su nuovi farmaci cellulari e molecolari e sulla combinazione con chemioterapia o radioterapia).

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

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

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

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

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

ricercatori che operano in istituzioni di ricerca estere, in particolare europee, quanto per l'industria.

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

Il Programma 4 è articolato nelle seguenti attività:

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

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

* I finanziamenti indicati sono stati approvati nel Consiglio Direttivo di ACC del 27 aprile 2007, come prima previsione dei costi per le attività al varo del Programma 4. Tale ripartizione è stata in seguito rivista al fine di consolidare le iniziative più promettenti e sostenere nuove ipotesi di lavoro e approvata dal Comitato Esecutivo di ACC il 19 dicembre 2008.

I progetti finanziati (si veda anche il sito di ACC: <http://www.alleanzacontroilcancro.it/>) hanno terminato il secondo anno di attività nel 2009.

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

PROGRAMMA 1

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

Coordinatori

Luigi G. Spagnoli, Stefano Vella

QUALITÀ DI VITA E ICF IN PAZIENTI ONCOLOGICI

Giuseppina Majani, Anna Giardini

Servizio di Psicologia, Fondazione S. Maugeri IRCCS, Istituto Scientifico di Montescano (PV)

Base di partenza e razionale

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del WP2 è descritta nella Tabella 1.

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

In considerazione della proroga al 31/12/2010 del Progetto in oggetto, si è concordato con le Unità Operative (UO) di prolungare la fase di reclutamento.

Nel corso del secondo anno di attività è proseguito quindi il reclutamento dei pazienti, per un totale di 344 nuovi casi, considerati validi a seguito di una verifica di qualità e completezza dei dati. Si tratta di pazienti oncologici in regime di ricovero (sia ordinario che day hospital) o ambulatoriale, o assistiti a domicilio, con quadri clinici di differenti livelli di gravità: da pazienti

sottoposte a trattamento chirurgico del carcinoma della mammella al momento libere da malattia, a pazienti ricoverati in cure palliative.

Inoltre, sono stati raccolti 57 protocolli validi per la valutazione del burnout, degli stili di coping e dello stato di salute percepito dell'operatore sanitario, grazie alla collaborazione di alcune UO. I dati sono stati inseriti in apposito database, e saranno oggetto di valutazione in merito al rapporto tra burnout e risorse individuali rilevate con i questionari COPE ed SF 12.

In generale non vengono segnalate gravi criticità metodologiche nella somministrazione dell'ICF, che sembra confermarsi come un'utile chiave di lettura della disabilità connessa a differenti gradi di patologia oncologica. Si conferma tuttavia la necessità di somministrazione da parte di un operatore appositamente addestrato, così da ridurre i rischi di ridotta concordanza interoperatore.

Si sono registrati rarissimi casi di rifiuto della valutazione da parte dei pazienti. Nella grande maggioranza dei casi, nonostante la lunghezza dell'intervista ICF, i pazienti hanno attivamente collaborato, verbalizzando apprezzamento per l'attenzione prestata ad ambiti di vita non sempre presi in considerazione da abituali procedure di *assessment* cliniche.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Liano D, Perotti P, Verri A, Ponzio M, Niutta L, Panzarasa A, Riggi E, Majani G, Prevedini A, Fornaroli P, Iannello G, Mariani S. Progetto della ricerca "Qualità di vita e ICF in pazienti oncologici: risultati preliminari dell'ASL di pavia". In: *Atti V Congresso Nazionale della SISMEC (Società Italiana di Statistica Medica ed Epidemiologia Clinica), Pavia, Italia, 16-19 settembre 2009*. p. 139.

METASTASI OSSEE: MIGLIORAMENTO DELLA QUALITÀ DI VITA E DI ASSISTENZA

Stefano Liverani

Direzione Sanitaria, IRCCS Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna

Base di partenza e razionale

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

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

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

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

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

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

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

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

Nel corso dell'anno 2009, sino a novembre, sono già stati trattati 134 casi.

È stato avviato il 30 settembre 2009 l'ambulatorio multidisciplinare specifico per la malattia metastatica ossea con cadenza quindicinale, prenotazione CUP e con attività alternata dei medici delle due Unità Operative (UO) coinvolte. Si stanno contattando strutture oncologiche e radioterapiche con cui stabilire le necessarie collaborazioni.

In questo ambito, è in corso la formalizzazione della rete oncologica ortopedica regionale, che verrà coinvolta nel trattamento delle metastasi ossee, secondo le indicazioni condivise.

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

Al momento attuale non sono state prodotte pubblicazioni scientifiche.

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

Umberto Tirelli

Dipartimento di Oncologia Medica, Centro di Riferimento Oncologico, Aviano

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

Obiettivi principali del programma includono:

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

Obiettivi secondari includono:

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del WP3 è descritta nella Tabella 1.

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

Proponente (Responsabile scientifico del WP)	Ente di appartenenza dell'Unità Operativa	Responsabile scientifico dell'Unità Operativa
CRO (Umberto Tirelli)	IOV	Silvio Monfardini
	CRO	Lucia Fratino
	CRO	Diana Crivellari

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

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

Per quanto riguarda le attività previste nei primi due anni di attività si sono raggiunti i seguenti risultati:

1. Attivazione di una Unità di Valutazione Geriatrica (UVG) e screening di tutti i pazienti eleggibili attraverso valutazione clinico funzionale secondo i parametri della Valutazione Geriatrica Multidisciplinare (VGM)

Si tratta di un team multidisciplinare, nel cui ambito le singole figure professionali interagiscono – ciascuno con la propria competenza – per delineare il profilo clinico funzionale della persona anziana. L'UVG è formata da un medico esperto in oncogeriatrica, un infermiere di ricerca e uno psicologo. L'UVG si riunisce presso l'ambulatorio dedicato di Oncologia Geriatrica.

La valutazione prevede: accogliimento del paziente e del/i *caregiver*; intestazione di cartella geriatrica; prelievi ematochimici per lo studio delle anemie, delle patologie croniche associate, delle riserve d'organo e per la creazione di una banca di materiale biologico; colloquio psicologico-clinico; valutazione infermieristica; valutazione clinico-strumentale cardiologica; somministrazione dei test; scale di performance.

Per quanto riguarda lo strumento di *assessment*, il *Comprehensive Geriatric Assessment* (CGA) viene considerato lo strumento *gold standard* per lo studio delle diversità nella popolazione anziana. Il principale limite della CGA è legato al tempo necessario per la sua somministrazione. La VES-13 (Saliba *et al.*, 2001) invece ha evidenziato un buon valore predittivo nella popolazione anziana generale, ma non è ancora stata confrontata rispetto al *gold standard* CGA nell'ambito della popolazione oncologica.

Nell'ambito del Progetto l'UO dell'Istituto Oncologico Veneto coordinato dal Prof S Monfardini si è occupata di valutare sensibilità, specificità, valore predittivo della VES-13, rispetto allo strumento CGA considerato *gold standard* nell'identificare i pazienti anziani oncologici vulnerabili o fragili.

Nel corso dei primi due anni di sviluppo del Progetto, sino al settembre 2009 sono stati arruolati 126 pazienti, l'età mediana era di 76 anni, le femmine in maggioranza (82%). Le sedi primitive di tumore più frequenti sono stati carcinoma della mammella (73%) e carcinomi gastro-intestinali (13%).

79 pazienti (60.2%) sono stati capaci di completare la VES-13 autonomamente, 11(8.7%) pazienti hanno chiesto aiuto per alcune domande mentre in 35 casi (27.8%) il questionario è stato compilato completamente dall'infermiera di ricerca.

Secondo la VGM, 53 pazienti (57%) sono risultati Fit, e 40 Vulnerabili/Fragili (43%). La sensibilità e specificità di rilevare Vulnerabilità/Fragilità in confronto con la VGM sono state rispettivamente il 62% e il 71%. Il valore predittivo positivo e negativo sono state per entrambe il 67% (Tabella 1).

Tabella 1. Risultati comparativi dell'analisi mediante VES-13 e CGA

VES-13	CGA			Total
	Fit	Vulnerable	Frail	
Favourable (Score ≥ 3)	46 (71%)	17 (55%)	6 (20%)	69 (55%)
Unfavourable (Score ≤ 3)	19 (29%)	14 (45%)	24 (80%)	57 (45%)
Total	65 (100%)	31 (100%)	30 (100%)	126 (100%)

Si è potuto, inoltre, notare che la VES-13 riduce in maniera significativa il tempo della valutazione geriatrica ma un terzo circa dei pazienti anziani ha avuto problemi significativi nel compilare il questionario, sembrerebbe inoltre sino ad ora che la VES-13 abbia la sensibilità e una specificità non del tutto soddisfacente.

2. *Arruolamento nuovi casi*

Dal febbraio 2007, data di attivazione dell'UVG, a ottobre 2009 sono stati valutati 315 pazienti anziani presso il CRO di Aviano e 126 presso l'UO dello IOV di Padova per un totale di 441 pazienti anziani affetti da tumore come indicato:

- a. Carcinoma mammella (183)
- b. NHL - MM (71)
- c. Carcinoma polmone (76)
- d. Carcinoma rene (28)
- e. Altre patologie (83)

3. *Attivazione di percorsi terapeutici*

Uno degli obiettivi del programma era avviare specifici programmi terapeutici modulato in base alla VGM al fine di promuovere l'inclusione dei pazienti anziani in protocolli sperimentali di ricerca clinica e facilitare l'accesso alle cure anche degli anziani fragili rappresentativi della popolazione anziana. Tali protocolli sono 7 diversificati per patologie come riassunto di seguito:

- a. Pianificazione terapeutica con CHOP/CEOP/CVP/CEO e Rituximab sulla base della valutazione della funzionalità (ADL-IADL)
- b. Esperienza di trapianto autologo in pazienti anziani affetti da linfoma non hodgkin, Linfoma di Hodgkin e Mieloma Multiplo in base a VGM.
- c. "Sorafenib in RCC elderly cancer patients (ECP): A mono - institutional experience". Studio di fase II di trattamento con sorafenib di pazienti anziani affetti da cancro del rene metastatico selezionati con valutazione geriatrica multidimensionale (VGM).
- d. "Multidimensional Geriatric Assessment (MGA) guided Front line Treatment of Elderly patients with stage III IV Non Small Cell Lung Cancer: Optimizing survival and tolerability with Pemetrexed monotherapy".
- e. "Indicatori funzionali e strumentali cardiologici predittivi di tossicità in pazienti anziani affetti da cancro in trattamento sistemico (ormonale, chemioterapico, farmaci biologici). Studio monoistituzionale".
- f. "Piper Fatigue Scale-r versione italiana: Studio di validazione di una scala della fatigue nella popolazione anziana affetta da cancro".
- g. "Chemotherapy Adjuvant Study for Women at Advanced Age (Protocollo CASA)" Coordinating Group: IBCSG.

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

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

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

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

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Crivellari D, Sun Z, Coates AS, *et al.* Letrozole compared with tamoxifen in elderly patients with endocrine-responsive early breast cancer: the Big 1-98 trial. *J Clin Oncol* 2008;26(12):1972-9.
2. Fratino L, Bearz A, Simonelli C, *et al.* Targeted agents in the treatment of elderly cancer patients (ECP) according to Comprehensive Geriatric Evaluation: a mono-institutional experience. *Ann Oncol* 2008;19(Suppl. 8):viii209.
3. Fratino L, Bearz A, Simonelli C, *et al.* Use of targeted agents in elderly cancer patients according to the CGA. 44th Annual Meeting, Chicago. *J Clin Oncol* 2008;26(15):20619.
4. Fratino L, Crivellari D, Giacalone A, *et al.* Comprehensive Geriatric Assessment (CGA) at the Centro di Riferimento Oncologico, Aviano - National Cancer Institute - in treatment planning for senior adults with cancer: preliminary results. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2009;72(1):S28.
5. Fratino L, Simonelli C, Bearz A, *et al.* Targeted agents (TA) in the treatment of elderly cancer patients (ECP) according to Comprehensive Geriatric Assessment (CGA): a mono-institutional experience. *Ann Oncol* 2008;19(Suppl. 9):ix121.
6. Fratino L, Simonelli C, Giacalone A, *et al.* Use of Sorafenib in elderly patients affected by metastatic renal cell carcinoma according to the use of CGA. 9th SIOG Meeting, Montreal. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2008;68(2):S46.
7. Giacalone A, *et al.* Assessing cancer-related fatigue: The psychometric properties of the Revised Piper Fatigue Scale in Italian cancer inpatients. *Support Care Cancer* 2009 Sep 26 (online prima della stampa). prima della stampa).
8. Giacalone A, *et al.* Can the caregiver replace his/her elderly cancer patient in the physician-patientline of communication? *Support Care Cancer* 2008;16(10):1157-62.
9. Giacalone A, *et al.* Cancer in the elderly: The caregivers' perception of senior patients' informational needs. *Arch Gerontol Geriatr* 2009;49(2):e121-5.
10. Giacalone A, Fratino L, Polesel J, *et al.* Depression risk in elderly cancer patients. 10th SIOG Meeting, Montreal. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2009;72(1):S55.

11. Giacalone A, Fratino L, Polesel J, et al. The family burden of elderly cancer patient. Preliminary results. 10th SIOG Meeting, Montreal. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2009;72(1):S54.
12. Simonelli C, Fratino L, Giacalone A, et al. Comprehensive geriatric assessment a screening tool for target-therapy treatment decision in elderly patients affected by metastatic renal cell cancer: a prospective study. *Ann Oncol* 2008;19(Suppl. 8):viii210.
13. Tirelli U, Balzarotti M, Uziel L, et al. Comprehensive geriatric assessment-adapted chemotherapy in elderly patients (> 70 years) with diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma (DLBCL). *Ann Oncol* 2008;19(Suppl. 4):iv148.

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

Fiorella Guadagni (a), Francesco Schittulli (b)

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

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

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del WP3 è descritta nella Tabella 1.

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

Proponente (Responsabile scientifico del WP)	Ente di appartenenza dell'Unità Operativa	Responsabile scientifico dell'Unità Operativa
LILT (Fiorella Guadagni)	ACISMOM	Luciano Caprino
	LILT	Fiorella Guadagni
	Università di Roma “Tor Vergata”	Mario Roselli

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Gli obiettivi previsti nel corso dei primi due anni di attività, prevedevano l'attivazione ed implementazione di una BioBanca Interistituzionale Multidisciplinare (BioBIM) presso l'IRCCS San Raffaele Pisana, il reclutamento della casistica e relativo campionamento biologico e l'avvio delle procedure analitiche atte ad identificare possibili biomarcatori di

processi biologici alla base delle intercorrelazioni tra sindrome metabolica/diabete/iperinsulinemia e neoplasie.

Al momento attuale sono presenti nella BioBIM dell'IRCCS San Raffaele Pisana campioni biologici di pazienti reclutati presso le strutture sanitarie e ambulatoriali dell'Associazione Italiana dei Cavalieri Italiani del Sovrano Militare Ordine di Malta (ACISMOM), l'UOSD di Oncologia Medica del Policlinico Universitario di Tor Vergata (PTV) e i reparti clinici dell'IRCCS San Raffaele Pisana – Roma. Sono stati criopreservati campioni biologici ottenuti da oltre 2000 casi, inclusi pazienti affetti da carcinoma della mammella, del tratto gastrointestinale, dell'apparato genito-urinario, del polmone, del pancreas e di altri istotipi a più bassa frequenza, nonché soggetti sani e pazienti affetti da sindrome metabolica. Di particolare interesse, 307 pazienti affetti da patologie oncologiche sono attualmente seguiti in follow-up.

Sono state intraprese indagini molecolari per lo studio di SNPs e varianti alleliche presenti nelle regioni promoter del gene codificante la citochina TNF- α (-376G/A, -308G/A and -238G/A). Al momento attuale, sono stati analizzati campioni di DNA di 40 pazienti affetti da cancro coloretale (CRC), 31 da diabete e 38 da ambedue le patologie. L'analisi nei tre gruppi ha rilevato, per quanto riguarda il polimorfismo -376 G/A, la presenza della variante G/G nell'80% (32/40), nel 100% (31/31) e nel 97,4% (37/38) dei pazienti con CRC, diabete e diabete e cancro rispettivamente; la variante G/A era presente nel 20% (8/40) e nel 2,6% (1/38) dei pazienti con CRC e diabete o cancro, rispettivamente, mentre risultava assente nei pazienti con diabete. La variante A/A non è stata riscontrata in nessun paziente. Per quanto riguarda il polimorfismo -308G/A, il genotipo G/G era presente nel 77,5% (31/40), nell'87,1% (27/31) e nell'81,6% (31/38) dei pazienti con CRC, diabete e diabete e cancro, rispettivamente; la variante G/A era presente, rispettivamente, nel 22,5% (9/40), nel 12,9% (4/31) e nel 15,8% (6/38), mentre la variante A/A è stata riscontrata solo su un paziente con diabete e cancro (2,6%). Relativamente al polimorfismo -238 G/A, la variante G/G era presente nel 77,5% (31/40), nel 96,8% (30/31) e nel 84,2% (32/38) dei pazienti con CRC, diabete e diabete e cancro, rispettivamente; il genotipo G/A è stato riscontrato, rispettivamente, nel 22,5% (9/40), nel 3,2% (1/31) e nel 15,8% (6/38), mentre la variante A/A non è stata riscontrata. I dati preliminari ottenuti appaiono promettenti e potrebbero costituire uno strumento per l'ottimizzazione dell'approccio clinico (migliore caratterizzazione biologica e scelta mirata dei trattamenti) ai pazienti affetti da CRC e sindrome metabolica. È attualmente in corso la determinazione delle tre varianti di sequenza su un più esteso campionamento, allo scopo di raggiungere una numerosità tale che permetta di applicare algoritmi statistici (equilibrio di Hardy-Weinberg, *linkage disequilibrium*) per valutare la significatività dei dati. L'ampliamento della casistica permetterà inoltre di verificare le possibili associazioni genotipo/fenotipo, al fine di verificare se la presenza di particolari varianti di sequenza/aplotipi possa essere associata ad un incremento dei livelli plasmatici di TNF- α . Tale associazione potrebbe essere di particolare importanza, dato che il TNF- α è coinvolto in tutte le fasi dell'iniziazione e progressione neoplastica. Inoltre, i livelli circolanti di questa citochina sono stati associati con lo stato di malattia dei pazienti con CRC e, recentemente, è stato dimostrato che la somministrazione del TNF- α è in grado di provocare delle modificazioni rapide e dose-dipendenti dei livelli sierici di leptina e adiponectina, due adipochine coinvolte nella sindrome metabolica e nel diabete.

A proseguimento delle indagini già avviate nel corso del primo anno, sono state valutate le possibili associazioni tra livelli sierici di TNF- α , adipochine e variabili clinicopatologiche di pazienti con CRC al momento della diagnosi di tumore primitivo. Poiché leptina e adiponectina sono inversamente correlate, abbiamo analizzato il valore prognostico del rapporto leptina/adiponectina (L/A ratio) nella predizione della sopravvivenza libera da malattia e/o globale in pazienti con CRC. I risultati ottenuti hanno dimostrato che livelli sierici di TNF- α ($p<0,001$) e leptina erano più elevati ($p<0,0001$), mentre quelli di adiponectina erano più bassi

($p < 0,0001$) nei pazienti CRC rispetto ai controlli, in correlazione inversa tra loro ($p < 0,005$). Una correlazione diretta era invece presente tra leptina e TNF- α ($p < 0,001$), e questo ultimo si è dimostrato essere una variabile predittiva di livelli elevati di leptina in analisi di regressione multipla. Pazienti con CRC avevano un L/A ratio otto volte maggiore rispetto ai controlli ($p < 0,0001$). L'analisi Kaplan-Meier dei tempi di sopravvivenza libera da malattia e/o globale ha dimostrato che il rapporto L/A ha un significato prognostico negativo in pazienti con CRC. Tali risultati hanno permesso, pertanto, di concludere l'esistenza di un'associazione tra produzione di TNF e adipochine in pazienti con CRC e che la misurazione combinata dei livelli sierici di leptina e adiponectina potrebbe fornire utili informazioni prognostiche nella gestione dei pazienti con CRC.

Infine, l'analisi delle varianti di sequenza su DNA germinale è stata integrata con studi di farmacogenetica su DNA tumorale estratto da campioni di tessuto di CRC, allo scopo di analizzare lo stato mutazionale del gene K-RAS, altamente predittivo dell'attività di due anticorpi monoclonali diretti contro l'EGFR (cetuximab e panitumumab). L'esclusione di tali farmaci in presenza di KRAS mutato sta diventando uno standard nella pratica clinica. Ad oggi sono stati analizzati campioni biologici appartenenti a 102 soggetti affetti da CRC metastatico. L'analisi delle varianti di sequenza rilevate nei codoni 12 e 13 del gene, effettuata mediante sequenziamento diretto dei siti di splicing fiancheggiati e degli esoni completi 1 e 2 del gene, è pari al 35%, in accordo con i risultati riportati in letteratura da altri gruppi di ricerca. In aggiunta, sono stati individuati alcuni casi di mutazioni in siti non hot-spot, doppie mutazioni e varianti di sequenza mai descritte precedentemente, come ad esempio il caso di una mutazione nel primo esone del gene K-ras, che determina un anomalo segnale di stop prematuro al codone 22 identificata in un paziente con CRC metastatico.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Di Girolamo F, Alessandroni J, Somma P, Guadagni F. Pre-analytical operating procedures for serum Low Molecular Weight protein profiling. *J Proteomics* 2009 Sep 18 (online prima della stampa). prima della stampa).
2. Di Girolamo F, Ponzi M, Crescenzi M, Alessandroni J, Guadagni F. A simple and effective method to analyze membrane proteins by SDS-PAGE and MALDI Mass Spectrometry. *Anticancer Res* 2009 (in corso di stampa).
3. Ferroni P, Roselli M, Spila A, D'Alessandro R, Portarena I, Mariotti S, Palmirotta R, Buonomo O, Petrella G, Guadagni F. Serum sE-selectin levels and carcinoembryonic antigen mRNA-expressing cells in peripheral blood as prognostic factors in colorectal cancer patients. *Cancer* 2009 (in corso di stampa).
4. Guadagni F, Roselli M, Martini F, Spila A, Riondino S, D'Alessandro R, Del Monte G, Formica V, Laudisi A, Portarena I, Palmirotta R, Ferroni P. Prognostic significance of serum adipokine levels in colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 2009;29:3321-7.
5. Guadagni F, Roselli M, Spila A, D'Alessandro R, Lucci I, Polce L, Formica V, Laudisi A, Portarena I, Palmirotta R, Ferroni P. Serum leptin levels in colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 2008;28(5C):3304.
6. Palmirotta R, Savonarola A, Formica V, Ludovici G, Del Monte G, Roselli M, Guadagni F. A novel K-ras mutation in colorectal cancer. A case report and literature review. *Anticancer Res* 2009;29:3369-74.

APPROCCIO SOCIO-ASSISTENZIALE ALLE PROBLEMATICHE DEL PAZIENTE ONCOLOGICO ANZIANO

Stefano Vella

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Base di partenza e razionale

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

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

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

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

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

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

In dettaglio gli obiettivi dello studio sono:

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

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

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

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

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

Il sottoprogetto intende raggiungere i seguenti obiettivi:

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

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

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

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del WP4 è descritta nella Tabella 1.

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

L'obiettivo principale del progetto passa attraverso la valutazione delle condizioni globali dell'anziano al fine di migliorare la programmazione degli interventi socio-assistenziali a lui destinati. Tale scopo viene raggiunto mediante una serie di interventi che mirano al monitoraggio dei bisogni espressi dal paziente con la successiva elaborazione di strategie idonee al raggiungimento di soddisfazione delle istanze raccolte. Il progetto è articolato in 5 sottoprogetti ognuno dei quali presenta un particolare punto di vista utile per osservare e valutare i bisogni del paziente oncologico anziano (vedi tabella 1)

Il sottoprogetto 1 si propone di sperimentare un programma di assistenza innovativo agli anziani oncologici che valuti globalmente i bisogni assistenziali del paziente e che sia in grado di dare una risposta ai suoi bisogni basandosi su una razionalizzazione delle risorse già esistenti. Questa ricerca viene condotta seguendo la medicina narrativa che consente di integrare l'approccio tradizionale del clinico (il processo evolutivo della malattia) con un approccio che mette al centro il paziente e il suo mondo vitale (il suo vissuto quotidiano, la sua idea di salute e malattia, le sue relazioni sociali). Lo scopo della ricerca è quello di valutare, mediante interviste semi-strutturate a pazienti ricoverati e dimessi dall'ospedale, la possibilità di integrare e implementare un programma di Valutazione Multidimensionale Geriatrica (VMG) con l'approccio tradizionale fatto di ricovero in UO di Medicina e follow-up del medico di medicina generale.

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

Lo studio prevede l'arruolamento di 100 pazienti con le seguenti caratteristiche:

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

Nel secondo anno di attività sono stati messi a punto i criteri di valutazione ed è stata elaborata la griglia da utilizzare per le interviste semi-strutturate.

L'attività finora svolta ha portato alla valutazione completa di 60 pazienti, mentre altri 40 sono in fasi diverse di valutazione.

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

Durante il secondo anno di attività sono stati valutati e messi in opera i seguenti aspetti inerenti la gestione organizzativa e assistenziale del paziente oncologico anziano:

- a. la presa in carico globale del paziente finalizzata alla comprensione delle patologie oncologiche (e non) e delle disabilità di tipo funzionale, psicologico e psico-sociale;
- b. la ricognizione dei bisogni che la disabilità genera nel paziente e l'identificazione degli operatori interessati al trattamento delle problematiche;
- c. la realizzazione della continuità assistenziale fra struttura ospedaliera di diverso livello e il territorio.

È stato inoltre istituito con il personale infermieristico, gli psicologi e i fisioterapisti un team di educazione per i familiari e i *caregiver* che seguono il malato.

Il sottoprogetto 3 intende elaborare un nuovo modello organizzativo per l'integrazione tra assistenza ospedaliera ed extra-ospedaliera. Questo studio ha portato alla preparazione di schede

per la raccolta di dati che rivelano i bisogni sanitari, socio-assistenziali, la condizione organica, lo stato cognitivo, nonché gli indici di *outcome* sia nel paziente anziano oncologico che nei *caregiver*. Una ultima fase propedeutica è stata l'analisi e la valutazione delle schede e dei test previsti per un corretto inserimento nel database informatico.

Data la scarsa presenza in letteratura di indicatori prognostici nel paziente geriatrico oncologico e al fine di determinare i fattori che maggiormente influenzano la prognosi del paziente neoplastico, il sottoprogetto 3 si è prefisso anche degli obiettivi supplementari, ovvero:

- a. studiare la validità della metodologia della Valutazione Multidimensionale Geriatrica (VMG) impiegando i domini dell'Indice Prognostico Multidimensionale (MPI);
- b. valutare la mortalità dei pazienti oncologici a 180 giorni dalla data di reclutamento e identificarne una possibile relazione con il peggioramento o con una maggiore severità del MPI;
- c. prendere in esame ulteriori scale di valutazione geriatrica non inserite nel MPI e ricercare la loro associazione con l'MPI stesso nell'identificare un maggior rischio di mortalità a 6 mesi;
- d. valutare l'eventuale associazione, indipendentemente dal MPI, tra tutte le variabili utilizzate e il rischio di mortalità.

L'analisi dell'indice prognostico di mortalità ha permesso di rilevare che:

- a. l'utilizzo della VMG, e in particolare del MPI, evidenzia un importante valore ai fini prognostici in pazienti anziani oncologici, nonostante l'MPI sembra sovrastimi il rischio di mortalità.
- b. è presente una maggiore mortalità nel campione analizzato rispetto agli studi di sviluppo e di validazione del MPI, a conferma della severità della patologia tumorale in ambito geriatrico.
- c. il peggioramento di tutte le scale di valutazione geriatrica analizzate, non inserite nel MPI, è significativamente associato ad un grado più severo del MPI.
- d. è stata rilevata una significativa associazione fra il peggioramento di tutte le variabili analizzate e un aumentato rischio di mortalità, ad eccezione del sesso, della scolarità, dell'altezza, del trattamento farmacologico, dello stato sociale.

Fino ad ottobre 2009 sono stati reclutati 158 pazienti e attualmente sono in corso le analisi statistiche al fine di pianificare, sulla base dei bisogni sanitari e assistenziali emersi, la seconda fase dello studio con intervento diretto sul territorio.

Nell'ambito delle attività del sottoprogetto 4 sono stati raggiunti i seguenti obiettivi:

1. *Costituzione di una Unità di Valutazione Geriatrica (UVG)*

Si tratta di un team multidisciplinare formato da un medico esperto in onco-geriatria, un infermiere di ricerca e uno psicologo che si riunisce una volta alla settimana per delineare il profilo clinico- funzionale della persona anziana.

Dal febbraio 2007, data di attivazione dell'UVG, a ottobre 2009 sono stati valutati 315 pazienti anziani con diverse patologie tumorali.

2. *Attivazione di percorsi terapeutici*

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

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

Sono stati attivati diversi programmi terapeutici e i dati preliminari finora ottenuti sono stati presentati a congressi nazionali e internazionali.

3. *Creazione di una scheda informatica per la raccolta e gestione dei dati*

Questa scheda viene utilizzata per la raccolta ed elaborazioni dati ottenuti nello svolgimento delle attività progettuali con la finalità di creare un data base per l'anziano oncologico.

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

Sono state allestite due bio banche per lo studio di *biomarker* associati a tumori nell'anziano. Attualmente le due sieroteche conservano materiale congelato di tutti i pazienti entrati in studio. Sono in corso le prime valutazioni sulla quota di pazienti trattati con farmaci biologici.

La finalità del sottoprogetto 5 è quella di misurare il grado di soddisfazione del paziente rispetto all'assistenza che ha ricevuto, attraverso un'attenta valutazione delle condizioni globali dell'anziano e di alcuni aspetti del funzionamento (*coping*) del familiare *caregiver* e della loro relazione (inclusa la gestione dell'informazione clinica), al fine di una migliore programmazione ed efficacia degli interventi socio-assistenziali a lui destinati.

Le 5 UO che fanno capo a questo sottoprogetto stanno raccogliendo informazioni riguardo il malato oncologico anziano utilizzando sia la scheda per VGM che misura lo stato di salute psico-fisico del paziente, che il questionario EUROFAMECARE per il *caregiver* familiare. Per la prima volta nello studio ci si è occupati anche del *caregiver* non professionale e sono stati raccolti i suoi bisogni/ difficoltà nella gestione del paziente di età uguale o superiore a 70 anni. Alla fine del reclutamento i dati saranno analizzati e riportati in modo da riuscire a definire i bisogni del paziente anziano oncologico e delle persone che hanno il compito di aiutarlo e assisterlo nelle varie fasi della malattia

In particolare gli obiettivi raggiunti sono i seguenti:

1. *Indagine sui livelli di informazione*

È stata condotta un'indagine sui livelli di informazione nella popolazione anziana attraverso un questionario autocompilato. Questa indagine comprende l'informazione ricevuta e desiderata, la soddisfazione, l'impatto della malattia, le aspettative rispetto al futuro, ecc.

Nella gestione del paziente anziano però, non potendo ignorare la situazione che la famiglia vive in relazione all'assistenza (problemi lavorativi, restrizioni della vita sociale, aggravio economico, aumento di stress soggettivo, ecc.) e in termini di gestione dell'informazione, un'intervista equivalente è stata predisposta per il *caregiver*.

Al momento attuale, sono stati compilate 120 interviste a pazienti anziani e 120 ai loro *caregiver*.

2. *Analisi qualitativa dei bisogni paziente/caregiver*

È stato preparato un questionario come strumento di analisi qualitativa dei bisogni del paziente e del *caregiver* (familiare, operatore assistenziale, volontario, badante).

Per l'analisi dei bisogni del paziente anziano e del *caregiver* sono stati coinvolti anche i punti informativi presenti nei principali centri di ricovero e cura italiani.

Dalla considerazione dell'importanza della tutela sociale dei diritti del *caregiver*, soprattutto se impersonato da un familiare, è stata analizzata la normativa vigente in merito al diritto di quanti per poter esplicare la loro funzione di cura sono costretti a sottrarsi dalla loro posizione lavorativa. L'analisi legale dei diritti esistenti ha consentito di poter informare in modo adeguato pazienti e familiari sulle tutele che sono riconosciute dallo stato.

3. *Studio sui bisogni socio-sanitari del paziente oncologico anziano*

Lo scopo di questo studio è:

- a. descrivere le caratteristiche della popolazione di pazienti anziani oncologici trattati in termini clinici, psicofisici, cognitivi e del supporto sociale di cui hanno necessità;
- b. stimare i bisogni dei *caregiver* di questa popolazione di anziani.
- c. capire lo stress psicofisico del *caregiver* e le richieste per l'assistenza al paziente oncologico anziano.

Fino a settembre 2009 sono stati arruolati 125 pazienti con età compresa fra 69 e 96 anni con differenti patologie tumorali e 50 *caregiver* non professionali.

Ogni paziente è stato sottoposto alla VGM per una valutazione complessiva delle sue condizioni. Le aree indagate sono state: stato demografico, socio-economico, psico-sociale, cognitivo, affettivo e funzionale, grado di disabilità, caratteristiche tumorali e terapia farmacologica in corso.

Al *caregiver* è stato chiesto di compilare il questionario EUROFAMCARE, volto ad indagare caratteristiche e conseguenze della relazione di assistenza. Nello specifico sono stati valutati i seguenti indicatori: modificazioni nell'organizzazione familiare e lavorativa quotidiana, incidenza economica, impatto sulla qualità di vita.

4. *Realizzazione di una rete di collegamento tra le associazioni di volontariato*

È stata sviluppata una rete di collegamento tra le associazioni, al fine di:

- a. individuare i reali bisogni di paziente e *caregiver*;
- b. fornire agli operatori e ai volontari strumenti efficaci per poter fornire risposte adeguate agli utenti.

Questa rete di collegamento tra le associazioni permette di rilevare in modo finalizzato e sistematico i bisogni dei pazienti anziani e di raccogliere e sistematizzare le modalità di intervento e di risposta ai bisogni da parte dei volontari delle associazioni.

La raccolta dei dati inerenti ai bisogni specifici dell'anziano e del suo *caregiver* ha fatto emergere la necessità di elaborare anche uno strumento cartaceo, "un libretto dedicato all'anziano" che possa essere utilizzato dal paziente e dal familiare. Il libretto suddetto attualmente in forma di bozza sarà revisionato e distribuito alle associazioni.

COMUNICAZIONE E STRUTTURE INFORMATIVE IN ONCOLOGIA

Francesco De Lorenzo (a), Stefano Vella (b)

(a) *Associazione Italiana Malati di Cancro, parenti e amici, Roma*

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

Base di partenza e razionale

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Fase 1- Azione preparatoria

Per uniformare e armonizzare le numerose proposte progettuali pervenute è stata necessaria un'azione preparatoria di 4 mesi, coordinata da Stefano Vella. Al fine di evitare la frammentazione di iniziative e sovrapposizioni di contenuto, estrapolando solo le componenti dei progetti in linea con gli obiettivi del programma, garantendone la stabilità economica e accorpare attività e obiettivi progettuali sovrapponibili, le proposte sono state uniformate e armonizzate valorizzando prodotti realizzati in progetti, già finanziati dal Ministero, accomunati

dall'obiettivo di costituire un modello di accoglienza, comunicazione e assistenza alle persone che affrontano patologie tumorali, con particolare attenzione agli aspetti psicologici.

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

Le proposte selezionate sono suddivise in 6 sottoprogetti principali:

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

Fase 2 - Gruppi di lavoro

I risultati ottenuti in questo anno di attività sono stati presentati al convegno "Parlare con i malati di cancro. Il Servizio Nazionale di Accoglienza e Informazione in oncologia" che si è svolto il 4 novembre 2009 presso l'ISS.

Durante questo convegno è stata presentata anche l'Oncoguida, il nuovo strumento informativo on line (www.oncoguida.it) a disposizione del pubblico e degli addetti ai lavori. Su questa guida è possibile trovare tutte le informazioni utili per sapere a chi rivolgersi per indagini diagnostiche, trattamenti terapeutici, sostegno psicologico, riabilitazione e assistenza.

Il lavoro svolto nel periodo ottobre 2008-ottobre 2009 si è concentrato sul proseguimento della attività previste dal progetto nell'ambito dei tre gruppi di lavoro.

- Gruppo di lavoro 1: Informazione

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

Attività svolta:

1. realizzazione, revisione, aggiornamento e distribuzione di materiale informativo, di libretti e dvd sia su supporto cartaceo che *on line*;
2. creazione di una banca dati/portale delle risorse informative di qualità in italiano ad uso di pazienti, familiari e cittadini. Il nome del sito è CIGNOweb <www.cignoweb.it>.

In particolare l'attività ha portato:

- a. censimento e valutazione di circa 500 documenti unici di materiale informativo per i pazienti – libretti, opuscoli, siti web, video – che sono in attesa di essere catalogati in modo definitivo e resi accessibili al pubblico tramite il database;
- b. inserimento *helplines* raccolti e supervisione interfaccia pubblica;
- c. inserimento di circa 50 associazioni e supervisione interfaccia pubblica;
- d. aggiustamento griglie per la valutazione di qualità dei documenti;

- e. studio accessibilità del database e predisposizione *checklist* di azioni da implementare per realizzare un database a norma.
- 3. Realizzazione del documento che definisce le “Procedure di Qualificazione di un Punto Informativo e Accoglienza”, una ‘linea guida’ necessaria per realizzare il “Servizio,” che fornisce indicazioni/raccomandazioni di implementazione organizzativo-gestionale e con le seguenti finalità:
 - a. fornire accoglienza al malato oncologico e alla famiglia con bisogni informativi, e costituire eventualmente un filtro al riconoscimento del bisogno di supporto psicologico ove non chiaramente espresso ma sotteso alla richiesta informativa;
 - b. fornire informazioni personalizzate, orientamento e *reference* in base alla richiesta per *empowerment* del paziente.

Il modello di Punto Informativo (PI) definito rappresenta il primo passo verso la costituzione della Rete dei PI del Servizio Nazionale, dove i PI operano con le stesse modalità e competenze ai bisogni informativi.

- 4. Definizione di un format “internet” per mettere a disposizione dei pazienti le informazioni relative alle sperimentazioni cliniche condotte dalle strutture sanitarie nazionali.
- 5. Realizzazione di una indagine conoscitiva sulle caratteristiche socio-demografiche e sul bisogno di informazioni della popolazione di donne immigrate nella regione Puglia. Tale indagine porterà alla stesura di un volume edito in sei lingue che rappresenterà uno strumento di informazione e orientamento per le donne immigrate sulla prevenzione, diagnosi e terapia dei tumori femminili.

- *Gruppo di lavoro 2: Formazione*

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

Attività svolta:

- 1. Realizzazione del Programma di Formazione degli operatori dei PI per prepararli alle attività previste, con contenuti e metodologie condivisi da esperti. È stato organizzato, quindi, il primo Corso di Formazione rivolto ai Volontari del Servizio Civile del Progetto “Informa Cancro” di AIMaC (Roma, presso il Centro Congressi “Raffaele Bastianelli” dell’IRCCS IRE, 11-13 dicembre 2008), con l’obiettivo di fornire conoscenze, competenze e indicazioni sulle norme comportamentali da tenere nello svolgimento della loro attività nell’ambito del Servizio Nazionale di Accoglienza e Informazione in Oncologia. Hanno partecipato giovani psicologi/documentalisti, assegnati ai PI degli IRCCS oncologici e ospedali/università di Roma/Napoli. I contenuti didattici sono raccolti e messi a disposizione del personale dei PI.
- 2. Sono stati organizzati 3 Corsi di Formazione per medici operanti in diverse strutture del SSN (Strutture Regione Marche – Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti di Ancona, Ospedale Civile di Senigallia, Ospedale Civile di Fermo, Ospedale Santa Maria della Misericordia di Urbino – Ospedale Mariano Santo di Cosenza e Fondazione Pascale di Napoli).
Ogni corso è stato articolato in una parte *on line*, con invio di materiale e articoli scientifici selezionati, e una parte teorico-esperienziale “sul campo”. Tali corsi di formazione si sono svolti secondo il seguente calendario:
 - a. Ospedale Mariano Santo di Cosenza: 24 novembre 2008, 9 dicembre 2008 e 9 gennaio 2009.
 - b. Strutture Regione Marche: 13 e 27 marzo 2009 e 9 aprile 2009.

- c. Fondazione Pascale di Napoli: 4, 11 e 18 giugno 2009.
 3. Realizzazione di un Master Universitario di 1° livello “La Comunicazione nelle Aziende Ospedaliere” costituito da brevi incontri per fornire i contenuti utili a delineare e costruire strumenti e azioni funzionali al processo di assistenza dei Servizi di appartenenza. La partecipazione è prevista per tutti gli operatori sanitari: medici, psicologi, fisioterapisti, *counselor* filosofici, infermieri e documentaristi.
- *Gruppo di lavoro 3: Organizzazione e messa in rete dei risultati*
- L'attività prevista consiste nell'individuazione e diffusione di un modello per la costituzione di PI sul territorio nazionale, nella definizione della loro operatività e interazione tra loro e con altre realtà attive nel campo.
- Attività svolta:
1. Individuazione/diffusione di un modello di Rete dei PI sul territorio nazionale soprattutto per quanto riguarda la definizione della loro operatività e attività (strategie comuni, direttive, linee guida, strumenti condivisi, ecc.).
 2. Elaborazione di strumenti per svolgere in modo coordinato le attività della Rete mettendo a frutto l'esperienza dei precedenti progetti, finanziati dal Ministero della Salute “SIRIO - Modello gestionale per l'informazione ai malati di cancro” e “Oncologia SICOP – Sistema Informativo per la Comunicazione Oncologica ai Pazienti”. Gli strumenti sono finalizzati alla rilevazione del bisogno informativo e del gradimento del Servizio espresso dall'Utenza: una scheda per raccogliere dati sugli utenti, sulla malattia - se pazienti -, sui bisogni informativi espressi, sulla risposta fornita; un questionario sul gradimento del Servizio offerto dal PI. Questa duplice rilevazione è indirizzata a monitorare l'attività dei PI, fornendo dati per un *tuning* costante del modello multidisciplinare offerto, teso a raffinare/individualizzare il supporto all'utente.
 3. Realizzazione di un database informatico di rilevazione dati, già testato e operante in alcuni degli IRCCS oncologici e in distribuzione a tutti i PI. Esso, raccogliendo dati in modo univoco per analisi statistiche, rappresenta lo strumento condiviso per la “messa in rete” dei PI.
- La prima analisi dei dati avviata su base multicentrica ha fornito risultati presentati al Convegno “Parlare con i malati di cancro. Il Servizio Nazionale di Accoglienza e Informazione in oncologia” che si è tenuto a Roma il 4 novembre 2009 presso l'ISS.

BASI SCIENTIFICHE PER LA DEFINIZIONE DI LINEE GUIDA IN ONCOLOGIA

Rosella Silvestrini
Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Milano

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

Articolazione del progetto

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

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

In linea con il Progetto supportato da ACC e in particolare con gli obiettivi previsti per il II anno di attività, è stata portata a termine la formulazione e pubblicazione dei testi sulle Basi Scientifiche Linee Guida (BSLG), relativamente ai Tumori Neuroendocrini del tratto Gastro-Entero-Pancreatico e ai Tumori del Colon-Retto e dell'Ano.

1. *Tumori Neuroendocrini*

Queste patologie, tradizionalmente considerate come rare, sono divenute oggi argomento di estremo interesse alla luce delle nuove scoperte nel settore. Gli avanzamenti nel campo della classificazione istologica, l'identificazione di criteri nosografici legati all'aggressività clinica, le nuove conoscenze di biologia molecolare e gli enormi sviluppi della strumentazione diagnostica, hanno reso la materia oggetto di grande interesse sia per la ricerca di base sia per gli studi clinici. In particolare, i tumori neuroendocrini del tratto gastro-entero-pancreatico (GEP) costituiscono la componente prevalente e rappresentano oggi una sfida importante per biologi, patologi, farmacologi, endocrinologi, oncologi, esperti di diagnostica strumentale e di terapia.

L'iniziativa è stata coordinata dal Dott. Emilio Bajetta, Dott. Emilio Bombardieri e prof.ssa Rosella Silvestrini. La formulazione e stesura del testo è stata realizzata da un Gruppo di Studio al quale hanno partecipato 14 membri con le massime esperienze complementari nella materia NET, in campo nazionale, e 15 collaboratori.

Il testo è stato successivamente sottoposto all'esame e validazione da parte di un Gruppo di Consenso, formato da 11 esperti scelti in rappresentanza delle più importanti Società Scientifiche e Strutture Oncologiche Nazionali.

Il volume, articolato in 15 capitoli dall'Epidemiologia e Fattori di rischio alla Diagnostica di laboratorio e strumentale fino alla Terapia e completato da un ultimo capitolo su Prospettive e Indirizzi futuri di ricerca, rappresenta un compendio di facile e interessante consultazione da parte degli specialisti oncologi e dei ricercatori che possono trovare spunti di riflessione a supporto della loro attività, ma anche da parte dei Medici di Medicina Generale e degli Operatori Sanitari.

Del volume, ultimato nel febbraio 2009, sono state pubblicate 2.000 copie distribuite ai più importanti Congressi Nazionali di Oncologia e specifici della materia e alle Scuole di Specialità di Oncologia e Medicina Nucleare dove sono stati utilizzati come testi di studio per gli specializzandi.

2. *Tumori del Colon-Retto e dell'Ano*

Nonostante l'incidenza assai elevata, almeno 40.000 nuovi casi all'anno nel nostro Paese, il Carcinoma del Colon-Retto continua a configurarsi come una sorta di "killer silenzioso" in qualche modo oscurato presso la Comunità Medica da altre Neoplasie per varie ragioni più appariscenti.

Anche le recenti iniziative di Educazione Sanitaria mediatica condotte sui tumori intestinali nel marzo 2009 hanno confermato come il livello di consapevolezza su questa malattia sia ancora in larga parte insoddisfacente. Ciò appare inaccettabile considerati i crescenti successi in tema di Prevenzione, Diagnosi precoce e Terapia che stanno determinando un evidente riduzione della mortalità per questa neoplasia, pari o addirittura superiore a quanto si osserva per i tumori della Mammella.

Per la sua importante incidenza, nell'ambito dell'iniziativa delle Basi Scientifiche per la definizione di Linee Guida in ambito clinico per le diverse patologie oncologiche, i tumori del Colon-Retto erano già stati presi in considerazione assieme alle altre 4 Patologie killer, Mammella, Polmone, Prostata e Utero-Ovaio, nel 1996 sotto l'egida del Consiglio Nazionale delle Ricerche a latere dei Progetti Finalizzati di Oncologia.

L'interesse suscitato aveva portato ad aggiornare il testo in un volume monotematico già nel 2004.

Attualmente, considerato da un lato il numero di accessi e di visitatori al Sito ad hoc, in particolare per questa patologia, e l'importanza delle conoscenze acquisite negli ultimi anni si è avvertita la necessità di aggiornare il testo questa volta sotto la sponsorizzazione di Alleanza Contro il Cancro.

L'iniziativa è stata coordinata da il Dott. Roberto Labianca, il prof. Giordano Beretta e dalla prof.ssa Rosella Silvestrini.

La formulazione e stesura del testo è stata realizzata da un Gruppo di Studio al quale hanno partecipato 15 membri con le massime esperienze complementari nell'area dei Tumori Colon-Retto e Ano, in campo nazionale, oltre a numerosi collaboratori.

Il testo è stato successivamente sottoposto all'esame e validazione da parte di un Gruppo di Consenso, formato da 12 esperti scelti in rappresentanza delle più importanti Strutture Oncologiche Nazionali.

Il volume, articolato in 10 capitoli dall'Epidemiologia, Diagnostica alla Terapia, fino al Ruolo del Medico di Medicina Generale, rappresenta una rivisitazione aggiornata della Letteratura con l'interpretazione degli Esperti coinvolti.

Del volume, ultimato nel maggio 2009, sono state pubblicate 2.000 copie distribuite ai più importanti Congressi Nazionali di Oncologia e di Gastroenterologia e alle Scuole di Specialità di Oncologia e Medicina Nucleare dove sono stati utilizzati come testi di studio per gli specializzandi.

Opportuno sottolineare che lo scopo di questi i volumi, come di quelli già prodotti per le altre patologie oncologiche, non vuole essere quello di vere e proprie Linee Guida o raccomandazioni, quanto la presentazione di elementi conoscitivi per l'analisi, talvolta anche in chiave critica, delle attuali evidenze scientifiche e di materiale propedeutico alla costruzione delle vere e proprie Linee Guide di Applicazione Clinica.

Si tratta di opere monografiche consultabili da parte degli specialisti, che sono maggiormente coinvolti nella gestione dei problemi clinici di questa patologia, ma facilmente consultabili anche da parte dei Medici Generali e degli Operatori Sanitari.

La lettura delle opere consente inoltre di individuare le aree del sapere che sono ancora in divenire e quelle dove è auspicabile vengano condotti, al più presto, nuovi studi e ricerche. Per questo, i testi possono essere utile anche ai ricercatori di base, che potranno trovare spunti di riflessione e suggerimenti per il loro lavoro.

La formulazione e pubblicazione di questi testi sono rese possibili anche grazie all'indispensabile supporto scientifico, organizzativo ed editoriale delle Dott.sse Francesca Mazzetti e Paola Persici e della signora Luciana Rainaldi.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. *Basi scientifiche per la definizione di linee-guida in ambito clinico per i tumori dell'età pediatrica*. Roma: Alleanza contro il Cancro, Istituto Superiore di Sanità; 2008. http://www.iss.it/binary/lgac/cont/TESTO_PEDIATRIA_FINALE.pdf; ultima consultazione 30/12/09.
2. *Basi scientifiche per la definizione di linee-guida in ambito clinico per il carcinoma renale*. Roma: Alleanza contro il Cancro, Istituto Superiore di Sanità; 2008. http://www.iss.it/binary/lgac/cont/2008_Carcinoma_Renale.pdf; ultima consultazione 30/12/09.
3. *Basi scientifiche per la definizione di linee guida in ambito clinico per i tumori neuroendocrini del tratto Gastro-Entero-Pancreatico (GEP)*. Roma: Alleanza contro il Cancro, Istituto Superiore di Sanità; 2009. http://www.iss.it/binary/lgac/cont/2009_Tumori_Neuroendocrini.pdf; ultima consultazione 30/12/09.
4. *Basi scientifiche per la definizione di linee guida in ambito clinico per i tumori del colon-retto e dell'ano*. Roma: Alleanza contro il Cancro, Istituto Superiore di Sanità; 2009. Disponibile all'indirizzo: http://www.iss.it/binary/lgac/cont/2009_Colon_Retto_ed_Ano.pdf; ultima consultazione 30/12/09.

PORTALE DI ALLEANZA CONTRO IL CANCRO

Paolo Roazzi, Claudio Di Benedetto

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

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Il lavoro svolto nel WP7 in questa fase di attività è stato principalmente dedicato allo sviluppo di progetti comunicativi specifici (quindi modellazione e personalizzazione). In quest'ottica sono stati allestiti quattro progetti comunicativi per altrettanti Programmi:

1. Rete nazionale dei Modelli preclinici in oncologia - <http://www.iss.it/onet/?lang=1>
2. Rete nazionale biobanche per l'oncologia - <http://www.iss.it/ribo/?lang=1>
3. Network nazionale italiano Tumori Eredo-Famigliari - <http://www.iss.it/itef/?lang=1> e
4. Basi Scientifiche per Linee Guida in ambito clinico per le diverse patologie oncologiche <http://www.iss.it/lgac/>.

In merito a quest'ultimo, l'attività è consistita oltre che nel normale iter menzionato, anche nell'affiancamento e nella formazione per la migrazione da una precedente piattaforma, un diverso dominio, un diverso coordinato d'immagine e una diverso modello comunicativo, sulla piattaforma condivisa per i Progetti di ACC. Per queste esigenze abbiamo messo a disposizione dei progetti che ne facciano richiesta un coordinamento editoriale qualificato e con esperienza specifica. Inoltre, su richiesta del responsabile scientifico abbiamo collaborato con un fornitore per rendere disponibili statistiche di accesso al progetto in un formato diverso da quello normalmente reso disponibile per tutti gli altri; quanto sopra ad integrazione e non in sostituzione del sistema standard ha richiesto un intervento sistemistico non indifferente.

Va sottolineata, infine, la continua attività di manutenzione di aggiornamento dell'infrastruttura informatica e comunicativa, in parte per recepire critiche e suggerimenti e in parte motu proprio per garantire un prodotto di alto livello qualitativo.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Roazzi P, Deodati S, Faralli C, Guderzo S, Morassi E, Ferrari M. Progettazione e realizzazione del portale Alleanza Contro il Cancro. *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* 2009;22(7/8):3-5.

PROGRAMMA 2

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

Coordinatore
Marco Pierotti

RETE NAZIONALE BIOBANCHE PER L'ONCOLOGIA

Angelo Paradiso (a), Giovanni Migliaccio (b)

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

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

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

A tale scopo risulta necessario:

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

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

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

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

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Il lavoro svolto nel secondo anno di attività può essere riassunto come segue:

1. Attivazione del sito web (ISS Roma)

Allo scopo di organizzare la comunicazione sia interna al progetto di rete nazionale di biobanche oncologiche, sia esterna con i membri del pubblico e le organizzazioni interessate ai campioni biologici a scopi di ricerca è in corso di approntamento un sito WEB <http://www.iss.it/ribo/>. Documenti descrittivi sono disponibili sul sito ACC <http://www.iss.it/acces/cont.php?id=111&lang=1&tipo=57>

2. Attivazione del database centralizzato

– Minimum Data Set (IT Bari)

Si è proceduto all'individuazione dei dati essenziali con cui identificare i campioni biologici al fine di valorizzarli maggiormente e conferire agli stessi caratteristiche peculiari, permettendo, così, al ricercatore maggiori opzioni selettive, in relazione al tipo di studio ipotizzato. Il gruppo di lavoro per la realizzazione del sito web del RIBBO, i cui componenti furono individuati in seguito all'incontro di Bari il 5/6/2008 e costituito da: Fabio Ciceri (Ist. San Raffaele Milano), M.Assunta Fonsi (Ist Regina Elena Roma), Giuseppe Pelagio (Ist Tumori Bari), Agostino Steffan (CRO Aviano), Barbara Parodi (IST Genova), nella riunione operativa tenutasi presso l'ISS di Roma in data 16.12.2008, alla quale hanno partecipato: Giovanni Migliaccio, Giuseppe Pelagio, Maria Assunta Fonsi, Silvano Rossini (in sostituzione di Fabio Ciceri), Barbara Parodi, Valentina Tirelli, Paolo Roazzi, Cintia Carella, sono stati definiti:

- la strutturazione del sito web del RIBBO, prevedendo due sezioni distinte: una generale descrittiva con accesso libero e una riservata ai membri, accessibile previo inserimento delle credenziali, contenente documenti e quant'altro concernente le attività delle Unità Operative (UO).
- i criteri per la costruzione del database nel quale far confluire i dati sui campioni disponibili nei centri RIBBO per la condivisione da parte di utenti esterni;
- la tipologia dei dati associati ai campioni biologici nel database. Si è preso atto del lavoro sull'argomento già svolto nell'ambito del progetto NICaB, nel quale veniva individuato un "Minimum Data Set" (MDS) simile a quelli utilizzati in altri database internazionali (Tubafrost, NCI, Confederation of Cancer Biobanks). Nell'incontro è stato deciso di integrare a questi i dati del modello OCSE.

Successivamente, il team ha prodotto un modello di MDS che è stato sottoposto ai membri RIBBO che hanno prodotto commenti e/o suggerimenti che hanno condotto alla stesura di una versione finale dello stesso, pubblicato nell'area riservata del sito web. Attualmente è in corso una fase di prova di caricamento di dati nel database al fine di verificarne la funzionalità e rilevarne eventuali anomalie.

– Software (ISS Roma)

Oltre al sito dedicato alla comunicazione si è provveduto a mettere in opera il database centrale dei campioni al sito <http://www.iss.it/Site/Ribbo/Default.aspx?ReturnUrl=%2fsite%2fribbo%2fsearch.aspx>

Questo sito insieme al software necessario per gestire il database è stato preparato dall'UO2. Il dataset minimo dei dati da far confluire nel database centralizzato è stato identificato in collaborazione con i membri del RIBBO. Scopo del sito e del database

centralizzato è permetter la rapida identificazione dei campioni biologici disponibili, per tipo, patologia e biobanca originaria.

3. *Preparazione della partecipazione della rete al BBMRI*

Tutte le attività del Network si sono svolte sotto la supervisione del Coordinamento, in costante contatto con le UO, che ha fornito direttive e modalità di partecipazione ai lavori, accogliendo i numerosi suggerimenti e proponendo congrue soluzioni. Tutte le UO hanno intrapreso iniziative volte al miglioramento delle proprie procedure, introducendo strumenti utili al miglioramento degli standard qualitativi dei campioni e dei dati conservati presso le proprie biobanche.

In relazione alla partecipazione alla rete europea BBMRI, il coordinamento ha costantemente aggiornato le UO sugli sviluppi della fase preparatoria, che ha condotto alla candidatura del RIBBO per la partecipazione al progetto prototipale del BBMRI, in qualità di rete di biobanche oncologiche. Alle UO è stato richiesto, come indicato dal coordinamento europeo, di adeguare le proprie modalità operative a quelle di riferimento internazionale (OECD, Tubafrost, IARC) al fine di armonizzare le stesse per una migliore interazione trans-nazionale. Il coordinamento ha curato l'invio, da parte dei singoli centri, dei questionari BBMRI che ha permesso a quest'ultimi di prendere atto delle risorse disponibili nell'ambito di RIBBO, determinandone la candidatura al *prototype project*. Il coordinamento ha inoltre sottolineato la necessità di adeguarsi ai requisiti stringenti per la partecipazione al prototipo BBMRI ed ha affiancato le singole UO focalizzando sugli obiettivi richiesti da BBMRI:

- a. produzione di procedure e modulistica per il trasferimento di campioni e dati all'estero (MTA) in accordo con le normative etiche e legali
- b. produzione di procedure per collaborazioni scientifiche che rispettino i parametri richiesti da accademia e industria
- c. l'applicazione delle linee guida OECD e WHO/IARC per i Centri di Risorse Biologiche
- d. coordinamento delle attività con altri consorzi e con il responsabile del rispettivo workpackage (WP3)
- e. la creazione di un portale comune accessibile dal sito web BBMRI
- f. l'adozione di procedure adeguate per l'integrazione nel concetto operativo di BBMRI
- g. il trasferimento di tutta la documentazione prodotta al Consorzio del Prototype Project per la costruzione di BBMRI

In seguito agli accordi con le altre reti di biobanche a scopo di ricerca, l'ISS si è fatto carico di partecipare e rappresentare RIBBO e le altre reti presso il progetto di infrastruttura europea di ricerca BBMRI. Come risultato di tale attività RIBBO è entrato a far parte delle strutture che partecipano ad un progetto presentato per VII Programma Quadro denominato I3.

4. *Consuntivo attività UO*

La notevole mole di lavoro svolto dalle singole UO è efficacemente condensata nella Tabella 2 che dimostra l'utilizzo di una serie di strumenti di qualità adottati durante il corso del seguente anno di attività.

Tabella 2 Strumenti di qualità adottati dalle Unità Operative al 2009

Ente	Consenso	Procedure scambio*	CQ	Sistema informatico	Certificazione
CRO	sì	sì MTA	sì	Matrix + EasyTrack	in corso
IRE	sì	sì MTA	sì	sì	sì
ISTGe	sì	sì MTA	sì	Freezerworks	sì
Pascale	sì	sì MTA	sì	sì, Homebrew	in corso
INT	sì	sì MTA	sì	sì	in corso
IOR	sì	sì MTA	sì	sì	sì
Besta	sì	sì MTA	sì	Gestione SOL	in corso
Multimedica	sì	sì MTA	sì	sì	sì
ITB	sì	sì MTA	sì	sì	sì
IRST	sì	sì MTA	sì	in corso valutazione	in corso

*Procedure di scambio internazionale di campioni e dati

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Cappelletti V, *et al.* Impact of biospecimens handling on biomarker research in breast cancer. *BMC Cancer* 2009;9:409.
2. Folgiero V, Avetrani P, Bon G, *et al.* Induction of ErbB-3 expression by alpha6b4 integrin contributes to tamoxifen resistance in ERbeta1-negative breast carcinomas. *PLoS ONE* 2008;3(2):e1592.
3. Mangia A, *et al.* Touch-imprints in tumour tissue bank for confirmation of neoplastic cellularity and DNA extration. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2008;132:974-8.

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

Giorgio Parmiani (a), Enrico Proietti (b)

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

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

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

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

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1:

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Anche per il secondo anno di attività numerose sono state le iniziative nei vari WP e buoni i risultati conseguiti nella diffusione delle informazioni relative alla attivazione e conduzione di studi di immuno-bioterapia dei tumori e nella standardizzazione delle procedure di

monitoraggio immuno-biologico. Altri centri sono stati coinvolti, nuovi rapporti instaurati tra le organizzazioni scientifiche che si occupano di bioterapie anche a livello internazionale.

Nell'ambito del WP 1 (Maio, UO1 e Ferrantini, UO2) si è conclusa la costruzione del sito web del NIBIT (www.nibit.org) che raccoglie informazioni sulle attività anche di gruppi esteri (es. CIMT, Germania; iSBTC, USA) interessati alla immuno-bioterapia dei tumori. È stata distribuita la guida cartacea "Utilizzo dei Vaccini in Oncologia" indirizzata ai pazienti affetti da neoplasia. Facendo seguito alla richiesta emersa durante la Riunione Operativa del Progetto, organizzata nel contesto del Corso di aggiornamento per medici, biologi, biotecnologi, CTF, data manager e infermieri di ricerca, sul tema: "Aspetti clinico-scientifici, organizzativi e regolatori della immunobioterapia del cancro" (Siena, 18-19 giugno 2009), l'UO2 organizzerà entro la primavera del 2010 un workshop per la definizione di una piattaforma per la costruzione di una rete nazionale di officine farmaceutiche GMP dedicate alla produzione di biofarmaci.

Nel WP2 (responsabili G. Parmiani, C. Pintus) l'UO3 ha collaborato alla preparazione dell'incontro di Siena (vedi sopra) e sta programmando un convegno internazionale sulle terapie biologiche combinate del cancro (5th Meeting on the combined immuno-biological therapy of cancer) che si terrà presso l'Istituto Scientifico Universitario San Raffaele di Milano il 9-10 aprile 2010 per discutere la potenzialità di questo approccio terapeutico e i risultati finora ottenuti in campo internazionale.

L'attività del WP 3 ha coinvolto anche nel secondo anno sei UO (L. Rivoltini, P. Nisticò, M. Rescigno, E. Proietti, M. Protti, M. Maio) per standardizzare protocolli per il monitoraggio dei pazienti in trattamento immuno-biologico. Le due UO che coordinano il WP3 (Rivoltini, Nisticò) hanno organizzato il secondo workshop nel corso del convegno di Siena dell'ottobre 2008 in cui si sono finalizzate le linee guida sul monitoraggio immunologico e si è proceduto alla stesura, pubblicazione e divulgazione di un apposito manuale. I protocolli di monitoraggio sono stati inseriti nel sito di ACC e NIBIT. Infine è stato reso disponibile un servizio di consulenza sulla pianificazione del monitoraggio immunologico dei protocolli clinici.

Nell'ambito del WP3, l'UO7 (Rescigno) ha studiato aspetti particolari del monitoraggio confrontando sia diverse tecniche di utilizzo dei tetrameri sia la ristimolazione *in vitro* dei linfociti con lisati tumorali. Inoltre si è messo a punto una colorazione con tetrameri in situ su tessuto congelato mentre sono proseguiti gli studi di screening di anticorpi per monitoraggio. L'UO9 (Protti) ha studiato risposte immunitarie tumore specifiche in soggetti con carcinoma del pancreas valutando l'attività proliferativa e multiparametrica delle citochine prodotte da linfociti T ristimolati *in vitro*. Inoltre studi in pazienti con melanoma vaccinati con MAGE-3 hanno confermato la correlazione tra risposta clinica e quella immunologica contro MAGE-3. Questi dati validano l'utilizzo dei test semiquantitativi microculturali per la valutazione delle risposte immuni antitumore antigene-specifiche nei modelli di vaccinazione.

Nel secondo anno di attività è stata ulteriormente sviluppata, da parte della UO10 (Maio), la banca biologica che comprende sieri e plasmi, prelevati prima del trattamento e a varie fasi della terapia, di pazienti affetti da neoplasie diverse inseriti in sperimentazioni cliniche di immunobioterapia. Il WP4 (Meneguz UO11, Ascierto UO12) ha continuato la raccolta della documentazione sugli aspetti regolatori e procedure delle sperimentazioni di fase I e alla sua divulgazione per soddisfare le esigenze di ricercatori clinici attraverso i 4 convegni programmati. Sono stati già organizzati quello di Milano (luglio 2008), Napoli (dicembre 2008) e Siena (giugno 2009) mentre è stato programmato quello di Roma (Istituto Superiore di Sanità) per la primavera del 2010. Un convegno internazionale sulle bioterapie combinate dei tumori avrà luogo a Milano (vedi sopra) nell'aprile del 2010 a conclusione dei precedenti incontri.

Il WP5 (Migliaccio UO13) ha come scopo la realizzazione di una rete di laboratori GMP per la produzione di prodotti medicinali avanzati e la verifica della loro operatività. Per questo sono

state identificate le strutture di riferimento per la possibile produzione dei singoli farmaci ed è in corso di valutazione la standardizzazione dei metodi e procedure di questi laboratori. Nella Riunione di Siena (giugno 2009) sono stati ribaditi i requisiti che definiscono le Cell Factories: siti di produzione di prodotti farmaceutici ATMP (Advanced Therapy Medical Products). La creazione di una rete nazionale di Cell Factories deve tener conto di una distribuzione disomogenea delle strutture, e può servire, oltre che all'ottimizzazione dei costi, a mettere in condivisione le attività di convalida. La UO15 (Ridolfi) ha proseguito nella standardizzazione/validazione di metodologie per l'esecuzione dei controlli di qualità quali: (i) analisi citogenetica e cariotipo molecolare, (ii) valutazione dell'attività telomerasica e analisi della lunghezza dei telomeri prima e dopo coltura *in vitro* del PMTC, per la valutazione d'eventuale processo di trasformazione neoplastica. Nel secondo anno, è stata eseguita la valutazione della predisposizione alla trasformazione neoplastica di diverse cellule tra cui linfociti T citotossici di pazienti con sarcoma.

La UO16 (Parodi) ha completato lo studio dell'infezione delle linee cellulari con diversi ceppi di micoplasma. Le linee infettate sono state esaminate con due metodi (fluorescenza secondo Farmacopea e PCR) e quindi valutate nel tempo per verificare la persistenza dell'infezione. È stata costituita una master bank delle linee infettate con tutti i ceppi e anche una banca di sovrantanti delle linee infettate.

Lo studio della UO17 (Rebulla) si è focalizzato su tre parti: una sulla raccolta e catalogazione delle procedure, dei contenitori e dei materiali standard per il trasporto a livello internazionale di campioni biologici (primo anno attività); una seconda in cui si è simulato un trasporto di prodotti biologici; una terza parte per validare i contenitori normalmente utilizzati per il trasporto di materiale biologico non crio-preserved via terra e sulla breve distanza. I dati sono stati raccolti in un database che riporta l'andamento dei vari fattori per l'intera durata del viaggio e l'analisi della qualità dei prodotti trasportati confrontando il pre e il post trasporto.

Obiettivo dell'UO18 (Maccario) è la standardizzazione/validazione di metodologie per l'esecuzione dei seguenti controlli di qualità: (i) analisi citogenetica e cariotipo molecolare PMTC, (ii) valutazione dell'attività telomerasica e analisi della lunghezza dei telomeri prima e dopo coltura *in vitro* del PMTC, per la valutazione d'eventuale processo di trasformazione neoplastica del PMTC. I risultati ottenuti hanno evidenziato l'assenza di trasformazione neoplastica [Bernardo *et al.*, *Cytotherapy* 2009 Aug 13 (online prima della stampa). prima della stampa). I tre lotti di CTL anti-tumore sono stati valutati per lunghezza dei telomeri e attività telomerasica dopo stimolazione. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la media della lunghezza dei telomeri è sempre superiore a 8Kb e rimane stabile dopo i due cicli d'espansione antigene-indipendente. L'UO19 (Rozer) ha valutato la sicurezza e la qualità di prodotti derivati dall'inattivazione fisica e/o biologica di cellule tumorali per verificare l'assenza di cellule proliferanti in campioni di cellule apoptotiche e in lisati tumorali.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Avanzini MA, Bernardo ME, Cometa AM, Perotti C, Zaffaroni N, Novara F, Visai L, Moretta A, Del Fante C, Villa R, Ball LM, Fibbe WE, Maccario R, Locatelli F. Generation of mesenchymal stromal cells in the presence of platelet lysate: a phenotypic and functional comparison of umbilical cord blood-and bone marrow-derived progenitors. *Haematologica* 2009;94(12):1649-60.
2. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Maio M, Rivoltini L, Fais S. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009;4:e5219.

3. Maio M, Nicolay HJ, Ascierto PA, *et al.* for the NIBIT. Sixth annual meeting of the Italian network for tumor biotherapy (NIBIT), Siena, 16-18 October 2008. *Cancer Immunol Immunother* 2009 Mar 28 (online prima della stampa). prima della stampa.
4. Maio M, Nicolay HJM, Ascierto P, Belardelli F, Camerini R, Colombo MP, Queirolo P, Ridolfi R, Russo V, Anzalone L, Fonsatti E, Parmiani G. The Italian Network for Tumor Biotherapy (NIBIT): getting together to push the field forward. *Journal of Translational Medicine* 2008;6:8.
5. Tassi E, Gavazzi F, Albarello L, Senyukov V, Longhi R, Dellabona P, Doglioni C, Braga M, Di Carlo V, Protti MP. Carcinoembryonic antigen-specific but not antiviral CD4⁺ T cell immunity is impaired in pancreatic carcinoma patients. *J Immunology* 2008;181:6595-6603.

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

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

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

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

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

In ottemperanza a quanto previsto dal contratto, negli ultimi 12 mesi l'attività del Progetto START si è articolata in:

- a. produzione di nuovi capitoli (Area Professionale)
- b. aggiornamento dei capitoli già disponibili online (Area Professionale e Area Pubblica)
- c. traduzione italiana dei capitoli redatti in lingua inglese (Area Professionale)
- d. adattamento dei capitoli, in lingua italiana, per il pubblico (Area Pubblica)

In qualità di capofila e coordinatore del progetto START, l'UO1 si è anche occupata di coordinare le attività di tutti i Contributor (Editor, Autori, Revisori) coinvolti nel lavoro di realizzazione e aggiornamento dei capitoli affidati alle 8 Unità Operative (UO) totali coinvolte nel Progetto, come riportato nella Tabella 1.

Come previsto, dopo la pubblicazione online, i capitoli disponibili sono stati inviati a Elsevier per la pubblicazione. La lista dei capitoli pubblicati è riportata nella Tabella 1.

Nel mese di maggio 2009 è stata implementata una nuova piattaforma, che ha modificato il sito di START, sia da un punto di vista formale sia, aspetto più importante, da un punto di vista operativo, rendendo la navigazione dell'utente più agevole, con l'opportunità di scaricare i capitoli in formato PDF, di stamparli e inviarli via posta elettronica, di ricevere notizie riguardanti la pubblicazione dei nuovi capitoli, attraverso la registrazione gratuita dei propri dati, e rendendo anche più pratico e veloce l'inserimento dei contenuti online da parte della segreteria redazionale.

È stata anche attivata una nuova gestione degli accessi al sito che, al contrario di quanto avveniva in passato, conteggia ogni singolo accesso e non il totale di pagine viste per ogni accesso.

Il numero degli accessi così computato, ha registrato un numero medio di accessi mensili pari a 16.000.

Tabella 1. Articolazione della Rete nazionale “Progetto START”

Unità operativa (Responsabile)	Area professionale		Area pubblica
	Capitoli in lingua inglese (nuovi – aggiornati)	Capitoli in lingua italiana (nuovi – aggiornati)	
UO1 INT (Lisa Licitra)	Medulloblastoma* Neuroblastoma* Wlm's tumors* Cervix** Vulva** ALL ** AML* Anus Antiemetics Cholangioca* CUP Endometr.** Esophagus Istiocytosis Metab. emerg NSCLC Ovary** Pancreas PCN* Saliv. glandsi	Microcitoma Ghiand. salivari AML ** Ano Colangioca* CUP Esofago Istiocitosi Pancreas Terapia antiem	Ca sede ignota Istiocitosi Terapia dolore Ghiand. Salivari Info generali Pancreas Terapia antiem.
UO2 ISS (Ruggero De Maria)	Thyroid*		
UO3 CRO (Umberto Tirelli)	AIDS-related tumours (x2)*		
UO4 ISTGE (Paolo Pronzato)	Hypopharynx** Oral cavity**		
UO5 IEO (Filippo De Braud)	Bladder Colon* Liver** Melanoma Prostate Rectus* Stomach*	Melanoma Prostata Vescica	Melanoma
		Leuc. Linf. Cron. Linfomi NH(x6)* Tumori cerebrali (x3)*	Linfomi non Hodgkin Malattia di Hodgkin Tumori cerebrali**
UO6 HSR (Andres Ferreri, Michele Reni)	NH lymphomas (x6)* Brain tumors (x3)*	Tumori cerebrali (x3)*	
UO7 IOR (Piero Picci, Stefano Ferrari)	Chondrosa** Osteosa** Ewing's sa**		
UO8 IDI (Giandomenico Russo)	Basal cell* Sezary sindr.** B-cell lymph.**		

* Capitoli in fase di pubblicazione

** Capitoli in avanzata fase di realizzazione/aggiornamento

Attraverso il Programma 4 nell'ambito del Programma Straordinario Oncologia 2006, START è stato integrato come Membro del Progetto Europeo ERA-Net CoCanCPG e, all'inizio del 2009, è stato proposto e accettato da OECI (*Organization of European Cancer Institutes*, organizzazione degli istituti oncologici europei), quale strumento per la realizzazione di raccomandazioni diagnostiche e terapeutiche inerenti al trattamento oncologico. START ha preso parte alla riunione del Working Group sulle Linee Guida di OECI, svoltosi a Manchester (Regno Unito) il 19 maggio 2009 all'interno del Congresso "OECI week" che ha avuto luogo dal 20 al 24 maggio 2009. Nella stessa occasione, la Dott.ssa Licitra ha preso parte all'Assemblea Generale.

Nel corso dei prossimi 12 mesi è previsto il completamento dei capitoli nuovi mancanti, con la relativa traduzione in lingua italiana e sezione informativa per il pubblico non specialistico, oltre all'aggiornamento dei capitoli già disponibili, e della relativa traduzione in lingua italiana e sezione informativa.

Sono in fase di pubblicazione i seguenti capitoli: Colon Cancer, Rectal Cancer, Major and Minor Salivary Gland Carcinoma.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C. Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;67:139-52.
2. Catalano V, Labianca R, Beretta GD, Gatta G, de BF, Van CE. Gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;71:127-64.
3. Iannitto E, Ferreri AJ, Minardi V, Tripodo C, Kreipe HH. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;68(3):264-71.
4. Marosi C, Hassler M, Roessler K, Reni M, Sant M, Mazza E, *et al.* Meningioma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;67:153-71.
5. Martelli M, Ferreri AJ, Johnson P. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;68(3):256-63.
6. Mosconi S, Beretta GD, Labianca R, Zampino MG, Gatta G, Heinemann V. Cholangiocarcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;69:259-70.
7. Pavlidis N, Fizazi K. Carcinoma of unknown primary (CUP). *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;69(3):271-8.
8. Ripamonti C, Bandieri E. Pain therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;70:145-59.
9. Van den Bent MJ, Reni M, Gatta G, Vecht C. Oligodendroglioma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:262-72.
10. Vitolo U, Ferreri AJ, Montoto S. Follicular lymphomas. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:248-61.
11. Vitolo U, Ferreri AJ, Montoto S. Lymphoplasmacytic lymphoma-Waldenstrom's macroglobulinemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;67:172-85.
12. Vitolo U, Ferreri AJ, Zucca E. Primary testicular lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;65:183-9.
13. Zampino MG, Labianca R, Beretta GD, Magni E, Gatta G, Leonardi MC, *et al.* Rectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;70:160-182.
14. Zinzani PL, Ferreri AJ, Cerroni L. Mycosis fungoides. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;65:172-82.

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

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

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

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

(c) *Associazione Italiana Registri Tumori*

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

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

La sezione del progetto dedicata alla raccolta di dati più dettagliati su stadio e trattamento è arrivata alla fase operativa. Lo specifico obiettivo era di incoraggiare i registri a raccogliere sistematicamente un più ampio assortimento di informazioni per tutti i casi rilevati. Una parte dei fondi è stata quindi utilizzata per finanziare la raccolta dei dati, con l'obiettivo di valutare la possibilità, il costo e la qualità della raccolta delle informazioni di tipo clinico, in previsione di farla rientrare nella routine dei registri negli anni futuri. Il budget disponibile non permette però la raccolta sistematica di tutti i casi. Si è quindi ripiegato su un campione rappresentativo estratto dalla banca dati AIRTUM (500 casi per mammella e colon-retto, 300 per polmone e 100 per linfomi e melanoma), nella convinzione che una raccolta veramente campionaria sia comunque sufficiente per raggiungere l'obiettivo. Uno studio pilota è stato condotto su un campione casuale di 50 casi allo scopo di valutare l'effettiva possibilità di raccogliere, con una completezza sufficiente, le informazioni richieste. I risultati dello studio pilota sono stati incoraggianti, e solo pochi registri sono stati esclusi dal campionamento per impossibilità di reperire le informazioni richieste. Il progetto si è quindi coordinato con lo studio EUROCARE (che intende raccogliere le stesse informazioni per uno di valutazione delle differenze di sopravvivenza in Italia) per utilizzare gli stessi protocolli e concentrare i finanziamenti sui registri che non partecipano ad EUROCARE. Ci si è quindi accordati nell'ambito dell'AIRTUM, per l'utilizzo dei dati EUROCARE per il progetto ACC e viceversa. Ciò ha permesso di incrementare il numero di registri coinvolti nei due progetti, ampliando così la rappresentatività del campione e la potenza dell'analisi statistica dei dati. Rispetto alla tabella presentata nella relazione dell'UO2, si renderanno pertanto disponibili i dati raccolti nell'ambito di EUROCARE da altri 9 registri per il tumore della mammella, 8 per il colon-retto, 4 per il polmone, 5 per il melanoma e 3 per i linfomi. I campioni su cui effettuare le rilevazioni sono stati identificati e inviati ai registri nel settembre 2009. I dati sono attesi entro dicembre 2009. Questa attività è stata condotta in collaborazione con i colleghi degli IRCCS. L'obiettivo per il prossimo anno è quello di ottenere dati analoghi per i registri degli IRCCS partecipanti allo studio e analizzare tutti i dati raccolti.

Prosegue l'attività di elaborazione di stime su base nazionale e regionale dei principali indicatori epidemiologici (incidenza, prevalenza e mortalità) per i tumori più frequenti e per tutti i tumori maligni considerati insieme. Sono state completate le analisi per i tumori del colo-retto e della mammella, mentre sono in corso quelle relative al tumore della prostata e per l'insieme dei tumori maligni. I primi risultati per le sedi precedentemente analizzate sono stati presentati in convegni a livello nazionale (AIRTUM, Siracusa, maggio, 2009), del GRELL (Lugano,

maggio 2009) e della riunione di aggiornamento dell'AIRTUM (Camerino, settembre, 2009). È prevista la pubblicazione complessiva di tutte le stime prodotte al termine del progetto.

L'attività sull'analisi della sopravvivenza in relazione ai fattori socio-economici si è sviluppata, nel corso dell'anno, soprattutto sul piano metodologico con l'obiettivo di costruire e validare indici di deprivazione per valutare su regioni o province le relazioni fra risultati sanitari e caratteristiche socio economiche delle popolazioni. È stato calcolato e fornito ai Registri Tumori un Indice di Deprivazione Nazionale 2001 calcolato per sezione di censimento e comune, nonché il rango di ciascuna area nel quintile di deprivazione stabilito a livello nazionale. Si sta sperimentando la costruzione di indici alternativi regionali e provinciali utilizzando gli outcomes di mortalità, incidenza e sopravvivenza. Nel corso del 2010 è prevista l'applicazione dei modelli statistici per le proiezioni di sopravvivenza dalle aree dei registri a livello regionale e nazionale.

RETE NAZIONALE SU MODELLI SPERIMENTALI E “FACILITIES” ANIMALI

Gennaro Citro (a), Stefano Fais (b)

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

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

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Per riassumere gli obiettivi principali di questa rete saranno:

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

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

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione della Rete nazionale sui modelli sperimentali e “facilities” animali

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Nel corso della seconda annualità, tutte le Unità Operative (UO) hanno continuato a produrre sia modelli animali che metodologie nuove per sperimentazioni finalizzate alla lotta contro il cancro. I risultati di tali attività, oltre che essere riportati nei lavori pubblicati, saranno inseriti nell'area dedicata nel sito allestito nel corso del primo anno di attività. (www.iss.it/onet). Nell'ambito della pagina di ACC, il sito ha il duplice scopo di mettere a disposizione di chiunque informazioni sulle attività della rete e di rendere snella qualsiasi procedura di comunicazione tra le UO che hanno aderito alla costituzione della rete. Inoltre, la rete sui modelli pre-clinici in oncologia era ed è aperta all'inserimento progressivo possibilmente di tutti i gruppi presenti sul territorio nazionale, coinvolti nella ricerca pre-clinica in ambito oncologico. Il sito è stato strutturato con l'aiuto del personale informatico dell'ISS; nella pagina web sono

rappresentate diverse sezioni tra cui un archivio, in continuo aggiornamento, dove è possibile venire a conoscenza di A) tutti i modelli sperimentali disponibili, sia cellulari che animali, presenti nelle strutture della rete e quindi sul territorio nazionale; B) tutte le facilities disponibili nell'ambito della sperimentazione pre-clinica in ambito oncologico, l'ubicazione delle stesse, con i nomi dei ricercatori responsabili a cui far riferimento. Al termine di questi due anni di attività è stato creato uno strumento totalmente nuovo, che mette a disposizione di sperimentatori pubblici e privati un archivio dei modelli pre-clinici in oncologia presenti in Italia. Ci sentiamo di dire che in questo archivio sono presenti la gran parte dei modelli esistenti per lo studio dei tumori sia *in vitro* che *in vivo*. Fra le novità di maggior interesse emerse nell'ultimo anno, vi sono i modelli per lo studio delle cellule staminali tumorali. Ad esempio, nell'ambito della ricerca focalizzata a debellare le cellule staminali tumorali, la somministrazione *in vivo* ai topi MMTV-ErbB2 (modello usato per studiare il ruolo delle staminali nella crescita e mantenimento del tumore alla mammella) di Nutlin3, ha chiaramente dimostrato che la riduzione della massa tumorale del 90% è dovuta alla capacità di tale composto di distruggere in modo selettivo le cellule staminali. Altro modello messo a punto di recente è quello dei topi transgenici TRAMP, geneticamente privi di linfociti NKT, che sviluppano spontaneamente il carcinoma della prostata e la crescita tumorale correlava con una significativa riduzione della sopravvivenza. Altro modello interessante ultimamente utilizzato nella rete è quello che permette di valutare il ruolo delle citochine nella crescita neoplastica. Sono stati ultimamente inseriti topi knockout per un recettore chemochinico che normalmente funziona da decoy, D6. Il D6 è un recettore espresso dall'endotelio linfatico e da leucociti, che ha la funzione di scavenger per chemochine CC e di regolare negativamente le risposte infiammatorie. Questi topi sono stati usati in modelli di colon carcinogenesi associati a malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD). La rete ha inoltre dimostrato capacità aggregante con reti locali e istituzioni di ricerca, non dotate di animal facility, come avvenuto per l'UO dell'Istituto Pascale di Napoli, in grado di stipulare convenzioni con il Dipartimento di Medicina Sperimentale della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli studi "Maegna Graecia" in Catanzaro; con il Dipartimento DIFARMA della Facoltà di Farmacia dell'Università degli studi di Salerno, in Fisciano; con il Centro di Endocrinologia Oncologica Sperimentale – CNR, in Napoli.

È importante sottolineare che durante 2009, la rete ha coordinato o promosso corsi come quello svoltosi presso l'IST di Genova il Corso di Aggiornamento Teorico - Pratico: Modelli Preclinici Oncologici: Aspetti Scientifici, Tecnici ed Etici (Progetto ECM Regionale – Regione Liguria - RFLPV7 – ECMPG 207) sotto il patrocinio di ACC. Il corso era focalizzato su nuove tecnologie per la diagnostica e l'imaging di animali da laboratorio, ma aveva lo scopo primario di fornire una panoramica sui modelli animali utilizzabili nella sperimentazione preclinica in oncologia e di condividere il know-how scientifico, tecnico, tecnologico e gestionale delle strutture di ricerca italiane più impegnate in questo campo, proprio nello spirito della Rete Oncologica Nazionale di "Alleanza contro il Cancro". Infine, è recente l'introduzione nella rete di un nuovo approccio per la valutazione *in vivo* di nuove strategie anti-tumorali. Per una iniziativa dell'UO dell'IRE di Roma sono stati ultimamente utilizzati modelli di tumore spontaneo in animali da compagnia quali cani e gatti per nuovi approcci diagnostici e terapeutici. L'uso degli animali da compagnia affetti da tumori maligni è per alcuni versi antitetico all'uso di veri e propri modelli sperimentali ottenuti ad hoc in laboratorio e se vogliamo per molti aspetti messi in discussione per il basso livello di predittività mostrato negli ultimi 20 anni. Infatti, cani e gatti possono essere considerati singoli pazienti, in quanto la patologia è simile a quella dell'uomo e viene curata con protocolli terapeutici identici. Inoltre, gli animali da compagnia costituiscono "spie biologiche" dell'ambiente nel quale convivono con la specie umana, avendo spesso stili di vita controllati (alimentazione, no fumo attivo, no

alcool ecc.). I risultati ottenuti sono di sicuro interesse come riportato nella relazione della UO. In conclusione la rete sui modelli pre-clinici in oncologia è stata costituita ed è operativa sul territorio nazionale grazie al programma 2 di ACC. Lo sforzo da tutti prodotto in questi due anni ha sicuramente fornito un nuovo strumento di ampio utilizzo nella ricerca pre-clinica su nuovi approcci diagnostici e terapeutici nei confronti dei tumori.

Publicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Accardo A, Tesaro D, Aloj L, Tarallo L, Arra C, Mangiapia G, Vaccaro M, Pedone C, Paduano L, Morelli G. Peptide-containing aggregates as selective nanocarriers for therapeutics. *Chem Med Chem* 2008;3(4):594-602.
2. Airoidi I, Cocco C, Giuliani N, Ferrarini M, Colla S, Ognio E, Taverniti G, Di Carlo E, Cutrona G, Perfetti V, Rizzoli V, Ribatti D, Pistoia V. Constitutive expression of IL/12Rbeta2 on human multiple myeloma cells delineates a novel therapeutic target. *Blood* 2008;112:750-9.
3. Airoidi I, Di Carlo E, Cocco C, Caci E, Cilli M, Sorrentino C, Sozzi G, Ferrini S, Rosini S, Bertolini G, Truini M, Grossi F, Galletta L, Ribatti D, Pistoia V. IL/12 can target human lung adenocarcinoma cells and normal bronchial epithelial cells surrounding tumor lesions. *PLoS One* 2009;4:e6119;1-e6119;11.
4. Assin R, Baldi A, Citro G, Spugnini EP. Prostate as sole unusual recurrence site of lymphoma in a dog. *In Vivo* 2008;22(6):755-7.
5. Baldi A, Mottotese M, Vincenzi B, Campioni M, Mellone P, Di Marino M, di Crescenzo VG, Visca P, Menegozzo S, Spugnini EP, Citro G, Ceribelli A, Mirri A, Chien J, Shridhar V, Ehrmann M, Santini M, Facciolo F. The serine protease HtrA1 is a novel prognostic factor for human mesothelioma. *Pharmacogenomics* 2008;9(8):1069-77.
6. Berardi AC, Marsilio S, Rofani C, Salvucci O, Altavista P, Perla FM, Diomedi-Camassei F, Uccini S, Kokai G, Landuzzi L, McDowell HP, Dominici C. Up-regulation of EphB and ephrin-B expression in rhabdomyosarcoma. *Anticancer Res* 2008;28:763-9.
7. Bertino P, Piccardi F, Porta C, Favoni R, Cilli M, Mutti L, Gaudino G. Imatinib mesylate enhances therapeutic effects of gemcitabine in human malignant mesothelioma xenografts. *Clin Cancer Res* 2008;14:541-548.
8. Biocca S, Filesi I, Mango R, Maggiore L, Baldini F, Vecchione L, Viola A, Citro G, Federici G, Romeo F, Novelli G. The splice variant LOXIN inhibits LOX-1 receptor function through hetero-oligomerization. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44(3):561-70.
9. Bonizzi G, Cicalese A, Pasi CE, Faretta M, Ronzoni S, Giulini B, Briskin C, Minucci S, Di Fiore PP, Pelicci PG. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* 2009;138(6):1083-95.
10. Brignole C, Marimpietri D, Pastorino F, Di Paolo D, Pagnan G, Loi M, Piccardi F, Cilli M, Tradori Cappai A, Arrigoni G, Pistoia V, Ponzoni M. Anti IL/10R antibody improves the therapeutic efficacy of targeted liposomal oligonucleotides. *J Control Release* 2009;138:122-7.
11. Campioni M, Ambrogio V, Pompeo E, Citro G, Castelli M, Spugnini EP, Gatti A, Cardelli P, Lorenzon L, Baldi A, Mineo TC. Identification of genes down-regulated during lung cancer progression: a cDNA array study. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;15:27:38.
12. Carriero MV, Longanesi-Cattani I, Bifulco K, Maglio O, Lista L, Barbieri A, Votta G, Masucci MT, Arra C, Franco R, De Rosa M, Stoppelli MP, Pavone V. Structure-based design of an

- urokinase-type plasminogen activator receptor-derived peptide inhibiting cell migration and lung metastasis. *Mol Cancer Ther* 2009;8(9):2708-17.
13. Crispi S, Calogero RA, Santini M, Mellone P, Vincenzi B, Citro G, Vicidomini G, Fasano S, Meccariello R, Cobellis G, Menegozzo S, Pierantoni R, Facciolo F, Baldi A, Menegozzo M. Global gene expression profiling of human pleural mesotheliomas: identification of matrix metalloproteinase 14 (MMP-14) as potential tumour target. *PLoS One* 2009;4(9):e7016.
14. De Luca A, De Falco M, Manente L, Dattilo D, Lucariello A, Esposito V, Gnarini M, Citro G, Baldi A, Tufano MA, Iaquinto G. Helicobacter pylori heat shock protein B (HspB) localizes *in vivo* in the gastric mucosa and MALT lymphoma. *J Cell Physiol* 2008;216(1):78-82.
15. de Nigris F, Rossiello R, Schiano C, Arra C, Williams-Ignarro S, Barbieri A, Lanza A, Balestrieri A, Giuliano MT, L. Ignarro J, Napoli C. Deletion of YY1 in osteosarcoma cells on cell invasion and CXCR4/angiogenesis and metastasis. *Cancer Research* 2008;68(6):1797-808.
16. Di Agostino S, Cortese G, Monti O, Dell'orso S, Sacchi A, Eisenstein M, Citro G, Strano S, Blandino G. The disruption of the protein complex mutantp53/p73 increases selectively the response of tumor cells to anticancer drugs. *Cell Cycle* 2008;16:7(21):3440-7.
17. Ehlers S, Mueck T, Adams S, Landuzzi L, Lollini PL, Munz B. RIP2 regulates growth and differentiation of normal myoblasts and of rhabdomyosarcoma cells. *Eur J Cell Biol* 2008;87:163-72.
18. Fedele M, Palmieri D, Chiappetta G, Pasquinelli R, De Martino I, Arra C, Palma G, Valentino T, Pierantoni GM, Viglietto G, Rothstein JL, Santoro M, Fusco A. Impairment of the p27kip1 function enhances thyroid carcinogenesis in TRK-T1 transgenic mice. *Endocr Relat Cancer* 2009;16(2):483-90.
19. Fedeli M, Napolitano A, Wong MP, Marcais A, de Lalla C, Colucci F, Merkenschlager M, Dellabona P, Casorati G. Dicer-dependent microRNA pathway controls invariant NKT cell development. *J Immunol* 2009;183(4):2506-12.
20. Felici A, Di Segni S, Milella M, Colantonio S, Sperduti I, Nuvoli B, Contestabile M, Sacconi A, Zaratti M, Citro G, Cognetti F. Pharmacokinetics of gemcitabine at fixed-dose rate infusion in patients with normal and impaired hepatic function. *Clin Pharmacokinet* 2009;48(2):131-41.
21. Fenoglio C, Grosso A, Petrillo G, Boncompagni E, Aiello C, Cordazzo C, Spinelli D, Ognio E, Marigiò M, Cassano A, Viale M. A histochemical approach to the evaluation of the *in vivo* cytotoxicity of the nitrobutadienes (1E,3E)/1,4/bis(1/naphthyl)/2,3/dinitro/1,3/butadiene and methyl (2Z,4E)/2/methylsulfanyl/5/(1/naphthyl)/4/nitro/2,4/pentadiene in mice liver and kidney. *Anticancer Res* 2008;28:813-23.
22. Franceschini V, Bettini S, Pifferi S, Rosellini A, Menini A, Saccardi R, Ognio E., Jeffery R., Poulson R., Revoltella R. Human cord blood CD133+ stem cells transplanted to Nod Scid mice provide conditions for regeneration of olfactory neuroepithelium after permanent damage induced by dichlobenil. *Stem Cells* 2009;27:825-35.
23. Ierano C, Giuliano P, D'Alterio C, Cioffi M, Mettivier V, Portella L, Napolitano M, Barbieri A, Arra C, Liguori G, Franco R, Palmieri G, Rozzo C, Pacelli R, Castello G, Scala S. A point mutation (G574A) in the chemokine receptor CXCR4 detected in human cancer cells enhances migration. *Cell Cycle* 2009;8(8):1228-37.
24. Iama A, Viale M, Cilli M, Bruzzo C, Novelli F, Tasso B, Sparatore F. *In vitro* cytotoxic activity of tri/n-butyltin(IV)lupinylsulfide hydrogen fumarate (IST/FS 35) and preliminary antitumor activity *in vivo*. *Invest New Drugs* 2009;27:124-30.
25. Lorenzon D, Mazzucato M, Abbruzzese L, Cilli M, De Angeli S, Degan M, Mambrini G, Piccardi F, Rupolo M, Michieli M, De Marco L, Gattei V, Astori G. Preclinical *ex vivo* expansion of peripheral blood CD34+ selected cells from cancer patients mobilized with combination chemotherapy and granulocyte colony stimulating factor. *Vox Sang* 2008;94:342-50.

26. Manente L, Perna A, Buommino E, Altucci L, Lucariello A, Citro G, Baldi A, Iaquinto G, Tufano MA, De Luca A. The *Helicobacter pylori*'s protein VacA has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells. *J Cell Physiol* 2008;214(3):582-7.
27. Marra M, Giudice A, Arra C, Vitale G, Castiglioni S, Nasti G, Lombardi A, Ottaiano A, Facchini G, Iaffaioli RV, Abbruzzese A, Caraglia M. Target-based agents in neo-adjuvant treatment of liver metastases from colo-rectal cancer: Secret weapons in anti-cancer war? *Cancer Biol Ther* 2009;8:18.
28. Matis S-Mariani MR, Cutrona G, Cilli M, Piccardi F, Daga A, Damonte G, Millo E, Moroni M, Roncella S, Fedeli F, Boffa LC, Ferrarini M. PNAEmu can significantly reduce Burkitt's lymphoma tumor burden in a SCID mice model: cells dissemination similar to the human disease. *Cancer Gene Ther* 2009;16:786-793.
29. Miretti S, Roato I, Taulli R, Ponzetto C, Cilli M, Olivero M, Di Renzo M, Godio L, Albin A, Buracco P, Ferracini R. A mouse model of pulmonary metastasis from spontaneous osteosarcoma monitored *in vivo* by luciferase imaging. *PLoS One* 2008;3:e1828;1-e1828;8.
30. Molfino A, Muscaritoli M, Cascino A, Fanfarillo F, Fava A, Bertini G, Citro G, Rossi Fanelli F, Laviano A. Free tryptophan/large neutral amino acids ratios in blood plasma do not predict cerebral spinal fluid tryptophan concentrations in interleukin-1-induced anorexia. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;89(1):31-5.
31. Nobbio L, Fiorese F, Vigo T, Cilli M, Gherardi G, Grandis M, Melcangi R, Mancardi G, Abbruzzese M, Schenone A. Impaired expression of ciliary neurotrophic factor in Charcot Marie Tooth type 1A neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:441-55.
32. Pagnan G, Di Paolo D, Carosio R, Pastorino F, Marimpietri D, Brignole C, Pezzolo A, Loi M, Galletta L, Piccardi F, Cilli M, Nico B, Ribatti D, Pistoia V, Ponzoni M. The combined therapeutic effects of bortezomib and fenretinide on neuroblastoma cells involve endoplasmic reticulum stress response. *Clin Cancer Res* 2009;15:1199-209.
33. Pantaleo MA, Nannini M, Maleddu A, Fanti S, Nanni C, Boschi S, Lodi F, Nicoletti G, Landuzzi L, Lollini PL, Biasco G. Experimental results and related clinical implications of PET detection of epidermal growth factor receptor (EGFr) in cancer. *Ann Oncol* 2009;20(2):213-26.
34. Pastorino F, Di Paolo D, Piccardi F, Nico B, Ribatti D, Daga A, Baio G, Neumaier C, Brignole C, Loi M, Marimpietri D, Pagnan G, Cilli M, Lepekhin E, Garde S, Longhi R, Corti A, Allen T, Wu J, Ponzoni M. Enhanced antitumor efficacy of clinical grade vasculature targeted liposomal doxorubicin. *Clin Cancer Res* 2008;14:7320-9.
35. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: *in vivo* imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One* 2008;3:e2599;1-e2599;9.
36. Pietra G, Manzini C, Vitale M, Balsamo M, Ognio E, Boitano M, Queirolo P, Moretta L, Mingari MC. Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells. *Int Immunol* 2009;21:793-801.
37. Ponassi R, Biasotti B, Tomati V, Bruno S, Poggi A, Malacarne D, Cimoli G, Salis A, Pozzi S, Miglino M, Damonte G, Cozzini P, Spyraiki F, Campanini B, Bagnasco L, Castagnino N, Tortolina L, Mumot A, Frassoni F, Daga A, Cilli M, Piccardi F, Monfardini I, Perugini M, Zoppoli G, D'arrigo C, Pesenti R, Parodi S. A novel Bim/BH3 derived Bcl/X(L) inhibitor. Biochemical characterization, *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* anti leukemic activity. *Cell Cycle* 2008;7:3211-24.
38. Revoltella R, Papini S, Rosellini A, Michelini M, Franceschini V, Ciorba A, Bertolaso L, Magosso S, Hatzopoulos S, Lorito G, Giordano P, Simoni E, Ognio E, Cilli M, Saccardi R, Urbani S, Jeffery R, Poulson R, Martini A. Cochlear repair by transplantation of human cord blood CD133+ cells to No Scid mice made deaf with kanamycin and noise. *Cell Transplant* 2008;17:665-78.
39. Romano S, D'Angelillo A, Pacelli R, Staibano S, De Luna E, Bisogni R, Eskelinen EL, Mascolo M, Cali G, Arra C, Romano MF. Role of FK506-binding protein 51 in the control of apoptosis of

- irradiated melanoma cells. *Cell Death Differ* 2010;17(1):145-57. 2009 Aug 21 (online prima della stampa). prima della stampa).
40. Ruocco LA, Di Pizzo A, Carnevale UA, Murolo M, Sadile AG, Arra C, Topo E, D'Aniello A, Curcio A, Melisi D, Rimoli MG. Excitatory amino acids in the forebrain of the Naples high-excitability rats: neurochemical and behavioural effects of subchronic D-aspartate and its diethyl ester prodrug. *Behav Brain Res* 2009;198(1):37-44.
41. Ruocco LA, Gironi Carnevale UA, Sadile AG, Sica A, Arra C, Di Maio A, Topo E, D'Aniello A. Elevated forebrain excitatory L-glutamate, L-aspartate and D-aspartate in the Naples high-excitability rats. *Behav Brain Res* 2009;198(1):24-8.
42. Ruocco LA, Gironi Carnevale UA, Sica A, Arra C, Topo E, Di Giovanni M, D'Aniello A, Sadile AG. Differential prepuberal handling modifies behaviour and excitatory amino acids in the forebrain of the Naples high-excitability rats. *Behav Brain Res* 2009;198(1):29-36.
43. Spugnini EP, Campioni M, D'Avino A, Caruso G, Citro G, Baldi A. Cell-cycle molecules in mesothelioma: an overview. *J Exp Clin Cancer Res* 2007;26(4):443-9.
44. Spugnini EP, Citro G, Baldi A. Adjuvant electrochemotherapy in veterinary patients: a model for the planning of future therapies in humans. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:114.
45. Spugnini EP, Citro G, D'Avino A, Baldi A. Potential role of electrochemotherapy for the treatment of soft tissue sarcoma: first insights from preclinical studies in animals. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(2):159.
46. Spugnini EP, Citro G, Dotsinsky I, Mudrov N, Mellone P, Baldi A. Ganglioneuroblastoma in a cat: a rare neoplasm treated with electrochemotherapy. *Vet J* 2008;178(2):291-3.
47. Spugnini EP, Crispi S, Scarabello A, Caruso G, Citro G, Baldi A. Piroxicam and intracavitary platinum-based chemotherapy for the treatment of advanced mesothelioma in pets: preliminary observations. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;27:6.
48. Spugnini EP, Dotsinsky I, Mudrov N, Bufalini M, Giannini G, Citro G, Feroce F, Baldi A. Adjuvant electrochemotherapy for incompletely excised anal sac carcinoma in a dog. *In Vivo* 2008;22(1):47-9.
49. Spugnini EP, Dotsinsky I, Mudrov N, Citro G, Caruso G, Cardelli P, Baldi A. Electrochemotherapy-induced radiation recall in a cat. *In Vivo* 2008;22(6):751-3.
50. Spugnini EP, Dotsinsky I, Mudrov N, Citro G, D'Avino A, Baldi A. Biphasic pulses enhance bleomycin efficacy in a spontaneous canine genital tumor model of chemoresistance: Sticker sarcoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;3;27(1):58.
51. Spugnini EP, Dotsinsky I, Mudrov N, De Luca A, Codini C, Citro G, D'Avino A, Baldi A. Successful rescue of an apocrine gland carcinoma metastatic to the cervical lymph nodes by mitoxantrone coupled with trains of permeabilizing electrical pulses (electrochemotherapy). *In Vivo* 2008;22(1):51-3.
52. Spugnini EP, Filipponi M, Romani L, Dotsinsky I, Mudrov N, Baroni A, Ruocco E, Laieta MT, Montesarchio V, Cassandro R, Citro G, Baldi A. Local control and distant metastasis after electrochemotherapy of a canine anal melanoma. *In Vivo* 2007;21(5):897-9.
53. Spugnini EP, Gargiulo M, Assin R, D'Avino A, Mellone P, Citro G, Cardelli P, Baldi A. Adjuvant carboplatin for the treatment of intestinal carcinoid in a dog. *In Vivo* 2008;22(6):759-61.
54. Spugnini EP, Pagotto A, Zazzera F, D'Avino A, Caruso G, Citro G, Baldi A. Cutaneous T-cell lymphoma in an African hedgehog (*Atelerix albiventris*). *In Vivo* 2008;22(1):43-5.
55. Spugnini EP, Vincenzi B, Betti G, Cordahi F, Dotsinsky I, Mudrov N, Citro G, Baldi A. Surgery and electrochemotherapy of a high-grade soft tissue sarcoma in a dog. *Vet Rec* 2008;162(6):186-8.
56. Spugnini EP, Vincenzi B, Caruso G, Baldi A, Citro G, Santini D, Tonini G. Zoledronic acid for the treatment of appendicular osteosarcoma in a dog. *J Small Anim Pract* 2009;50(1):44-6.

57. Spugnini EP, Vincenzi B, Citro G, Tonini G, Dotsinsky I, Mudrov N, Baldi A. Electrochemotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma in cats: a preliminary report. *Vet J* 2009;179(1):117-20.
58. Tonti E, Galli G, Malzone C, Abrignani S, Casorati G, Dellabona P. NKT cell help to B lymphocytes can occur independently of cognate interaction. *Blood* 2009;113(2):370-6.
59. Turco MC, Lamberti A, Bisogni R, Romano MF, Petrella A, Ammirante M, Rosati A, Davenia M, Arra C, Spugnini E, Bonelli P, Venuta S. Modulation of cell apoptosis by AIR. *Leukemia* 2008;22(1):229.

NETWORK NAZIONALE ITALIANO TUMORI EREDO-FAMIGLIARI (InTEF)

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

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

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

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

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

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

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

Obiettivi secondari sono rappresentati da:

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Di seguito vengono descritte le principali attività in cui il progetto si è articolato nel corso del secondo anno di attuazione.

1. Area Consulenza Genetica Oncologica (CGO)

Nel gennaio 2009, si è chiusa l'indagine conoscitiva (INTEFquery1) promossa per individuare e confrontare le attività condotte sui tumori eredo-famigliari (TEF) presso le strutture di Genetica Clinica (SGC) e di Oncologia Medica (SOM) italiane. In totale, 55 su 77 SGC (71,4%) e 145 su 326 SOM (44,5%) hanno contribuito all'indagine; 47 strutture (21 SGC e 26 SOM) dichiarano di fornire CGO in modo non sporadico (≥ 1 CGO/settimana). Queste strutture sono presenti in 15 su 20 regioni. 16 su 21 SGC (76,2%) e 11 su 26 SOM (42,3%) appartengono ad enti che svolgono anche attività di ricerca. Per quanto riguarda le modalità di accesso ai test genetici diagnostici, è stato osservato che nella maggior parte delle strutture esso è strettamente vincolato alla

presenza di una probabilità di mutazione superiore ad un dato valore soglia, è sottoposto alla valutazione indipendente del laboratorio e dipende dalla disponibilità di un affetto vivente. Questi risultati, sebbene non specifici per patologia, segnalano che sul territorio nazionale vi è un'estrema variabilità nei criteri di accesso ai test genetici per i TEF, con possibili situazioni di forte disuguaglianza. Allo scopo di approfondire questi aspetti, è stato preso come modello il tumore ereditario mammella/ovaio e si è promosso uno studio di confronto del valore predittivo di diversi strumenti di valutazione della probabilità di mutazione dei geni BRCA (BOADICEA, BRCAPRO, criteri tabellari). Alla proposta hanno aderito 28 centri; l'inizio della raccolta dati è previsto per febbraio 2009.

2. *Indagine conoscitiva sui laboratori che effettuano test per la ricerca di mutazioni nei geni di predisposizione al cancro*

L'analisi conoscitiva, condotta come descritto nella precedente relazione della UO1 (INT-Radice), ha portato alla identificazione sul territorio nazionale di 52 strutture che dichiarano di eseguire test genetici nelle forme di predisposizione al cancro, cui è stato inviato un primo questionario per la rilevazione delle informazioni relative alla loro attività (INTEFquerylab1). Al momento, 24 laboratori (46%) hanno compilato e restituito il questionario. L'elaborazione dei dati raccolti è attualmente in corso. Inoltre, si sta procedendo alla revisione della lista dei laboratori sulla base dei dati del censimento 2007 della Società Italiana di Genetica Umana, che sono stati recentemente resi disponibili online, e alla elaborazione di un secondo questionario, finalizzato in particolare alla raccolta di informazioni circa la sensibilità dei metodi utilizzati, le modalità di refertazione e di interpretazione del risultato e di copertura dei costi.

3. *Costruzione del sito web*

Conclusa la fase preliminare della costruzione del sito web inTEF (<http://www.iss.it/itef>), dedicata principalmente alla descrizione del network e delle Unità Operative (UO) che a esso afferiscono, è stato avviato lo sviluppo della parte operativa relativa ad alcune delle aree funzionali. Sono stati inseriti dei contenuti (informazioni e dati di letteratura) nell'area dedicata ai saggi funzionali riguardanti le mutazioni nel gene MUTYH, che sono oggetto di studio da parte di diversi dei gruppi inTEF. Sono stati inoltre inseriti nell'area CGO alcuni documenti consultabili liberamente, contenenti linee-guida e referenze relative ai centri di riferimento della rete, al momento limitate alla regione Liguria.

Sono state infine raccolte in un database preliminare, consultabile solo tramite accesso riservato, le informazioni relative a varianti del gene MUTYH rese disponibili da alcune delle UO inTEF. È inoltre in fase avanzata la creazione di un vero database online relativo alle varianti italiane del gene raggiungibile dal sito ACC-inTEF. Il database (già realizzato nella sua versione preliminare) è basato sulla struttura del Leiden Open Variation Database (LOVD) sviluppato e mantenuto al Leiden University Medical Center e contenente le informazioni già disponibili in letteratura e di pubblico accesso sulle mutazioni MUTYH a livello internazionale. Inteso come una versione italiana del LOVD limitata all'ambito inTEF, il database sarà accessibile per l'inserimento dei dati e la loro consultazione alle UO che partecipano al database stesso e ad altri centri, se autorizzati.

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

La rete si propone la definizione e la valutazione di protocolli per la sorveglianza di donne ad alto rischio genetico di tumore mammario, sulla base di uno studio-pilota multicentrico, di tipo prospettico e non-randomizzato, basato sull'uso integrato di visita senologica, mammografia, ecografia e risonanza magnetica a contrasto dinamico (MRI), con cadenza annuale. La rete attualmente comprende 8 IRCCS oncologici in collaborazione con Aziende Ospedaliere, Policlinici e Istituti Universitari operativi in 16 città italiane (vedi precedente relazione).

Nel 2009 sono stati consolidati e analizzati i dati di uno studio prospettico non-randomizzato di valutazione multimodale comparativa (ISS-HIBCRIT, High Breast Cancer Risk Italian Study) coordinato dall'ISS e condotto negli anni 2000-2008 da 18 UO italiane integrate, comprendenti strutture e competenze pluriennali di consulenza genetica, radiologia, senologica multimodale e oncologia clinico-chirurgica. I risultati, ottenuti su 501 donne (1592 sessioni diagnostiche, 3.2 round/donna) hanno indicato la superiorità diagnostica della MRI rispetto a mammografia, ecografia o alla combinazione di mammografia + ecografia, in donne di età sia inferiore che superiore a 50 anni. Il contingente totale degli arruolamenti effettuati negli anni 2008-2009 nella attuale rete di sorveglianza ammonta a oltre 700 donne (550 nuovi arruolamenti rispetto allo studio HIBCRIT) di cui 66% portatrici di mutazione e 38% con precedente evento di neoplasia mammaria. I dati di arruolamento e diagnostica multimodale sono raccolti in un apposito database relazionale e in repository contenenti le immagini radiologiche codificate per centro, per round e per modalità di imaging.

5. *Collegamento con reti collaborative internazionali*

È stato costituito un consorzio (CONsorzio Italiano per lo STudio dei Tumori Ereditari Alla Mammella, CONIST TEAM) finalizzato alla partecipazione di gruppi di ricerca italiani al Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). Il consorzio riunisce cinque unità inTEF e tre gruppi esterni. In totale, sono stati raccolti campioni di DNA costitutivo di circa 1250 donne portatrici di mutazioni nei geni BRCA e sei marcatori genici polimorfi sono stati tipizzati nel laboratorio della UO1, al fine di valutare il loro effetto nel modificare la penetranza delle suddette mutazioni. I dati genotipici ed le informazioni cliniche e patologiche dei soggetti inclusi nello studio sono stati inviati al centro coordinatore del CIMBA (Strangeways Research Laboratory, Cambridge, Regno Unito) per le analisi statistiche.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Podo F, Sardanelli F, Santoro F, Manoukian S, Bergonzi S, Trecate G, Vergnaghi D, Federico M, Cortesi L, Corcione S, *et al* for the High Breast Cancer Risk Italian (HIBCRIT) Study. Surveillance of women at high risk of hereditary breast cancer: a multicenter comparative evaluation of mammography, ultrasonography, and MRI (the HIBCRIT Study). (inviato per la pubblicazione 2009).

RETE NAZIONALE DI BIOINFORMATICA ONCOLOGICA (RNBIO)

Paolo Romano (a), Marco Crescenzi (b)

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

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

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

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

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

In particolare, il progetto:

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

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Durante il secondo anno di progetto, l'attività della Rete Nazionale di Bioinformatica Oncologica (RNBIO) si è sviluppata secondo le linee previste, con la partecipazione effettiva e continua dei partner. Il coordinamento si è svolto tramite skype, posta elettronica, incontri generali, in occasione di workshop scientifici, e meeting ristretti, in occasione di corsi. Le mailing list sono state utilizzate costantemente per lo scambio di informazioni tra partner, e per la diffusione di annunci, quali eventi scientifici, corsi e offerte di lavoro, la newsletter RNBIO.

L'iscrizione alle liste è aperta a tutti e gli archivi sono accessibili online. Questo ha consentito di ampliare il numero di ricercatori che ricevono le news della rete e l'annuncio della Newsletter. Attualmente, sono iscritti circa 50 ricercatori, esclusi i partecipanti alla rete.

Il sito web di progetto (<http://www.rnbio.it/>), è stato ampliato inserendo annunci di eventi scientifici (ca. 60 eventi), offerte di lavoro (circa 60 annunci), informazioni sulle pubblicazioni scientifiche (46 ad oggi), informazioni sulle prossime attività formative e materiale didattico di quelle svolte, e le newsletter della rete. Sono state pubblicate sinora tre newsletter tematiche. La redazione è stata curata dal coordinamento, mentre i contenuti sono stati concordati coi referenti dei gruppi di lavoro coinvolti. Le newsletter sono state rese disponibili nei formati HTML, per la lettura online, e PDF, per il download e l'eventuale stampa. La prima newsletter è stata dedicata agli obiettivi della rete e alla presentazione delle Unità Operative (UO), con un focus sul gruppo di Biostatistica, la seconda alle attività della rete in supporto all'oncogenomica e all'analisi dei dati di Next-Generation sequencing, e la terza alle attività in supporto all'oncoproteomica e alla bioinformatica strutturale. La quarta newsletter sarà dedicata alla Bioinformatica Clinica e all'Automazione delle procedure d'analisi dei dati.

L'adozione del software Plone, un Contents Management System (CMS) per la gestione collaborativa di siti web, ha consentito ai partner, che sono tutti dotati di un account, di inserire propri contributi nel sito, anche se lo sforzo principale è stato effettuato dal coordinamento. Per stimolare la partecipazione dei partner, sono allo studio nuove iniziative, come la redazione di manuali e lo svolgimento di tutorial.

È stata sviluppata un'ipotesi di metodologia per la gestione delle attività dei gruppi di lavoro, un modello per la loro 'Research Governance', che comprende linee guida e procedure per organizzare e gestire tali attività in modo sistematico, basato su "Modelli della Qualità". Il modello prevede che il lavoro di ciascuno si integri con quello degli altri attraverso modalità predefinite, gestite sistematicamente e sottoposte a riesame e miglioramento continuo. L'obiettivo è anche la redazione di un "Manuale della Qualità della Rete RNBIO" che, oltre a fornire un quadro d'insieme della rete e di come operano i suoi gruppi di lavoro, stabilisce i criteri e le procedure che i partner sono tenuti a seguire e, infine, presenta il funzionamento del sistema all'esterno.

Per quanto riguarda la formazione e l'aggiornamento, sono stati organizzati e tenuti vari tutorial e corsi. I corsi sono stati destinati in primis ai partner della rete, ma allargati al personale di tutti gli IRCCS. I tutorial hanno riguardato le tecnologie per il next generation sequencing, gli strumenti del Semantic Web (entrambi svolti nell'ambito di BITS 2009, 18-20 marzo 2009, Genova, e tenuti rispettivamente dalle Dott.sse Ciccarelli e De Grassi dell'IEO e dagli ingg. Romano, dell'ISTGE, e Splendiani di Rothamsted Research), gli strumenti di analisi dedicati all'RNA e gli strumenti informatici per lo sviluppo collaborativo (svolti in occasione di NETTAB 2009, 10-12 giugno 2009, Catania, e tenuti dal Dott. Laganà dell'Università di Catania, dalla Dott.ssa Rossi del CINECA e dall'ing. Romano dell'ISTGE). Il corso "Bioinformatica per la Proteomica" si è tenuto ad Avellino, presso l'ISA, dal 10 al 13 novembre 2009, responsabili scientifici il Dott. Facchiano ISA, e l'ing. Romano, ISTGE), mentre il corso "Analisi di dati di espressione genica generati con microarray", che si sta svolgendo all'ISTGE di Genova, responsabile scientifico il Dott. Pfeffer, ISTGE, si articola in due moduli, il primo già svolto dal 9 all'11 novembre 2009, il secondo in programma dal 30 novembre al 2 dicembre 2009.

Per il 2010 sono in programmazione corsi relativi all'analisi di dati per la "comparative genome hybridization" e SNP-array, alla strutturazione delle informazioni biologiche secondo gli strumenti del semantic web (entrambi a Genova, presso l'ISTGE), alla statistica per la bioinformatica (luglio 2010, INT, Milano), la "downstream analysis" per la gene expression e la

“Computational Intelligence” applicata alla biologia (date e sedi da definire). Si intende infine organizzare a Genova una riedizione del corso di bioinformatica per la proteomica.

Per quanto riguarda i gruppi di lavoro, la loro attività si è regolarmente avviata, anche se in maniera disomogenea e con risultati differenti, e l'accento è stato messo sul confronto delle esperienze e sulla formazione. Nel corso del prossimo anno si conta di arrivare a una maggior pianificazione dell'attività, anche grazie alla metodologia di Research Governance già citata. I gruppi attivati riguardano l'automazione dei processi d'analisi dei dati (responsabile l'ing. Romano, ISTGE), l'oncoproteomica (Dott. Facchiano, ISA), l'oncogenomica (Dott.ssa Marconi, CRO, e Dott. Lavorgna, HSR), i metodi statistici applicati alla bioinformatica (prof. Biganzoli, INT), l'analisi dati di *deep sequencing* (Dott.ssa Ciccarelli, IEO), la bioinformatica strutturale (Dott. Facchiano, ISA) e la bioinformatica clinica (Dott. Sangiorgi, IOR). Nell'ambito del gruppo di bioinformatica strutturale, è stato attivato un collegamento con il progetto ESFRI INSTRUCT, col quale collaboriamo sul tema di comune interesse della Biologia Strutturale Computazionale.

La rete è stata presentata ad alcuni convegni internazionali, in particolare a BITS 2009, Convegno della Società Italiana di Bioinformatica, 18-20 marzo 2009, Genova, e ISMB/ECCB 2009, meeting congiunto di Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB) e European Conference on Computational Biology, 27 giugno – 2 luglio 2009, Stoccolma. Un'occasione particolare è stata rappresentata dal workshop NETTAB 2009, 10-12 giugno 2009, Catania, dedicato alla ricerca e allo sviluppo collaborativi in bioinformatica, nell'ambito del quale sono state presentati i risultati della collaborazione della rete alla luce del software Plone.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Bacciu D, Biganzoli E, Lisboa PJG, Starita A. Are model-based clustering and neural clustering consistent? A case study from bioinformatics. *KES* 2008;2:181-8.
2. Bagnoli M, Ambrogio F, Pilotti S, Alberti P, Ditto A, Barbareschi M, Galligioni E, Biganzoli E, Canevari S, Mezzanzanica D. Long isoform cellular FLICE inhibitory protein expression defines two ovarian cancer patient subsets and is a prognostic factor of adverse outcome. *Endocr Relat Cancer* 2009;16(2):443-53.
3. Benedetti D, Bomben R, Dal-Bo M, Marconi D, Zucchetto A, Degan M, Forconi F, Del-Poeta G, Gaidano G, Gattei V. Are surrogates of IGHV gene mutational status useful in B-cell chronic lymphocytic leukemia? The example of Septin-10. *Leukemia* 2008;22(11):224-6.
4. Bevilacqua V, Chiarappa P, Mastronardi G, Menolascina F, Paradiso A, Tommasi S. Identification of tumour evolution patterns by means of inductive logic programming. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* 2008;6(2):91-7.
5. Bevilacqua V, Pannarale P, Mastronardi G, Azzariti A, Tommasi S, Menolascina F, Iorio F, Di Bernardo D, Paradiso A, Colabufo NA, Berardi F, Perrone R, Tagliaferri R. High-throughput analysis of the drug mode of action of PB28, MC18 and MC70, three cyclohexylpiperazine derivative new molecules. In: Huang D-S, et al. (Ed.). *Advanced intelligent computing theories and applications with aspects of contemporary intelligent computing techniques: 4th International Conference on Intelligent Computing, ICIC 2008, Shanghai (China); September 2008. Proceedings*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2008. p. 1085-92.
6. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Forconi F, Maffei R, Laurenti L, Rossi D, Del Principe MI, Zucchetto A, Bertoni F, Rossi FM, Bulian P, Cattarossi I, Ilariucci F, Sozzi E, Spina V, Zucca E, Degan M, Lauria F, Del PG, Efremov G, Marasca R, Gaidano G, Gattei V. Molecular and clinical

- features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. *Br J Haematol* 2009;144(4):492-506.
7. Bulian P, Gaidano G, Del PG, Gattei V. CD49d expression in chronic lymphocytic leukemia: a prognostic parameter and a therapeutic target. *Future Oncology* 2008;4(3):355-8.
8. Burger A, Romano P, Paschke A, Splendiani A. Semantic web applications and tools for life sciences, 2008 (Preface). *BMC Bioinformatics* 2009;10(10):S1.
9. Cappuzzello C, Napolitano M, Arcelli D, Melillo G, Melchionna R, Di Vito L, Carlini D, Silvestri L, Brugaletta S, Liuzzo G, Crea F, Capogrossi MC. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiol Genomics* 2009;38(3):233-40.
10. Caprini E, Cristofaletti C, Arcelli D, Fadda P, Citterich MH, Sampogna F, Magrelli A, Censi F, Torrerri P, Frontani M, Scala E, Picchio MC, Temperani P, Monopoli A, Lombardo GA, Taruscio D, Narducci MG, Russo G. Identification of key regions and genes important in the pathogenesis of sezary syndrome by combining genomic and expression microarrays. *Cancer Res* 2009;69(21):8438-46.
11. Ceccarelli M, d'Acerno A, Facchiano A. A scale space approach for unsupervised feature selection in mass spectra classification for ovarian cancer detection. *BMC Bioinformatics* 2009;10(12):S9.
12. Corradi L, Mirisola V, Porro I, Torterolo L, Fato M, Romano P, Pfeffer U. Survival Online: a web-based service for the analysis of correlations between gene expression and clinical and follow-up data. *BMC Bioinformatics* 2009;10(12):S10.
13. Costantini S, Colonna G, Facchiano AM. FASMA: a service to format and analyze sequences in multiple alignments. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2007;5(3-4):253-5.
14. Costantini S, Facchiano AM. Prediction of the protein structural class by specific peptide frequencies. *Biochimie* 2009;91:226-9.
15. Costantini S, Paladino A, Facchiano AM. CALCOM: A software for calculating the center of mass of proteins. *Bioinformation* 2008;2(7):271-2.
16. Dal Bo M, Bretoni F, Forconi F, Zucchetto A, Bomben R, Marasca R, Deraglio S, Laurenti L, Efremov DG, Gaidano G, Del PG, Gattei V. Intrinsic and extrinsic factors influencing the clinical course of B-cell chronic lymphocytic leukemia: prognostic markers with pathogenetic relevance. *J Transl Med* 2009;7:76.
17. Facchiano A, Facchiano F. Transglutaminases and their substrates in biology and human diseases: 50 years of growing. *Amino Acids* 2009;36(4):599-614.
18. Faraone D, Aguzzi MS, Toietta G, Facchiano AM, Facchiano F, Magenta A, Martelli F, Truffa S, Cesareo E, Ribatti D, Capogrossi MC, Facchiano A. Platelet-derived growth factor-receptor alpha strongly inhibits melanoma growth *in vitro* and *in vivo*. *Neoplasia* 2009;11:732-42.
19. Farina A, Morano D, Arcelli D, De Sanctis P, Sekizawa A, Purwosunu Y, Zucchini C, Simonazzi G, Okai T, Rizzo N. Gene expression in chorionic villous samples at 11 weeks of gestation in women who develop preeclampsia later in pregnancy: implications for screening. *Prenat Diagn* 2009;29(11):1038-44.
20. Fernandes AS, Jarman IH, Etchells TA, Fonseca JM, Biganzoli E, Bajdik C, Lisboa PJG Stratification methodologies for neural networks models of survival. In: Cabestany J, Sandoval F, Prieto A, Corchado JM (Ed.). *Bio-inspired systems: computational and ambient intelligence, 10th International Work-Conference on Artificial Neural Networks, IWANN 2009, Salamanca, Spain, June 10-12, 2009. Proceedings, Part I*. Berlin / Heidelberg: Springer 2009. (Lecture Notes in Computer Science 5517). p. 989-96.
21. Forconi F, Rinaldi A, Kwee I, Sozzi E, Raspadori D, Rancoita PM, Scandurra M, Rossi D, Deambrogi C, Capello D, Zucca E, Marconi D, Bomben R, Gattei V, Lauria F, Gaidano G, Bertoni

- F. Genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion. *Br J Haematol* 2008;143(4):532-6.
22. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, Bomben R, Dal-Bo M, Luciano F, Rossi FM, Degan M, Amadori S, Del PG. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;111(2):865-73.
 23. Green AR, Garibaldi JM, Soria D, Ambrogi F, Powe DG, Ball G, Lisboa P, Boracchi P, Biganzoli E, Ellis IO. Identification of key breast cancer phenotypes. *European Journal of Cancer* 2008;6(7):183.
 24. Green AR, Garibaldi JM, Soria D, Ambrogi F, Powe DG, Ball G, Lisboa P, Boracchi P, Biganzoli E, Ellis IO. Identification of Novel clinical phenotypes of breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern Pathology* 2008;21:34a.
 25. Green AR, Garibaldi JM, Soria D, Ambrogi F, Powe DG, Ball G, Lisboa P, Boracchi P, Biganzoli E, Ellis IO. Identification and definition of novel clinical phenotypes of breast cancer through consensus derived from automated clustering methods. *Breast Cancer Research* 2008;10:S36.
 26. Lacal PM, Tentori L, Muzi A, Ruffini F, Dorio AS, Xu W, Arcelli D, Zhang J, Graziani G. Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity down-regulates the expression of syndecan-4 and Id-1 in endothelial cells. *Int J Oncol* 2009;34(3):861-72.
 27. Levati L, Alvino E, Pagani E, Arcelli D, Caporaso P, Bondanza S, Di Leva G, Ferracin M, Volinia S, Bonmassar E, Croce CM, D'Atri S. Altered expression of selected microRNAs in melanoma: antiproliferative and proapoptotic activity of fmiRNA-155. *Int J Oncol* 2009;35(2):393-400.
 28. Lisboa PJG, Etchells TA, Jarman IH, Arsene CT, Aung MS, Eleuteri A, Taktak AF, Ambrogi F, Boracchi P, Biganzoli E. Partial logistic artificial neural network for competing risks regularized with automatic relevance determination. *IEEE Trans Neural Netw* 2009;20(9):1403-16.
 29. Lisboa PJG, Jarman IH, Etchells TA, Ambrogi F, Ardoino I, Vignetti M, Biganzoli E. Short-Term Time-to-Event Model of Response to Treatment Following the GIMEMA Protocol for Acute Myeloid Leukemia. In: Masulli F, Micheli A, Sperduti A (Ed.). *Computational intelligence and bioengineering. Essays in Memory of Antonina Starita*. Amsterdam: IOS press; 2009. (Volume 196 Frontiers in Artificial Intelligence and Applications).
 30. Marabotti A, Facchiano A. When it comes to homology, bad habits die hard. *Trends Biochem Sci* 2009;34:98-99.
 31. Marabotti A, Spyarakis F, Facchiano A, Cozzini P, Alberti S, Kellogg GE, Mozzarelli A. Energy-based prediction of amino acid-nucleotide base recognition. *J Comput Chem* 2008;29(12):1955-69.
 32. Marabotti A. Modeling the conformation of side chains in proteins: approaches, problems and possible developments. *Current Chemical Biology* 2008;2:200-14.
 33. Menolascina F, Alves RT, Tommasi S, Chiarappa P, Delgado M, Bevilacqua V, Mastronardi G, Freitas A, Paradiso A. Fuzzy rule induction and artificial immune systems in female breast cancer familiarity profiling. *The International Journal of Hybrid Intelligent Systems* 2008;5(3):161-5.
 34. Menolascina F, Bellomo D, Maiwald T, Bevilacqua V, Ciminelli C, Paradiso A, Tommasi S. Developing optimal input design strategies in cancer systems biology with applications to microfluidic device engineering. *BMC Bioinformatics* 2009;10(12):S4-S17.
 35. Menolascina F, Bevilacqua V, Zarrilli M, Mastronardi G. Induction of fuzzy rules by means of artificial immune systems in bioinformatics. In: Jin Y, Wang L (Ed.). *Fuzzy systems in bioinformatics, bioengineering and computational biology*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2009. p. 1-18.
 36. Miele M, Zappa A, Romano P. Transcription factors involved in the maintenance of stem cells: comparative analysis among eucaryotes. In: Bordo D, Masulli F, Muselli M, Romano P (Ed.).

- Proceedings of BITS 2009, 6th Annual Meeting of the Bioinformatics Italian Society, March 18-20, 2009, Genova, Italy.* Genova: Liberodiscrivere edizioni; 2009
37. The LIBI Grid Platform Developers (Mirto M, Epicoco I, Fiore S, Cafaro M, *et al.* incl. Lavorgna G). The LIBI Grid Platform for Bioinformatics. In: Cannataro M (Ed.). *Handbook of research on computational grid technologies for life sciences, biomedicine, and healthcare*, Medical Information Science Reference; 2009. cap. 29.
 38. Monaco A, Menolascina F, Zhao Y, Tommasi S, Sabatino M, Fasano R, Paradiso A, Marincola FM and Wang E. "Sequencing-grade" screening for BRCA1 variants by oligo-arrays. *J Transl Med* 2008;6:64.
 39. Monti L, Cinquetti R, Guffanti A, Nicassio F, Cremona M, Lavorgna G, Bianchi F, Vignati F, Cittaro D, Taramelli R, Acquati F. In silico prediction and experimental validation of natural antisense transcripts in two cancer-associated regions of human chromosome 6. *Int J Oncol* 2009;34(4):1099-108.
 40. Mutarelli M, Cicatiello L, Ferraro L, Grober OM, Ravo M, Facchiano AM, Angelini C, Weisz A. Time-course analysis of genome-wide gene expression data from hormone-responsive human breast cancer cells. *BMC Bioinformatics* 2008;9(2):S12.
 41. Orfanelli U, Wenke AK, Doglioni C, Russo V, Bosserhoff AK, Lavorgna G. Identification of novel sense and antisense transcription at the TRPM2 locus in cancer. *Cell Res* 2008;18(11):1128-40.
 42. Rambaldi D, Ciccarelli FD. FancyGene: dynamic visualization of gene structures and protein domain architectures on genomic loci. *Bioinformatics* 2009;25:2281.
 43. Rambaldi D, Giorgi FM, Capuani F, Ciliberto A, Ciccarelli FD. Low duplicability and network fragility of cancer genes. *Trends Genet* 2008;24(9):427-30.
 44. Romano P, Crescenzi M. Rete Nazionale di Bioinformatica Oncologica (RNBIO). In: Belardelli F, Romero M, Moretti F. (Ed.). *Programma Straordinario Oncologia 2006. Art. 3 "Rete nazionale solidale e collaborazioni internazionali (ISS per ACC)". Consuntivo dell'attività scientifica (2007-2008)*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009. (Rapporti ISTISAN 09/1). p. 63-8.
 45. Romano P, Marra D. SWS: accessing SRS sites contents through Web Services. *BMC Bioinformatics* 2008;9(2):S15.
 46. Romano P, Parodi S, Crescenzi M. The Italian Network for Oncology Bioinformatics: goals, methodology and achievements. In: Bordo D, Masulli F, Muselli M, Romano P (Ed.). *Proceedings of BITS 2009, 6th Annual Meeting of the Bioinformatics Italian Society, March 18-20, 2009, Genova, Italy.* Genova: Liberodiscrivere edizioni; 2009.
 47. Romano P, Splendiani A. Applications of semantic web methodologies and techniques to biology and bioinformatics. Baroglio C *et al.* (Ed.). *Reasoning Web 2008*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 2008. (Lecture Notes in Computer Sciences 5224).p. 200-39
 48. Romano P. Automation of in-silico data analysis processes through workflow management systems. *Briefings in Bioinformatics* 2008 9(1):57-68.
 49. Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, De Paoli L, Cresta S, Rasi S, Spina V, Franceschetti S, Lunghi M, Vendramin C, Bomben R, Ramponi A, Monga G, Conconi A, Magnani C, Gattei V, Gaidano G. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 2008;142(2):202-15.
 50. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, De Paoli L, Spina V, Gattei V, Capello D, Forconi F, Lauria F, Gaidano G. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 2009;15(3):995-1004.

51. Rossi D, De Paoli L, Rossi FM, Cerri M, Deambrogi C, Rasi S, Zucchetto A, Capello D, Gattei V, Gaidano G. Early stage chronic lymphocytic leukaemia carrying unmutated IGHV genes is at risk of recurrent infections during watch and wait. *Br J Haematol* 2008;141(5):734-6.
52. Rossi D, Spina V, Cerri M, Rasi S, Deambrogi C, De Paoli L, Laurenti L, Maffei R, Forconi F, Bretoni F, Zucca E, Agostinelli C, Cabras A, Ludioni M, Martini M, Magni M, Deraglio S, Ladetto M, Nomdedeu JF, Besson C, Ramponi A, Canzonieri V, Paulli M, Marasca R, Larocca LM, Carbone A, Pileri SA, Gattei V, Gaidano G. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res* 2009;15(13):4415-22.
53. Rossi D, Zucchetto A, Rossi FM, Capello D, Cerri M, Deambrogi C, Cresta S, Rasi S, De PL, Lobetti BC, Bulian P, Del PG, Ladetto M, Gattei V, Gaidano G. CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2008;93(10):1575-9.
54. Santarpia L, Sherman SI, Marabotti A, Clayman GL, El-Naggar AK. Detection and molecular characterization of a novel BRAF activated domain mutation in follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 2009;40:827-833.
55. Secchiero P, di Iasio MG, Melloni E, Voltan R, Celeghini C, Tiribelli M, Dal Bo M, Gattei V, Zauli G. The expression levels of the pro-apoptotic XAF-1 gene modulate the cytotoxic response to Nutlin-3 in B chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009 Oct 22 (online prima della stampa). prima della stampa).
56. Secchiero P, Melloni E, di Iasio MG, Tiribelli M, Rimondi E, Corallini F, Gattei V, Zauli G. Nutlin-3 up-regulates the expression of Notch1 in both myeloid and lymphoid leukemic cells, as part of a negative feedback antiapoptotic mechanism. *Blood* 2009;113(18):4300-8.
57. Soria D, Garibaldi JM, Ambrogi F, Boracchi P, Raimondi E, Biganzoli E. Cancer profiles by affinity propagation. *International Journal of Knowledge Engineering and Soft Data Paradigms (IJKESDP)* 2009;1(3):195-215.
58. Soria D, Garibaldi JM, Biganzoli E, Ellis IO. A comparison of three different methods for classification of breast cancer data. In: *Proceedings of the Seventh International Conference on Machine Learning and Applications (ICMLA08)*, IEEE Computer Society, 2008. p. 619-24.
59. Vellido A, Biganzoli E, Lisboa PJG. Machine learning in cancer research: implications for personalised medicine. In: *Proceedings of ESANN 2008*, 16th European Symposium on Artificial Neural Networks, Bruges, Belgium, April 23-25, 2008. p. 55-64.
60. Zauli G, di Iasio MG, Secchiero P, Dal Bo M, Marconi D, Bomben R, Del PG, Gattei V. Exposure of B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells to nutlin-3 induces a characteristic gene expression profile, which correlates with nutlin-3-mediated cytotoxicity. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9(4):510-8.
61. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D, Bossi F, Lorenzon D, Degan M, Rossi FM, Rossi D, Bulian P, Franco V, Del PG, Deaglio S, Gaidano G, Tedesco F, Malavasi F, Gattei V. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* 2009;69(9):4001-9.

RETE NAZIONALE TELEPATOLOGIA (TESEO)

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

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

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

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

Obiettivi secondari del progetto sono:

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

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

2. *Controllo di qualità*

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

3. *Ricerca oncologica e impatto internazionale*

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

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

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

5. *Histological Clinical Repository*

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione del Rete Nazionale Telepatologia (TESEO)

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Nell'ambito del progetto "Rete Nazionale di Telepatologia (TESEO)", i Coordinatori hanno indirizzato l'attività del Consorzio di Bioingegneria e Informatica Medica di Pavia (CBIM) verso la progettazione e l'implementazione di soluzioni applicative per la gestione dei seguenti due aspetti:

- a. *Interoperabilità tra diversi sistemi di microscopia virtuale*
la presenza sul mercato nazionale di più fornitori di strumenti di microscopia virtuale ha comportato la necessità di rendere il sistema di Second Opinion del progetto TESEO indipendente dagli stessi.
- b. *Histological Clinical repository*
l'utilizzo del sistema ha imposto la realizzazione di un repository finalizzato alla gestione di dati clinici strutturati da associare all'immagine digitale e all'interconnessione con altre banche dati istologiche. È stato realizzato, inoltre, un apposito motore di ricerca finalizzato alla consultazione avanzata dei casi inseriti.

Nel corso del progetto i Coordinatori hanno inoltre ravvisato l'esigenza di valutare due differenti linee progettuali:

- a. Collaborazione della rete TESEO con la Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia diagnostica (SIAPEC) per finalità didattiche.
- b. Connessione della rete TESEO con reti regionali (Regione Sardegna, Regione Calabria, ecc.).

Prima di elencare le attività compiute nell'anno, occorre citare brevemente alcuni dati tecnici. Il sistema Dot.Slide, prodotto da Olympus, recentemente aggiornato con le ultime modifiche e migliorie, si compone di un complesso hardware e uno specifico software, in grado di acquisire immagini digitali da preparati istologici mediante un processo in larga parte automatizzato. Il sistema si avvale di un microscopio Olympus dotato di una camera digitale a colori ad alta risoluzione (1376 x 1032 pixel) e torretta motorizzata (BX-REMCB) con 4

obiettivi (2X, 10X, 20X e 40X) che può essere comandata a distanza dal software. Questo è installato su una workstation appositamente dedicata alla scansione di vetrini, collegata a due monitor LCD sincronizzati. Una rilevante peculiarità del sistema Dot.Slide è la possibilità di scannerizzare automaticamente fino a 50 vetrini, grazie allo Slide Loader. Così, il processo di acquisizione può essere completamente automatizzato.

Il sistema Dot Slide nella sua versione attuale, è operativo per la sua connessione fra i centri del Network a partire dal 1° agosto 2009, dopo la necessaria reinstallazione del sistema precedente (Dot Slide Old).

Per le attività di scansione dei preparati, di seguito riportata, è stata utilizzata la versione già in dotazione delle Unità Operative (UO) (indicata come Dot Slide New).

Attività:

- Partecipazione alla discussione di casi di *second opinion* inseriti dai vari Centri (tutte le UO).
- Progetto di controllo qualità per Dual color SISH (UO INT Milano);
- Verifica della clonalità Kappa/Lambda su biopsie osteomidollari allestite con ibridazione in situ in campo chiaro (UO INT Milano);
- Studio di fattibilità per un progetto di controllo di qualità nell'interpretazione di preparati di carcinoma della mammella, allestiti con metodica CISH per lo studio dell'amplificazione genica di HER2 (UO INT Milano);
- Analisi quantitativa di apoptosi, necrosi e vascolatura tumorale in seguito a vari trattamenti (UO INT Milano);
- Produzione di n. 25 vetrini citologici digitali di preparati in unico esemplare, richiesti per "second opinion" da altre Strutture (UO Pascale Napoli);
- Scansione di n. 45 casi citologici di preparati richiesti da Strutture Esterne per consulenza, in prevalenza in monostrato e in unico esemplare (Dot Slide New) (UO Ospedale Oncologico di Bari);
- Scansione di n. 5 casi citologici di preparati in monostrato, richiesti da Strutture Esterne per consulenza. Scansione di n° 4 casi istologici di preparati immunoistochimici di HER/2-Neu per inserimento in rete, in relazione al controllo di qualità del marker previsto tra gli obiettivi del Network (UO Ospedale Oncologico di Bari);
- Allestimento e organizzazione di archivio microfotografico per attività di scientifica e didattica: Allo stato contiene circa 300 immagini (UO Ospedale Oncologico di Bari).
- Nel corso dell'anno, inoltre, è stata incrementata la casistica dell'archivio digitale di immagini istologiche che potranno essere utilizzate per attività didattica, di ricerca, di consultazione e di controllo di qualità, per la formazione (a distanza e ECM) e per le esperienze di concordanza diagnostica come base di linea guida. Oltre ad una serie di casi rari selezionati per il loro peculiare interesse e particolare valore educativo in ambito diagnostico, sono stati inseriti anche casi che rappresentano le nuove entità recentemente incluse nella nuova classificazione dei tumori del sistema nervoso della WHO del 2007, come casi di riferimento per confronto diagnostico (es. il tumore glioneuronale formante rosette del IV ventricolo o il tumore papillare glioneuronale) (UO Istituto Neurologico Besta).
- L'UO dell'Istituto Europeo di Oncologia funge da laboratorio centrale di riferimento per uno studio clinico randomizzato di fase III, nel quale viene valutata la efficacia terapeutica nella fase adiuvante di due diversi trattamenti anti-HER2 per pazienti operate di carcinoma della mammella. Lo studio è internazionale e recluta pazienti da molti diversi Paesi del mondo. Perché le pazienti vengano arruolate, è necessaria la conferma della HER2 positività della neoplasia (in accordo ai criteri ASCO/CAP) da parte del

laboratorio centrale. Finora sono stati raccolti circa 50 casi, che potranno essere digitalizzati e immessi nella rete nazionale di tele patologia, affinché tutti i partecipanti alla rete possano confrontare i risultati della colorazione locale e di quella centrale, e contribuire ad identificare le cause più probabili della discordanza (UO IEO Milano).

- L'UO di Anatomia Patologica dell'Ospedale San Raffaele, pur non disponendo di un sistema di acquisizione di immagini integrato nella Rete Nazionale, dopo aver selezionato nello scorso anno e messo a disposizione della rete una ampia casistica di tumori pancreatici, in particolare di istotipi rari e inusuali, ha raccolto una ampia serie di neoplasie cerebrali (UO San Raffaele Milano).
- Nell'ottica dell'ampliamento a livello europeo delle esperienze di telepatologia, la metodica è stata estesa ad una valutazione di fattibilità di un collegamento in rete tra Paesi dell'area balcanica, candidati e potenziali candidati a far parte dell'UE (UO CRO Aviano).

Quali prodotti scientifici dell'anno, si segnalano :

- Lo slide seminar "Clinical cases in virtual microscopy", svoltosi presso l'Istituto Nazionale Tumori di Napoli, nell'ambito del Corso Teorico-Pratico "Problems in Surgical Pathology- Hepato Biliary Tumors" (Napoli, 12-13 marzo 2009);
- Produzione di vetrini istologici virtuali (n. 6 casi) nell'ambito del controllo di qualità nazionale (previsto tra gli obiettivi del Network) sulla valutazione immunoistochimica dell'HER2/neu nel carcinoma mammario.

RETE NAZIONALE PER LA CURA E LA RICERCA DEI SARCOMI MUSCOLOSCHIELETRICI

Piero Picci

Dipartimento di Oncologia Muscoloscheletrica, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi del progetto sono:

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

Proponente (<i>Cordinatori della rete</i>)	Ente di appartenenza dell'Unità Operativa	Responsabile scientifico dell'Unità Operativa
IOR (<i>Piero Picci</i>)	IOR	Piero Picci
	IOR	Stefano Ferrari

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

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

Nel corso del secondo anno di attività è stato creato un database ISG che consente un accesso remoto dei dati relativi ai pazienti inseriti nei protocolli ISG. Tale database risiede nell'area riservata del sito web dell'ISG (www.italiansarcomagroup.org)

Il database raccoglie i dati relativi ai seguenti protocolli: ISG OS Oss, ISG/AIEOP EW1, ISG/AIEOP EW 2, RISOR.

Il panel di anatomopatologi con il compito di revisione delle diagnosi istologiche dei pazienti con sarcomi ossei inseriti nei protocolli ISG è composto dal Dott. Marco Alberghini, IOR Bologna, Dott.ssa A. Parafioriti, G. Pini Milano, Dott. A Franchi Università di Firenze, Dott.ssa A. Linari OIRM Torino. Il panel si è riunito periodicamente per sottoporre a revisione i pazienti inseriti nel protocollo ISG per l'osteosarcoma non metastatico delle estremità ISG/OS-1.

È stato attivato il protocollo ISG/AIEOP EW 1 di trattamento per il sarcoma di Ewing non metastatico. Studio randomizzato che confronta due protocolli a diversa intensità di dose. Allo studio partecipano le principali istituzioni italiane sia pediatriche che di oncologia degli adulti del territorio nazionale.

È stato attivato il protocollo ISG/AIEOP EW 2 di trattamento per il sarcoma di Ewing metastatico. Studio randomizzato che confronta due protocolli a diversa intensità di dose. Allo

studio partecipano le principali istituzioni italiane sia pediatriche che di oncologia degli adulti del territorio nazionale.

È stato definito il Registro Italiano dei Sarcomi Ossei in Ricaduta (RISOR). Il registro raccoglierà dati su pattern di ricaduta, trattamento e sopravvivenza dopo la ricaduta di pazienti con sarcomi ossei.

Si è tenuta nel marzo 2009 una conferenza di consenso per la definizione di raccomandazioni cliniche per il trattamento dell'osteosarcoma. Il documento di consenso è stato distribuito ai centri aderenti all'ISG ed è disponibile liberamente al sito www.italiansarcomagroup.org/.

Nel corso del 2010 è in preparazione una conferenza nazionale di consenso per il sarcoma di Ewing.

PROGRAMMA 3

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

Coordinatori

Filippo Belardelli, Pier Giuseppe Pelicci

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

Alberto Mantovani

Direzione Scientifica, Istituto Clinico Humanitas, Rozzano, Milano

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

Il programma si articola seguendo diverse linee di ricerca:

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

Proponente (Coordinatore del progetto)	Unità Operativa (UO) (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
Humanitas (Alberto Mantovani)	UO1 (Humanitas: Alberto Mantovani)	Humanitas	Alberto Mantovani
		Humanitas	Luigi Laghi
		Humanitas	Marco Montorsi
		Centro M. Tettamanti	Andrea Biondi
		Ospedali Riuniti di Bergamo	Alessandro Rambaldi
		HSR	Angelo Manfredi
	UO2 (INT: Silvana Canevari)	Università di Roma Tor Vergata	Sabina Pucci
		INT	Silvana Canevari
	UO3 (ITB: Girolamo Ranieri)	INT	Maria Grazia Borrello
		ITB	Girolamo Ranieri
		Università di Bari	Angelo Vacca

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

L'attività di ricerca del secondo anno per il destinatario IRCCS Istituto Clinico Humanitas si è sviluppata secondo varie linee afferenti alle diverse unità.

Pentraxin-3 (PTX-3) è una proteina di fase acuta indotta dalle citochine infiammatorie TNF/IL-1, con un ruolo rilevante nella risposta immunitaria e infiammatoria; PTX3 è stata studiata quale potenziale nuovo marcatore prognostico.

In collaborazione con la UO Mantovani, sono stati misurati i livelli plasmatici di PTX3 in pazienti con neoplasie ematologiche. La Policitemia Vera e la Trombocitemia Essenziale sono neoplasie mieloproliferative croniche. La storia clinica di questi pazienti è gravata da alta incidenza di gravi complicazioni vascolari. I dosaggi di PTX3 nel siero di questi pazienti sono significativamente più elevati che nella popolazione sana (UO Rambaldi). Studi paralleli avevano lo scopo di misurare PTX3 in pazienti leucemici sottoposti a trapianto di midollo. Un notevole incremento dei livelli plasmatici di PTX3 si è riscontrato nei pazienti che hanno sviluppato *Graft Versus Host Disease* (GVHD) acuta o con riattivazioni (*flair-up*) della GVHD cronica (UO Biondi). I risultati suggeriscono che PTX3 possa essere utilizzato in neoplasie ematologiche quale biomarcatore di complicanze immunologiche/infiammatorie.

La proteina infiammatoria PTX3 è stata inoltre dosata nel liquido ascitico di soggetti con carcinoma dell'ovaio, trovando livelli molto più elevati che in circolo ed è in corso di studio in un modello murino di tumore ascitogeno (UO Manfredi).

Un'altra linea di lavoro originale si focalizza sulla molecola TIR8, un componente della trasduzione del segnale dei recettori dell'immunità innata (IL-1 e Toll like 4), con attività regolatrice inibitoria, espressa prevalentemente nell'epitelio intestinale. La UO Mantovani ha caratterizzato il ruolo di regolatore negativo della molecola TIR8/SIGIRR nei processi infiammatori, e ha descritto che i topi privi di TIR8 sono più suscettibili di infiammazione intestinale e di cancro indotto da colite.

In collaborazione con la UO Laghi il polimorfismo del gene *Tir8* è stato studiato negli individui sani e in pazienti con malattia (*inflammatory bowel disease*). La UO Laghi ha inoltre monitorato la densità di linfociti T CD3+ che infiltrano il carcinoma del colon-retto umano, trovando una importante associazione tra numero di linfociti e prognosi più favorevole. Nel microambiente tumorale è presente un network complesso di chemochine e recettori.

La UO Mantovani ha dimostrato che il recettore CX3CR1 è coinvolto nel processo di invasione e metastatizzazione del tumore umano del pancreas lungo le fibre nervose. Inoltre, in collaborazione con l'UO Laghi, si è stabilito che CX3CR1 è già espresso nei tessuti pre-neoplastici (PanIN), indicandolo come marker potenziale e precoce di cancro pancreatico. Più recentemente il recettore CX3CR1 e il suo ligando CX3CL1, sono studiati anche nel il carcinoma del colon-retto correlando la loro espressione con l'infiltrato leucocitario. In collaborazione con la UO Montorsi è stato studiato un vasto numero di mediatori infiammatori per verificare l'effetto dello stress chirurgico (laparoscopia contro *open surgery*) nel risultato clinico dei pazienti con cancro coloretale. Infine è stato studiato il ruolo del *clustering* molecolare indotto da IL-6 nel cancro coloretale umano (UO Spagnoli/Pucci).

L'attività di ricerca di IRCCS-INT nel secondo anno si è sviluppata in modo congiunto tra le due unità partecipanti. Tramite l'applicazione di meta-analisi di *loop* autocrini ligando-recettore e la validazione di espressione in una casistica clinica e in linee cellulari, ha consentito di ipotizzare un possibile ruolo di EGFR nella carcinogenesi tiroidea (UO Borrello) e ovarica (UO Canevari). I principali argomenti di ricerca hanno riguardato l'attivazione di EGFR in questi tumori e il suo possibile ruolo quale co-protagonista nell'attivazione di programmi pro-

infiammatori, e il cross-talk tra tirosin-chinasi recettoriali attivate e oncogeni o recettori chemochinici. Nel carcinoma dell'ovaio è stato identificato che: l'attivazione di EGFR in modelli cellulari induce le vie di segnalazione PI3K/AKT/NF- κ B con conseguente rilascio di IL-6; a livello della membrana cellulare esiste una co-localizzazione tra EGFR e CXCR4 e che l'inibizione della trans-fosforilazione di EGFR è accompagnata da una diminuzione di espressione proteica di CXCR4.

Nel carcinoma della tiroide è stato dimostrato che: il *signaling* di RET/PTC1 e quello di MET, da esso indotto, cooperano per promuovere il fenotipo pro-invasivo della cellula tiroidea trasformata; il loop autocrino EGFR/TGF α è modulato positivamente dall'oncogene RET/PTC1 e che la via di segnale di ERK, sembra necessaria per la modulazione.

Le attività riguardanti il destinatario IRCCS Istituto Tumori "Giovanni Paolo II" hanno interessato lo studio dell'angiogenesi del micro ambiente tumorale in neoplasie solide ed ematologiche. La UO Ranieri ha studiato il ruolo dei mastociti produttori VEGF e triptasi, nel *pathway* angiogenetico tumorale in un modello di mastocitoma canino, in una casistica di pazienti con carcinoma mammario, e nel linfoma non-Hodgkin. I dati ottenuti indicano che il VEGF presente nel tessuto tumorale è correlato con la densità microvasale e con il grado di malignità del linfoma. La UO Vacca ha focalizzato il suo interesse sui meccanismi fisiopatologici alla base dei circuiti favorenti l'angiogenesi e la vasculogenesi nei pazienti con mieloma multiplo (MM). Per la differenziazione endoteliale delle cellule staminali midollari dei pazienti con MM si è dimostrato le cellule CD133+ nella parete dei neovasi hanno doppia positività per FVIII-RA, VEGFR-2, Tie2/Tek, e VE-caderina. Questi dati indicano che i precursori midollari collaborano attivamente alla neovascolarizzazione del MM. Relativamente alla partecipazione dei macrofagi e dei mastociti alla vasculogenesi midollare è stato dimostrato il loro coinvolgimento nella neovascolarizzazione in presenza delle citochine VEGF-A ed FGF-2 e l'up-regolazione di antigeni endoteliali (FVIII-RA, VEGFR-2, Tie2/Tek, VE-caderina) formando reti vascolari sul Matrigel. Per ciò che concerne l'individuazione di nuovi target terapeutici sono stati individuati 22 geni differenzialmente espressi nelle cellule endoteliali di MM rispetto a quelle di gammopatie monoclonali. Inoltre, sono stati trovati differenti profili di geni che possono influenzare il rimodellamento del microambiente midollare, la sintesi del collagene, l'adesione alla matrice extracellulare, la crescita e l'apoptosi.

Per quanto riguarda lo studio dell'attività anti-angiogenica di farmaci impiegati nel trattamento del MM è stato dimostrato che bortezomib e acido zoledronico svolgono effetti diretti sulla differenziazione endoteliale dei macrofagi midollari. È stato inoltre dimostrato che l'attività antitumorale/antivascolare di dasatinib, inibitore specifico delle tirosinokinas PDGF-Rbeta/Src, è sinergica con altre molecole convenzionalmente impiegate nel trattamento del MM, quali melphalan, prednisone, bortezomib e thalidomide.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18(1):3-10.
2. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 2008;222:155-61.
3. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66(1):1-9.

4. Barbui T, Carobbio A, Rambaldi A, Finazzi G. Perspectives on thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: is leukocytosis a causative factor? *Blood* 2009;114(4):759-63.
5. Biagi E, Col M., Migliavacca M, Dell'Oro M, Silvestri D, Montanelli A, Peri G, Mantovani A, Biondi A and Rossi MR. PTX3 as a potential novel tool for the diagnosis and monitoring of pulmonary fungal infections in immuno-compromised pediatric patients. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008;30(12):881-5.
6. Bonanno E, Rulli F, Galatà G, Pucci S, Sesti F, Farinon AM, Spagnoli LG. Stool test for colorectal cancer screening: what is going on? *Surg Oncol* 2007;16:S43-5.
7. Borrello MG, Degl'innocenti D, Pierotti MA. Inflammation and cancer: the oncogene-driven connection. *Cancer Lett* 2008 267:262-70.
8. Carobbio A, Antonioli E, Guglielmelli P, *et al.* Leukocytosis and Risk Stratification Assessment in Essential Thrombocythemia. *J Clin Oncol* 2008;26(16):2732-6.
9. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, *et al.* JAK2V617F allele burden and thrombosis: A direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol* 2009;37(9):1016-21.
10. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, *et al.* Thrombocytosis and leukocytosis interaction in vascular complications of essential thrombocythemia. *Blood* 2008;112:3135-7.
11. Cassinelli G, Favini E, Degl'Innocenti D, Salvi A, De Petro G, Pierotti MA, Zunino F, Borrello MG, Lanzi C. RET/PTC1-driven neoplastic transformation and proinvasive phenotype of human thyrocytes involve Met induction and beta-catenin nuclear translocation. *Neoplasia* 2009;11:10-21.
12. Coluccia AML, Cirulli T, Neri P, Mangieri D, Colanardi MC, Gnoni A, Di Renzo N, Tassone P, Ribatti D, Dammacco F, Gambacorti-Passerini C, Vacca A. Validation of PDGFR β and c-Src tyrosine kinases as tumor/vessel targets in patients with multiple myeloma: preclinical efficacy of the novel, orally available inhibitor dasatinib (BMS-354825/Sprycel®). *Blood* 2008;112:1346-56.
13. Dander E, Cuccovillo I, Vinci P, Bonanomi S, Di Maio L, Lucchini G, Migliavacca M, Perseghin P, Rovelli A, Balduzzi A, Mantovani A, Bottazzi B, Biondi A, D'Amico G. Pentraxin-3: Un marcatore solubile di facile misurazione utile per predire e monitorare la Graft versus Host Disease post-trapianto. I Congresso AIEOP in lab, 22-23 ottobre 2009. *Pediatric Reports* 2009;1:s1.
14. De Luisi A, Mangialardi G, Ria R, Acuto G, Ribatti D, Vacca A. Antiangiogenic activity of carebastine: a plausible mechanism affecting airway remodelling. *Eur Resp J* 2009 (in corso di stampa).
15. Di Comite G, Previtali P, Rossi CM, Dell'Antonio G, Rovere-Querini P, Praderio L, Dagna L, Corti A, Doglioni C, Maseri A, Sabbadini MG, Manfredi AA. High blood levels of chromogranin A in giant cell arteritis identify patients refractory to corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis* 2009;68(2):293-5.
16. Di Comite G, Rossi CM, Marinosci A, Lolmede K, Baldissera E, Aiello P, Mueller RB, Herrmann M, Voll RE, Rovere-Querini P, Sabbadini MG, Corti A, Manfredi AA. Circulating chromogranin A reveals extra-articular involvement in patients with rheumatoid arthritis and curbs TNF-alpha-elicited endothelial activation. *J Leukoc Biol* 2009;85(1):81-7.
17. Erreni M, Bianchi P, Laghi L, Mirolo M, Fabbri M, Locati M, Mantovani A, Allavena P. Expression of chemokines and chemokine receptors in human colon cancer. *Methods Enzymol* 2009;460:105-21.
18. Greco A, Borrello MG, Miranda C, Degl'Innocenti D, Pierotti MA. Molecular pathology of differentiated thyroid cancer. Special issue "Update on the diagnosis and treatment of differentiated thyroid cancer". *Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2009 (in corso di stampa).

19. Guerini V, Barbui V, Spinelli O, *et al.* The histone deacetylase inhibitor ITF2357 selectively targets cells bearing mutated JAK2(V617F). *Leukemia* 2008;22:740-7.
20. Guidolin G, Nico B, Crivellato E, Marzullo A, Vacca A, Ribatti D. Tumoral mast cells exhibit a common spatial distribution. *Cancer Letters* 2009;273:80-5.
21. Laghi L, Bianchi P, Miranda E, Balladore E, Pacetti V, Grizzi F, Allavena P, Torri V, Repici A, Santoro A, Mantovani A, Roncalli M, Malesci A. CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pt3-t4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *Lancet oncol* 2009;10(9):877-84.
22. Manfredi AA, Capobianco A, Bianchi ME, Rovere-Querini P. Regulation of dendritic- and T-cell fate by injury-associated endogenous signals. *Crit Rev Immunol* 2009;29(1):69-86.
23. Manfredi AA, Capobianco A, Esposito A, De Cobelli F, Canu T, Monno A, Raucci A, Sanvito F, Doglioni C, Nawroth PP, Bierhaus A, Bianchi ME, Rovere-Querini P, Del Maschio A. Maturing dendritic cells depend on RAGE for *in vivo* homing to lymph nodes. *J Immunol* 2008;180(4):2270-5.
24. Manfredi AA, Rovere-Querini P, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A. Pentraxins, humoral innate immunity and tissue injury. *Curr Opin Immunol* 2008;20(5):538-44.
25. Mangieri D, Nico B, Coluccia AML, Vacca A, Ponzoni M, Ribatti D. An alternative *in vivo* system for testing angiogenic potential of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett* 2009;227:199-204.
26. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008 24;454(7203):436-44.
27. Marchesi F, Piemonti L, Fedele G, Destro A, Roncalli M, Albarello L, Doglioni C, Anselmo A, Doni A, Bianchi P, Laghi L, Malesci A, Cervo L, Malosio ML, Reni M, Zerbi A, Di Carlo V, Mantovani A, Allavena P. The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2008;68:(21). 9060-9.
28. Maugeri N, Rovere-Querini P, Evangelista V, Covino C, Capobianco A, Bertilaccio MT, Piccoli A, Totani L, Cianflone D, Maseri A, Manfredi AA. Neutrophils phagocytose activated platelets *in vivo*: a phosphatidylserine, P-selectin, and $\alpha 2$ integrin-dependent cell clearance program. *Blood* 2009;113(21):5254-65.
29. Mazzarelli P, Pucci S, Spagnoli LG. CLU and colon cancer. The dual face of CLU: from normal to malignant phenotype. *Adv Cancer Res* 2009;105:45-61.
30. Mininni M, Ammendola M, Patruno R, Lucarelli N, Valerio P, Gadaleta Caldarola G, Catino A, De Sarro G, Gadaleta C, Ranieri G. Tryptase expression correlates to angiogenesis in early breast cancer. *The Breast* 2009;18(1):S21.
31. Moschetta M, Di Pietro G, Ria R, Gnoni A, Mangialardi G, Guarini A, Ditunno P, Musto R, D'auria F, Ricciardi MR, Dammacco F, Ribatti D, Vacca A. Bortezomib and zoledronic acid on angiogenic and vasculogenic activities of bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2009 (in corso di stampa).
32. Muzza M, Degl'Innocenti D, Colombo C, Perrino M, Ravasi E, Rossi S, Cirello V, Beck-Peccoz I P, Borrello MG, Fugazzola L. The tight relationship between papillary thyroid cancer, autoimmunity and inflammation: clinical and molecular studies. *Clinical Endocrinology* 2009 Sep 10 (online prima della stampa). prima della stampa).
33. Nico B, Benagiano V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D. Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 2008;23:601-7.
34. Nico B, Mangieri D, Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. Mast cells contribute to vasculogenic mimicry in multiple myeloma. *Stem Cells and Development* 2008;17:19-22.

35. Passantino L, Passantino G, Cianciotta A, Ribaud MR, Lo Presti G, Ranieri G, Perillo A. Expression of proto-oncogene C-kit and correlation with morphological evaluations in canine cutaneous mast cell tumors. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2008;30(3):609-21.
36. Passantino L, Passantino G, Cianciotta A, Ribaud MR, Lo Presti G, Ranieri G, Perillo A. Expression of proto-oncogene C-kit and correlation with morphological evaluations in canine cutaneous mast cell tumors. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2008;30(3):609-21.
37. Patruno R, Arpaia N, Gadaleta CD, Passantino L, Zizzo N, Misino A, Lucarelli NM, Catino A, Valerio P, Ribatti D, Ranieri G. VEGF concentration from plasma activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. *J Cell Mol Med* 2009;13(3):555-61.
38. Patruno R, Arpaia N, Gadaleta CD, Passantino L, Zizzo N, Misino A, Lucarelli NM, Catino A, Valerio P, Ribatti D, Ranieri G. VEGF concentration from plasma activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. *J Cell Mol Med* 2009;13(3):555-61.
39. Patruno R, Di Lecce V, Troilo S, Rella A, G Gadaleta Caldarola, P Valerio, CD Gadaleta, G Ranieri. Mast cell tryptase density may play a role in breast cancer angiogenesis. *Annals of Oncology* 2008;19(9):M31,ix110.
40. Pucci S, Bonanno E, Sesti F, Mazzarelli P, Mauriello A, Ricci F, Zoccai GB, Rulli F, Galatà G, Spagnoli LG. Clusterin in stool: a new biomarker for colon cancer screening? *Am J Gastroenterol* 2009;104(11):2807-15.
41. Pucci S, Mazzarelli P, Nucci C, Ricci F, Spagnoli LG. CLU “in and out”: looking for a link. *Adv Cancer Res* 2009;105:93-113.
42. Pucci S, Mazzarelli P, Sesti F, Boothman DA, Spagnoli LG. Interleukin-6 affects cell death escaping mechanisms acting on Bax-Ku70-Clusterin interactions in human colon cancer progression. *Cell Cycle* 2009;8(3):473-81. Erratum in: *Cell Cycle* 2009;8(14):2305.
43. Rambaldi A, Barbui T, Barosi G. From palliation to epigenetic therapy in myelofibrosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008;2008:83-91.
44. Ranieri G, Gadaleta-Caldarola G, Coviello M, Quaranta M, Fazio V, Mattioli V, Catino A, Gadaleta CD. Platelets VEGF concentrations in healthy controls volunteers and HCC patients submitted to percutaneously radiofrequency thermal ablation. ASCO Annual Meeting Proceedings, *Journal of Clinical Oncology* 2008;26(15):665.
45. Ranieri G, Ammendola M, Patruno R, Celano G, Zito FA, Montemurro S, Rella A, Di Lecce V, Gadaleta CD, Battista De Sarro G, Ribatti D. Tryptase-positive mast cells correlate with angiogenesis in early breast cancer patients. *Int J Oncol* 2009;35(1):115-20.
46. Ranieri G, Misino A, Patruno R, Zito AF, Martino T, Di Lecce V, Catino A, Gadaleta CD, Valerio P. Tryptase expression paralleled with angiogenesis in early breast cancer patients. *Annals of Oncology* 2009;20(8):viii53.
47. Rella A, Patruno R, Celano G, Valerio P, Gadaleta-Caldarola G, Catino A, Fazio V, Gadaleta CD, Ranieri G. Mast cell tryptase density correlates to angiogenesis in female breast cancer patients. ASCO Annual Meeting Proceedings, *Journal of Clinical Oncology* 2008;26(15):22100.
48. Rella A, Patruno R, Celano G, Valerio P, Gadaleta-Caldarola G, Catino A, Fazio V, Gadaleta CD, Ranieri G. Mast cell positive to tryptase may play a role in female breast cancer angiogenesis. *Annals of Oncology* 2008;19(5):v130-v132.
49. Ria R, Cirulli T, Giannini T, Bambace S, Serio G, Portaluri M, Ribatti D, Vacca A, Dammacco F. Serum levels of angiogenic cytokines decrease after radiotherapy in non-Hodgkin lymphomas. *Clin Exp Med* 2008;8:141-5.

50. Ria R, Gasparre T, Mangialardi G, Bruno A, Iodice G, Vacca A, Dammacco F. Comparison between filgrastim and lenograstim plus chemotherapy for mobilization of PBPCs. *Bone Marrow Transplantation* 2009 (in corso di stampa).
51. Ria R, Mangialardi G, Occhiogrosso G, Ciappetta P, Ribatti D, Vacca A, Dammacco F. Monoclonal gammopathy as a marker of primary cerebral lymphoma. *Eur J Clin Invest* 2009;39:627-9.
52. Ria R, Piccoli C, Cirulli T, Falzetti F, Mangialardi G, Guidolin D, Tabilio A, Di Renzo N, Guarini A, Ribatti D, Dammacco F, Vacca A. Endothelial differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells from patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2008;14:1678-85.
53. Ria R, Todoerti K, Berardi S, Coluccia AML, De Luisi A, Mattioli M, Ronchetti D, Morabito F, Guarini A, Petrucci MT, Dammacco F, Ribatti D, Neri A, Vacca A. Gene expression profiling of bone marrow endothelial cells in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2009;15:5369-5378.
54. Ria R, Vacca A, Mangialardi G, Dammacco F. Delayed complete response in a patient with multiple myeloma. *Eur J Clin Invest* 2008;38:966-8.
55. Ribatti D, Belloni AS, Nico B, Di Comite M, Crivellato E, Vacca A. Leptin-leptin receptor are involved in angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Peptides* 2008;29:1596-602.
56. Ribatti D, Maruotti N, Nico B, Longo V, Mangieri D, Vacca A, Cantatore FP. Clodronate inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Oncology Rep* 2008;19:1109-12.
57. Ribatti D, Vacca A. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *Genes Nutr* 2008;3:29-34.
58. Ribatti D, Vacca A. The role of monocytes-macrophages in vasculogenesis in multiple myeloma. *Leukemia* 2009;23(9):1535-6.
59. Roccaro AM, Leleu X, Blotta S, Burwik N, Vacca A, Russo D, Ghobrial IM. Waldenström macroglobulinemia: new therapeutic options. *Cancer Therapy* 2008;6:227-38.
60. Roccaro AM, Leleu X, Sacco A, Moreau AS, Hatjiharissi E, Jia X, Xu L, Ciccarelli B, Patterson CJ, Ngo HT, Russo D, Vacca A, Dammacco F, Anderson KC, Ghobrial IM, Treon S. Resveratrol exerts antiproliferative activity and induces apoptosis in Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Cancer Res* 2008;14:1849-1858.
61. Scavelli C, Di Pietro G, Cirulli T, Coluccia M, Boccarelli A, Giannini T, Mangialardi G, Bertieri R, Coluccia AML, Ribatti D, Dammacco F, Vacca A. Zoledronic acid impacts over-angiogenic phenotype of endothelial cells in patients with multiple myeloma. *Mol Cancer Therapeut* 2007;6:3256-62.
62. Scavelli C, Nico B, Cirulli T, Ria R, Di Pietro G, Mangieri D, Bacigalupo A, Mangialardi G, Coluccia AML, Caravita T, Molica S, Ribatti D, Dammacco F, Vacca A. Vasculogenic mimicry by bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *Oncogene* 2008;27:663-74.
63. Sesti F, Mazzarelli P, Bonanno E, Pucci S, Spagnoli LG. Immunodosage of clusterin for colon cancer detection: technical advances. (inviato per la pubblicazione)
64. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009;86(5):1065-73.
65. Vacca A, Dammacco F. microRNA to know in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2009;113:4133-4.
66. Zizzo N, Greco M, Ammendola M, Patruno R, Valerio P, Catino A, Gadaleta C, Ranieri G. Mast cells positive to tryptase paralleled with angiogenesis in female breast cancer patients. *Annals of Oncology* 2009;20(2):ii47.
67. Zizzo N, Patruno R, Zito FA, Di Summa A, Tinelli A, Troilo S, Misino A, Ruggieri E, Goffredo V, Gadaleta CD, Ranieri G. VEGF concentrations from platelets correlate with tumour angiogenesis and grading in canine non-Hodgkin's lymphoma spontaneous model. *Leukemia and Lymphoma* 2009 (in corso di stampa).

Presentazioni a meeting internazionali:

1. Alberti C, Canevari S, Tomassetti A. A pro-inflammatory program driven by EGFR activation in epithelial ovarian cancer. In: *EACR Special Conference "Inflammation and Cancer"* (Satellite Meeting ECCO 15-34 ESMO by EACR), Berlin (Germany), 24-25 September 2009.
2. Canevari S. Lezione magistrale. Contributo della biologia e della genomica funzionale all'identificazione di biomarcatori e nuovi bersagli terapeutici nel carcinoma ovarico. In: *Il carcinoma ovarico: dalla ricerca di base alle novità terapeutiche*; Padova, 5 giugno 2009.
3. Degl'Innocenti D, Catalano V, Rizzetti MG, Pierotti MA, Borrello MG. Promotion of an inflammatory microenvironment by the papillary thyroid carcinoma-associated oncogenes. In: *EACR Special Conference "Inflammation and Cancer"* (Satellite Meeting ECCO 15-34 ESMO by EACR), Berlin (Germany), 24-25 September 2009.

BASE MOLECOLARE DELLE MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE E SVILUPPO DI NUOVE TERAPIE

Mario Cazzola

Clinica Ematologica, Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

Proponente (Coordinatore del progetto)	Unità Operativa (UO) (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
S. Matteo (Mario Cazzola)	UO1 (San Matteo: Mario Cazzola)	San Matteo	Mario Cazzola
		San Matteo	Mario Lazzarino
		San Matteo	Giovanni Barosi
		Experimental Hematology, Basel	Radek Skod
	UO2 (ISS: Anna Rita Migliaccio)	ISS	Anna Rita Migliaccio
		Università di Chieti	Rosa Alba Rana

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Negli ultimi due anni sono state condotte le ricerche e sono stati ottenuti i risultati descritti di seguito.

1. Neoplasie mieloproliferative familiari e predisposizione genetica all'acquisizione di mutazioni di JAK2

Abbiamo studiato la prevalenza e le caratteristiche cliniche delle neoplasie mieloproliferative familiari. In una coorte di 458 pazienti affetti da neoplasia mieloproliferativa, i casi familiari sono risultati pari a 75 (35 famiglie), per una prevalenza del 7,6%. Non abbiamo osservato significative differenze cliniche fra casi familiari e casi sporadici: questo indica che le due condizioni sono molto simili, e che gli individui interessati – siano essi casi sporadici o familiari – hanno in comune una predisposizione genetica all'acquisizione di mutazioni di JAK2 e di MPL. Abbiamo altresì documentato l'accorciamento progressivo dei telomeri, e dimostrato un fenomeno di anticipazione dell'esordio clinico. Il lavoro è stato pubblicato sul *Journal of Clinical Oncology* (Rumi *et al.*, 2007).

Abbiamo quindi studiato ulteriormente il meccanismo dell'anticipazione dell'esordio clinico delle neoplasie mieloproliferative. Il lavoro è stato pubblicato *Blood* (Rumi *et al.*, 2008).

In uno studio collaborativo abbiamo dimostrato che l'aplotipo GGCC di JAK2 comporta un rischio più alto di acquisire mutazioni dell'esone 12 di JAK2. Tale lavoro è stato pubblicato su *Leukemia* (Olcaydu *et al.*, 2009).

2. Mutazioni dell'esone 12 di JAK2 nelle neoplasie mieloproliferative: una nuova base molecolare di eritrocitosi

In pazienti affetti da neoplasia mieloproliferativa negativi per la mutazione JAK2 (V617F) – che si trova nell'esone 14 – abbiamo sequenziato l'esone 12 del gene. Abbiamo trovato

diverse mutazioni – principalmente delezioni di 6 basi – che si trovano esclusivamente in pazienti affetti da policitemia vera o da eritrocitosi idiopatica, e la maggior parte dei pazienti affetti da policitemia vera portatori di tali mutazioni hanno una isolata eritrocitosi con valori bassi di eritropoietina sierica. Pertanto le mutazioni somatiche dell'esone 12 di JAK2 sembrano comportare una selettiva espansione dell'eritropoiesi.

L'identificazione delle mutazioni dell'esone 12 di JAK2 ha anche consentito di validare la nozione di predisposizione genetica all'acquisizione di mutazioni responsabili della patogenesi delle neoplasie mieloproliferative. In due famiglie abbiamo infatti trovato 2 fratelli e 2 sorelle affetti da policitemia vera: uno dei due (o una delle due) aveva la mutazione classica JAK2 (V617F), mentre l'altro (o l'altra) aveva una mutazione dell'esone 12. Questo aveva anche un impatto sul fenotipo, in quanto i pazienti con la mutazione JAK2 (V617F) avevano una classica policitemia vera, mentre quelli con la mutazione dell'esone 12 avevano una neoplasia mieloproliferativa essenzialmente eritrocitica.

Questo lavoro è stato pubblicato su *Blood* (Pietra *et al.*, 2008).

3. *Asse CXCR4/SDF-1 nella mielofibrosi idiopatica*

L'asse CXCR4/SDF-1, che determina il legame delle cellule staminali emopoietiche al microambiente midollare e le cui alterazioni possono essere responsabili di abnorme mobilitazione di tali cellule, è stato studiato nel topo Gata1^{low}, che rappresenta un modello murino di mielofibrosi primaria. Tanto nel topo Gata1^{low} che nei pazienti affetti da mielofibrosi primaria i livelli sierici di SDF-1 sono risultati elevati; inoltre la proteina SDF-1 tendeva ad aumentare nel midollo osseo. Queste osservazioni suggeriscono che tali anomalie dell'asse CXCR4/SDF-1 sono responsabili dell'abnorme ricircolo di cellule staminali presente sia nei pazienti sia nel modello murino di mielofibrosi primaria. Tale lavoro è stato pubblicato su *Experimental Hematology* (Migliaccio *et al.*, 2008).

Uno studio successivo ha dimostrato che l'ipermetilazione del promoter di CXCR4 può essere responsabile di ridotta espressione del gene nei pazienti affetti da mielofibrosi primaria, e può pertanto contribuire all'abnorme ricircolo di cellule staminali CD34-positive che caratterizza tale condizione morbosa. Tale lavoro è stato pubblicato su *Stem Cells* (Bogani C *et al.*, 2008).

3. *Rilevanza clinica del carico mutazionale JAK2 (V617F) nella policitemia vera e sviluppo di un modello prognostico dinamico per predire l'aspettativa di vita nei pazienti affetti da mielofibrosi post-policitemia*

In uno studio osservazionale prospettico, abbiamo valutato 338 pazienti affetti da policitemia vera: 320 (94,7%) erano positivi per la mutazione JAK2 (V617F), 14 (4,1%) erano positivi per mutazioni dell'esone 12 di JAK2, mentre i rimanenti 4 pazienti non avevano le suddette mutazioni. In analisi multivariata, un alto carico mutazionale JAK2 (V617F) (più del 50% di alleli mutanti nei granulociti circolanti) rappresentava un fattore di rischio indipendente per la progressione verso la mielofibrosi post-policitemia vera. Tale lavoro verrà presentato come comunicazione orale al 51° Meeting dell'American Society of Hematology, New Orleans, 5-8 December 2009 [Relationship between granulocyte JAK2 (V617F) mutant allele burden and risk of progression to myelofibrosis in polycythemia vera: a prospective study of 338 patients].

In una serie di pazienti affetti da policitemia vera abbiamo trovato che la leucocitosi alla diagnosi rappresenta un fattore di rischio di evoluzione in mielofibrosi. La sopravvivenza mediana dei 68 pazienti con mielofibrosi post-policitemia vera è stata di 5,7 anni. Utilizzando un modello di Cox basato su analisi multivariata e covariate tempo-dipendenti,

abbiamo definito uno sistema di scoring utile per prevedere la sopravvivenza del singolo paziente. I tre fattori di rischio indipendenti sono risultati: emoglobina inferiore a 10 g/dL, piastrine inferiori a $100 \times 10^9/L$, e leucociti superiori a $30 \times 10^9/L$. Questo lavoro è stato pubblicato su *Blood* (Passamonti *et al.*, 2008).

4. *Storia naturale della trombocitemia essenziale e rilevanza clinica dello stato mutazionale di JAK2 e di MPL*

Uno studio condotto su una coorte di 605 pazienti affetti da trombocitemia essenziale ha dimostrato che il rischio di trombosi è pari al 14% a 10 anni, e aumenta fino al 30% a 20 anni dalla diagnosi. Per conto il rischio di evoluzione in mielofibrosi e quello di evoluzione in leucemia acuta sono pari al 2,8% e al 2,6%, rispettivamente, a 10 anni. Questo lavoro è stato pubblicato su *Haematologica* (Passamonti *et al.*, 2008).

In uno studio condotto su 994 pazienti affetti da trombocitemia essenziale, 30 sono risultati positivi per la mutazione MPL (W515L/K). Tali pazienti avevano valori più bassi di emoglobina e valori più alti di piastrine rispetto ai pazienti con la mutazione classica JAK2 (V617F). Tale lavoro è stato pubblicato su *Blood* (Vannucchi *et al.*, 2008).

Lo stato mutazionale di JAK2 non è risultato correlato con il fenotipo clinico e la prognosi nella mielofibrosi post-policitemia (Guglielmelli *et al.*, 2009).

5. *Rilevanza del carico mutazionale JAK2 (V617F) nella mielofibrosi primaria*

Un primo studio condotto su 304 pazienti affetti da mielofibrosi primaria ha dimostrato che la mutazione JAK2 (V617F) era presente nel 63% dei casi. La mutazione era omozigote in una parte dei pazienti e tale stato molecolare si associava ad importante splenomegalia, leucocitosi e necessità di trattamento citoreducente. La positività per JAK2 (V617F) comportava inoltre un maggior rischio di evoluzione in leucemia acuta. Tale lavoro è stato pubblicato su *Blood* (Barosi *et al.*, 2007).

In uno studio condotto su 186 pazienti affetti da mielofibrosi primaria, si è dimostrato che un basso carico mutazionale JAK2 (V617F) può rappresentare un fattore prognostico negativo in quanto si associa ad un fenotipo clinico mielodepleto, che tende a sviluppare rapidamente importante anemia senza una marcata splenomegalia e che comporta ridotta sopravvivenza. Tale lavoro è stato pubblicato su *Blood* (Guglielmelli *et al.*, 2009).

6. *Partecipazione a trial clinici riguardanti terapie innovative delle neoplasie mieloproliferative*

I ricercatori clinici delle Unità Operative del Prof. Mario Cazzola e del Dott. Giovanni Barosi stanno attualmente partecipando a trial clinici riguardanti terapie innovative delle neoplasie mieloproliferative.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Bacigalupo A, Pecci A, Viarengo G, Zuffardi O, Frassoni F, Barosi G. Endothelial colony-forming cells from patients with chronic myeloproliferative disorders lack the disease-specific molecular clonality marker. *Blood* 2009;114(14):3127-30.
2. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, Massa M, Rosti V, Campanelli R, Villani L, Viarengo G, Gattoni E, Gerli G, Specchia G, Tinelli C, Rambaldi A, Barbui T; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA)

- Italian Registry of Myelofibrosis. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* 2007;110(12):4030-6.
3. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC, Kiladjian JJ, Lengfelder E, McMullin MF, Passamonti F, Reilly JT, Vannucchi AM, Barbui T. Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* 2009;113(20):4829-33.
 4. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, Dupriez B, Levine RL, Passamonti F, Gotlib J, Reilly JT, Vannucchi AM, Hanson CA, Solberg LA, Orazi A, Tefferi A; International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia* 2008;22(2):437-8.
 5. Bergamaschi GM, Primignani M, Barosi G, Fabris FM, Villani L, Reati R, Dell'era A, Mannucci PM. MPL and JAK2 exon 12 mutations in patients with the Budd-Chiari syndrome or extrahepatic portal vein obstruction. *Blood* 2008;111(8):4418.
 6. Bogani C, Ponziani V, Guglielmelli P, Desterke C, Rosti V, Bosi A, Le Bousse-Kerdilès MC, Barosi G, Vannucchi AM; Myeloproliferative Disorders Research Consortium. Hypermethylation of CXCR4 promoter in CD34+ cells from patients with primary myelofibrosis. *Stem Cells* 2008;26(8):1920-30.
 7. Boveri E, Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Arcaini L, Pascutto C, Castello A, Cazzola M, Magrini U, Lazzarino M. Bone marrow microvessel density in chronic myeloproliferative disorders: a study of 115 patients with clinicopathological and molecular correlations. *Br J Haematol* 2008;140(2):162-8.
 8. Cazzola M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 as a molecular basis of erythrocytosis. *Haematologica* 2007;92(12):1585-9.
 9. Cervantes F, Passamonti F, Barosi G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2008;22(5):905-14.
 10. Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, Travaglini E, Pietra D, Pascutto C, Passamonti F, Invernizzi R, Castello A, Magrini U, Lazzarino M, Cazzola M. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2009;27(5):754-62.
 11. Guglielmelli P, Barosi G, Pieri L, Antonioli E, Bosi A, Vannucchi AM. JAK2V617F mutational status and allele burden have little influence on clinical phenotype and prognosis in patients with post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis. *Haematologica* 2009;94(1):144-6.
 12. Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G, Rambaldi A, Lo Coco F, Antonioli E, Pieri L, Pancrazzi A, Ponziani V, Delaini F, Longo G, Ammatuna E, Liso V, Bosi A, Barbui T, Vannucchi AM. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. *Blood* 2009;114(8):1477-83.
 13. Malcovati L, Della Porta MG, Pietra D, Boveri E, Pellagatti A, Galli A, Travaglini E, Brisci A, Rumi E, Passamonti F, Invernizzi R, Cremonesi L, Boulwood J, Wainscoat JS, Hellström-Lindberg E, Cazzola M. Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Blood* 2009;114(17):3538-45.
 14. Martelli F, Ghinassi B, Lorenzini R, Vannucchi AM, Rana RA, Nishikawa M, Partamian S, Migliaccio G, Migliaccio AR. Thrombopoietin inhibits murine mast cell differentiation. *Stem Cells* 2008;26(4):912-9.
 15. Migliaccio AR, Martelli F, Verrucci M, Migliaccio G, Vannucchi AM, Ni H, Xu M, Jiang Y, Nakamoto B, Papayannopoulou T, Hoffman R. Altered SDF-1/CXCR4 axis in patients with

- primary myelofibrosis and in the Gata1 low mouse model of the disease. *Exp Hematol* 2008;36(2):158-71.
16. Mutschler M, Magin AS, Buerge M, Roelz R, Schanne DH, Will B, Pilz IH, Migliaccio AR, Pahl HL. NF-E2 overexpression delays erythroid maturation and increases erythrocyte production. *Br J Haematol* 2009;146(2):203-17.
 17. Olcaydu D, Skoda RC, Looser R, Li S, Cazzola M, Pietra D, Passamonti F, Lippert E, Carillo S, Girodon F, Vannucchi A, Reading NS, Prchal JT, Ay C, Pabinger I, Gisslinger H, Kralovics R. The 'GGCC' haplotype of JAK2 confers susceptibility to JAK2 exon 12 mutation-positive polycythemia vera. *Leukemia* 2009;23(10):1924-6.
 18. Pancrazzi A, Guglielmelli P, Ponziani V, Bergamaschi G, Bosi A, Barosi G, Vannucchi AM. A sensitive detection method for MPLW515L or MPLW515K mutation in chronic myeloproliferative disorders with locked nucleic acid-modified probes and real-time polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2008;10(5):435-41.
 19. Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, Boveri E, Elena C, Pietra D, Boggi S, Astori C, Bernasconi P, Varettoni M, Brusamolino E, Pascutto C, Lazzarino M. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica* 2008;93(11):1645-51.
 20. Passamonti F, Rumi E, Caramella M, Elena C, Arcaini L, Boveri E, Del Curto C, Pietra D, Vanelli L, Bernasconi P, Pascutto C, Cazzola M, Morra E, Lazzarino M. A dynamic prognostic model to predict survival in post-polycythemia vera myelofibrosis. *Blood* 2008;111(7):3383-7.
 21. Piaggio G, Rosti V, Corselli M, Bertolotti F, Bergamaschi G, Pozzi S, Imperiale D, Chiavarina B, Bonetti E, Novara F, Sessarego M, Villani L, Garuti A, Massa M, Ghio R, Campanelli R, Bacigalupo A, Pecci A, Viarengo G, Zuffardi O, Frassoni F, Barosi G. Endothelial colony-forming cells from patients with chronic myeloproliferative disorders lack the disease-specific molecular clonality marker. *Blood* 2009;114(14):3127-30.
 22. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, Ferrari M, Gisslinger H, Kralovics R, Cremonesi L, Skoda R, Cazzola M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111(3):1686-9.
 23. Rumi E, Passamonti F, Della Porta MG, Elena C, Arcaini L, Vanelli L, Del Curto C, Pietra D, Boveri E, Pascutto C, Cazzola M, Lazzarino M. Familial chronic myeloproliferative disorders: clinical phenotype and evidence of disease anticipation. *J Clin Oncol* 2007;25(35):5630-5.
 24. Rumi E, Passamonti F, Pagano L, Ammirabile M, Arcaini L, Elena C, Flagiello A, Tedesco R, Vercellati C, Marcello AP, Pietra D, Moratti R, Cazzola M, Lazzarino M. Blood p50 evaluation enhances diagnostic definition of isolated erythrocytosis. *J Intern Med* 2009;265(2):266-74.
 25. Rumi E, Passamonti F, Picone C, Della Porta MG, Pascutto C, Cazzola M, Lazzarino M. Disease anticipation in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2008;112(6):2587-8.
 26. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, Ruggeri M, Specchia G, Lo-Coco F, Delaini F, Villani L, Finotto S, Ammatuna E, Alterini R, Carrai V, Capaccioli G, Di Lollo S, Liso V, Rambaldi A, Bosi A, Barbui T. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood* 2008;112(3):844-7.

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

Gaetano Finocchiaro

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

Base di partenza e razionale

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

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

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

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

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

Proponente (<i>Cordinatore del progetto</i>)	Unità Operativa (UO) (<i>ente di appartenenza: responsabile</i>)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
Besta (<i>Gaetano Finocchiaro</i>)	UO1 (<i>Besta: Gaetano Finocchiaro</i>)	Besta	Gaetano Finocchiaro
		Besta	Amerigo Boiardi
		Besta	Renato Mantegazza
		Besta	Maria Grazia Bruzzone
	UO2 (<i>IEO: Maria Rescigno</i>)	IEO	Maria Rescigno
		IEO	Giuseppe Viale
		IEO	Giuseppe Curigliano
		IEO	Nicoletta Colombo
		IRE	Carmine M. Carapella
	UO3 (<i>IRE: Carmine Maria Carapella</i>)	IRE	Antonello Vidiri
		IRE	Anna Cianciulli
		Università degli studi Sapienza di Roma	Felice Giangaspero, Mario Piccoli

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Il progetto ha due obiettivi principali: 1) studiare l'espressione di EGFRvIII (Epidermal Growth Factor Receptor variant III), una variante del recettore di EGF caratterizzata dalla delezione degli esoni 2-7 che mantiene un *frame* di lettura e crea un nuovo epitopo unicamente espresso nelle cellule neoplastiche, in diversi tumori (gliomi maligni, carcinomi ovarici, carcinomi mammari); 2) condurre uno studio clinico di fase I-II sull'immunoterapia con un peptide corrispondente alla sequenza dell'epitopo EGFRvIII, coniugato con l'adiuvante KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), denominato CDX-110 e attualmente prodotto dall'azienda statunitense Celldex Therapeutics.

Per quanto riguarda il primo obiettivo, tutte le UO hanno fornito interessanti risultati sull'espressione di EGFRvIII in glioblastoma multiforme (GBM) (UO1 e UO3) e nel cancro al seno (BC) e all'ovaio (OC) (UO2).

Il raggiungimento del secondo obiettivo, e quindi la progettazione e conduzione di uno studio clinico, è al momento in stallo in quanto gli accordi presi con Celldex prima di presentare il progetto non sono attualmente più validi. La ditta americana è stata infatti acquistata da Pfizer che ha ora la licenza esclusiva mondiale per CDX 110, attualmente in fase II di sviluppo per il trattamento del GBM, oltre ai diritti in esclusiva per l'uso dei vaccini EGFRvIII in altre potenziali indicazioni. La possibilità di una sperimentazione con CDX110 in Italia è stata quindi improvvisamente vincolata ad un accordo con Pfizer, al momento non praticabile.

È in corso di valutazione la possibilità di sintesi del peptide da parte della ditta svizzera Bachem (www.bachem.it), che opera nel rispetto delle norme europee e in linea con le GMP. Trattandosi di una sintesi svolta per scopi di ricerca clinica, non dovrebbero presentarsi problemi di brevetto. A Bachem è possibile ordinare la sola produzione del vaccino "bulk", o anche il successivo infialamento in singole dosi pronte per la somministrazione ai pazienti; ovviamente il prezzo del servizio, nella seconda opzione, è considerevolmente più elevato. Le spese dello studio clinico possono essere completamente coperte con il finanziamento "ISS per ACC" solo nel primo caso, ordinando cioè un unico lotto di vaccino e prevedendo quindi un

infialamento in Italia presso la farmacia dell'IFO-Istituto Regina Elena di Roma secondo la *Nota per l'applicazione dell'articolo 15 del DL.vo 200/2007 in strutture ospedaliere pubbliche o ad esse equiparate, nonché in Istituti di ricovero e cura a carattere scientifico privati* della Dott.ssa A. Meneguz (luglio 2008). Dal momento che la produzione del vaccino da parte di Bachem non può includere la fase di coniugazione con KLH, è stata ipotizzata la possibilità di una sintesi esclusiva del peptide da parte della ditta svizzera e l'utilizzo di imiquimod crema (da spalmare sul sito di iniezione) come adiuvante.

Nel luglio 2009 è stata ottenuta inoltre da Bachem tutta la documentazione relativa al vaccino eventualmente prodotto (*Certificate of GMP Compliance, Manufacturing License, Specification and CMC documentation of the API, based on the EMEA guidelines CHMP/QWP/185401/2004, certificate of analysis*, ecc.) e inviato all'IFO per l'infialamento.

Su suggerimento della Dott.ssa Meneguz, verrà fatta richiesta di audizione pre-submission alla *Commissione per l'accertamento dei requisiti dei prodotti farmaceutici di nuova istituzione* dell'ISS entro il mese di novembre 2009. In questa occasione verranno discussi i diversi punti critici del progetto con particolare attenzione alla fattibilità dello studio clinico dal punto di vista regolatorio e alla definizione della documentazione da presentare all'ISS per la valutazione dello studio clinico. Visto il ritardo accumulato nelle fasi di pianificazione dello studio clinico, dovuto all'imprevedibile indisponibilità del vaccino, è stata fatta richiesta di proroga di un anno per il completamento del progetto; la proroga è stata accettata.

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

Riccardo Dolcetti

Dipartimento di Oncologia Medica, Centro di Riferimento Oncologico, Aviano

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi primari del progetto sono:

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

Obiettivi secondari del progetto sono:

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Il presente progetto si prefigge quale obiettivo primario l'attivazione di uno studio di fase I/II basato sull'utilizzo della proteina idiotipica VK3-20 quale vaccino per il trattamento di linfomi a basso grado di malignità esprimenti catene leggere molecolarmente correlate. Nei primi 24 mesi, grazie all'attività integrata delle varie UO afferenti sono state ottenute evidenze pre-cliniche rilevanti a supporto dell'applicazione in campo clinico di tale approccio vaccinale. In particolare:

- L'immunogenicità *ex vivo* di VK3-20 e VK3-15 è stata confermata in un'ampia serie di donatori. È stato possibile ottenere sia cellule T CD4⁺ che CD8⁺ in grado di riconoscere e lisare specificamente le cellule bersaglio, un aspetto di notevole rilevanza applicativa.
- Una proteina VK3-20 prototipica induce risposte T cellulari cross-reattive rispetto a VK3-20 derivate da altri linfomi e anche nei confronti della proteina correlata VK3-15.
- CTL VK3-20-specifici uccidono in modo antigene-specifico e HLA-A*02-ristretto linee di linfoma sia VK3-20+ (DG75) che VK3-15+ (LCL SH9) indicando che tali proteine sono naturalmente processate in cellule linfoidee e in grado di produrre epitopi immunogenici "cross-reattivi".

- La proteina VK3-20 contiene almeno 25 epitopi in grado di legare i più comuni alleli HLA di Classe I. Sono stati validati 11 epitopi HLA-A*0201 ed è stato dimostrato che tali peptidi sono in grado di indurre CTL specifici *ex vivo* da donatori capaci di lisare anche linee di linfoma sia VK3-20+ che VK3-15+.
- Gli epitopi HLA-A*0201 di VK3-20 sono in gran parte condivisi con proteine VK/VJ espresse da numerose neoplasie linfoidi. CTL specifici per due di questi epitopi “nativi” di VK3-20 sono in grado di riconoscere e uccidere in modo specifico e HLA-ristretto bersagli autologhi caricati con versioni “cross-reattive” degli stessi peptidi, ma appartenenti a proteine idiotipiche non correlate. Ciò suggerisce come VK3-20 contenga versioni “naturalmente eteroclitiche” di diversi epitopi condivisi con altre proteine VK/VJ ampiamente espresse in diverse neoplasie linfoidi.
- Pazienti con linfoma HCV+ mostrano risposte T CD8+ specifiche per epitopi di VK3-20 in numero maggiore rispetto a donatori sani in saggi ELISPOT.
- Sono stati costruiti idonei vettori per l'espressione di VK3-20 e VK3-15 che sono stati trasferiti al Partner Industriale esterno che ha sviluppato un nuovo processo di produzione e purificazione “clinical-grade”.
- È stata valutata l'immunogenicità della proteina VK3-20 in topi BALB/c. I risultati dimostrano che tutti i topi immunizzati hanno sviluppato una risposta umorale con buoni titoli anticorpali. Inoltre, i sieri sono risultati in grado di riconoscere la proteina in immunoblotting, confermando l'immunogenicità per la branca umorale della proteina VK3-20 ricombinante prototipo. Sono stati caratterizzati 2 anticorpi monoclonali specifici per VK3-20 e/o VK3-15.
- Sono stati ottimizzati i modelli animali basati sulla crescita *in vivo* delle linee DG-75 e SH9 impiantate s.c. in topi SCID. Al fine di poter monitorare la crescita e la diffusione tumorale, le cellule DG-75 sono state ingegnerizzate per esprimere EGFP o luciferasi. La down-regulation delle molecole MHC di classe I e II riscontrata nelle cellule DG-75 e SH9 in seguito all'inoculo *in vivo* è stata superata ingegnerizzando le cellule DG-75 con un plasmide esprimente HLA-A*0201. Tali cellule mantengono l'espressione di classe I e II a seguito del recupero dopo il trasferimento *in vivo*. I saggi (Winn Assay) eseguiti *in vivo* in topi SCID hanno confermato che le cellule tumorali mescolate a CTL VK3-20-specifici non sono in grado di produrre crescita neoplastica, a differenza di cellule DG-75 da sole.
- Nel modello Hu-PBL-SCID è stata dimostrata la capacità della vaccinazione con IFN-DC pulsate con VK3-20 di indurre una buona risposta di tipo cellulare sia per i CD8+ che per i CD4+, soprattutto a seguito dell'immunizzazione con VK3-20-KLH, che si è rivelato l'immunogeno più potente.
- È stata dimostrata la capacità del peptide VK3-20 di indurre l'attivazione delle cellule del sistema innato (monociti, mDC e pDC), sia in soggetti di controllo che HCV+, momento propedeutico essenziale per l'induzione a valle del sistema immunitario adattativo specifico.

Il progetto prevede inoltre l'identificazione di sottogruppi di neoplasie linfoidi caratterizzate dall'espressione di Id ad elevata omologia di sequenza, finalizzata allo sviluppo di vaccini “subset-specifici”. La caratterizzazione delle sequenze dei geni IgVH e IgVL inserite nel database dedicato supporta il ruolo di proteine idiotipiche VKIII quali bersagli immunologici di rilevanza terapeutica per diversi disordini linfoproliferativi quali: crioglobulinemia e NHL HCV+, NHL associati ad autoimmunità, NHL della zona marginale non associati ad HCV.

L'analisi di una casistica di leucemie linfatiche croniche (CLL) comprendente più di 1500 casi ha mostrato come il gene IGV1-69 sia il più frequentemente utilizzato suggerendo come tale proteina idiotipica sia di potenziale rilevanza immunoterapeutica in quanto utilizzabile per

scopi vaccinali in un numero relativamente ampio di pazienti. Gli esperimenti finora eseguiti hanno dimostrato che anche IGV1-69 è in grado di indurre CTL specifici *ex vivo* da donatori sani. Sono stati inoltre identificati preliminarmente 21 putativi epitopi CTL di IGV1-69 e sono in corso esperimenti tesi ad effettuarne la validazione. È stata disegnata una sequenza “consensus” di IGV1-69 sulla base delle variazioni interpaziente e tenendo conto degli epitopi CTL identificati. Tale sequenza non comprende il CDR3 che mostra maggiore variabilità. Sono stati costruiti vettori per l'espressione della consensus di IGV1-69 in associazione o meno al CDR3 derivato da un NHL HCV+, che sono stati trasferiti al Partner Industriale esterno per produzione e purificazione delle proteine ricombinanti.

Il database disponibile ha inoltre consentito l'individuazione di nuovi marcatori prognostici per le CLL, ad esempio immunofenotipici (es. CD49d), citogenetici (es. coinvolgenti il gene p53), ecc. Sono stati inoltre affrontati i seguenti argomenti: i) caratterizzazione molecolare del sottogruppo di CLL a cattiva prognosi caratterizzato dall'espressione del gene IGHV3-21; ii) identificazione dell'impatto prognostico e caratterizzazione molecolare del sottogruppo esprimente il gene IGHV3-23; nell'ambito di tale progetto, è stato definito come il profilo genico globale delle CLL IGHV3-23 sia legato alla modulazione dell'espressione di specifici miR; la messa a punto di “miR profile” rappresenterà un obiettivo futuro per questa progettualità; iii) caratterizzazione dei profili di espressione genica associati a resistenza delle cellule di CLL ad attivatori non genotossici di p53 (es. Nutlin-3).

Al fine di valutare se l'inibizione di hTERT è in grado di sensibilizzare cellule di linfoma all'effetto litico di effettori immuni specifici per antigeni idiotipici, sono stati sviluppati e validati siRNA costituiti da oligonucleotidi anti-hTERT e vettori retrovirali esprimenti short hairpin contro hTERT mRNA.

Nell'ambito di questo progetto è stato pubblicato l'opuscolo per i pazienti “Crioglobulinemia mista”, a cura del GISC (Gruppo Italiano per lo Studio delle Crioglobulinemie)

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Benedetti D, Bomben R, Dal-Bo M, Marconi D, Zucchetto A, Degan M, Forconi F, Del-Poeta G, Gaidano G, Gattei V. Are surrogates of IGHV gene mutational status useful in B-cell chronic lymphocytic leukemia? The example of Septin-10. *Leukemia* 2008;22(1):224-6.
2. Bobisse S, Tisato V, Rondina MB, Merlo A, Amendola M, Naldini L, Willemsen RA, Debets R, Zanovello P, Rosato A. Reprogramming T lymphocytes for melanoma adoptive immunotherapy by T-cell receptor gene transfer with lentiviral vectors. *Cancer Res* 2009;69(24):9385-94.
3. Boffetta P, Dolcetti R. Infectious etiopathogenesis of extranodal lymphomas. In: Cavalli F, Stein H, Zucca E (Ed.). *Extranodal lymphomas*. London, New York: Informa Healthcare; 2008. p. 24-33.
4. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Benedetti D, Marconi D, Zucchetto A, Forconi F, Maffei R, Ghia EM, Laurenti L, Bulian P, Del Principe MI, Palermo G, Thorselius M, Degan M, Campanini R, Guarini A, Del PG, Rosenquist R, Efremov DG, Marasca R, Foa R, Gaidano G, Gattei V. Comprehensive characterization of IGHV3-21-expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia: an Italian multicenter study. *Blood* 2007;109(7):2989-98.
5. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Francesco Forconi F, Maffei R, Laurenti L, Rossi D, Del Principe MI, Zucchetto A, Bretoni F, Rossi FM, Bulian P, Cattarossi I, Ilariucci F, Sozzi E, Spina V, Zucca E, Degan M, Lauria F, Del Poeta G, Efremov DG, Marasca R, Gaidano G, Gattei V.

- Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicenter study. *Br J Haematol* 2009;144(4):492-506.
6. Bulian P, Gaidano G, Del PG, Gattei V. CD49d expression in chronic lymphocytic leukemia: a prognostic parameter and a therapeutic target. *Future Oncol* 2008;4(3):355-8.
 7. Caggiari L, Cannizzaro R, De Zorzi M, Canzonieri V, Da Ponte A, De Re V. A new HLA-A*680106 allele identified in individuals with celiac disease from the Friuli area of northeast Italy. *Tissue Antigens* 2008;72(5):491-2.
 8. Caggiari L, De Zorzi M, Ahlenstiel G, Rehmann B, De Re V. Identification of new MHC-A, -B, -C alleles in Pan troglodytes. *Tissue Antigens* 2008;72(1):79-83.
 9. Caggiari L, Rehmann B, Folgori A, De Re V. Identification of four novel MHC-C alleles in chimpanzees. *Tissue Antigens* 2007;70(1):78-9.
 10. Dal Bo M, Bretoni F, Forconi F, Zucchetto A, Bomben R, Marasca R, Deraglio S, Laurenti L, Efremov DG, Gaidano G, Del PG, & Gattei V. Intrinsic and extrinsic factors influencing the clinical course of B-cell chronic lymphocytic leukemia: prognostic markers with pathogenetic relevance. *J Transl Med* 2009;7:76.
 11. De Re V, Caggiari L, De Vita S, Mazzaro C, Lenzi M, Galli M, Monti G, Ferri C, Zignego AL, Gabrielli A, Sansonno D, Dammacco F, Libra M, Sacchi N, Talamini R, Spina M, Cannizzaro R, Guidoboni M, Dolcetti R. Genetic insights into the disease mechanisms of type II mixed cryoglobulinemia induced by hepatitis C virus. *Digest Liver Dis* 2007;39 Suppl 1:S65-S71.
 12. De Re V, Caggiari L, Dolcetti R, De Zorzi M, Simula MP, Toffoli G (GICAT). Immunogenetica delle linfoproliferazioni HCV-associate: il ruolo dell'HLA di classe II. In: *Tumori ed infezione da HIV. Tumori non-diagnostici per AIDS*. (Sezione Tumori della popolazione generale indotti da agenti infettivi). (GICAT Monografia 12). Milano: BIOMEDIA Editore; 2007.
 13. De Re V, Caggiari L, Simula MP, De Vita S, Sansonno D, Dolcetti R. B-cell lymphomas associated with HCV infection. *Gastroenterology* 2007;132(3):1205-7.
 14. De Re V, Caggiari L, Simula M.P, De Vita S, Mazzaro C, Lenzi M, Massimo GM, Monti G, Ferri C, Zignego AL, Gabrielli A, Sansonno D, Dammacco F, Libra M, Sacchi N, Talamini R, Spina M, Tirelli U, Cannizzaro R, Dolcetti R. Role of the HLA class II: HCV-related disorders. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1107:308-18.
 15. De Re V, Caggiari L, Simula MP, De Vita S, Sansonno D, Dolcetti R. B-cell lymphomas associated with HCV infection. *Gastroenterology* 2007;132(3):1205-7.
 16. De Re V, De Vita S, Sansonno D, Toffoli G. Mixed cryoglobulinemia syndrome as an additional autoimmune disorder associated with risk for lymphoma development. *Blood* 2008;15:111(12):5760.
 17. De Re V, Sansonno D, De Paoli P, Geremia S, Gatti P, Caggiari L, Simula MP, Toffoli G. Recent patents relating to HCV molecules like putative targets for therapeutic intervention. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* 2007;1(3):186-94.
 18. De Re V, Simula MP, Caggiari L, Orzes N, Spina M, Da Ponte A, De Appollonia L, Dolcetti R., Canzonieri V, Cannizzaro R. Proteins specifically hyperexpressed in a coeliac disease patient with aberrant T cells. *Clin Exp Immunol* 2007;148(3):402-9.
 19. De Re V, Simula MP, Cannizzaro R, Sansonno D, Canzonieri V, Gloghini A, Carbone A, Colombatti A, Marin MD, De Zorzi M, Toffoli G. HCV Inhibits antigen processing and presentation and induces oxidative stress response in gastric mucosa. *Proteomics clinical application* 2008;2:1290-9.
 20. De Re V, Simula MP, Pavan A, Garziera M, Marin D, Dolcetti R, de Vita S, Sansonno D, Geremia S, Toffoli G. Characterization of antibodies directed against the immunoglobulin light kappa chain variable chain region (VK) of hepatitis C virus-related type-II mixed cryoglobulinemia and B-cell proliferations. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1173:152-60.

21. De Zorzi M, Caggiari L, Ahlenstiel G, Rehmann B., De Re V. Description of two new MHC class II DRB1 [Pan troglodytes (Patr)-DRB1] alleles. *Tissue Antigens* 2008;71(5):490-2.
22. Forconi F, Rinaldi A, Kwee I, Sozzi E, Raspadori D, Rancoita PM, Scandurra M, Rossi D, Deambrogi C, Capello D, Zucca E, Marconi D, Bomben R, Gattei V, Lauria F, Gaidano G, Bertoni F. Genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion. *Br J Haematol* 2008;143(4):532-6.
23. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, Bomben R, Dal-Bo M, Luciano F, Rossi FM, Degan M, Amadori S, Del PG. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;111(2):865-73.
24. Libra M, Gloghini A, Malaponte G, Gangemi P, De Re V, Zignego AL, Spandidos DA, Nicoletti F, Stivala F, Carbone A. Prevalence of t(14;18) IGH-BCL2 translocation in mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. *J Hepatol* 2008;49(2):170-4.
25. Libra M, Navolanic PM, Nicoletti F, De Re V, Mazzarino MC. Rituximab for treatment of lymphoproliferative disorders associated with hepatitis C virus (HCV) infection. In: Bonavida B (Ed.). *Rituximab-mediated molecular signaling and interaction with chemotherapeutic drugs*. Trivandrum (India): Research Signpost; 2007. p. 19-32.
26. Martorelli D, Houali K, Caggiari L, Vaccher E, Barman L, Franchin G, Gloghini A, Pavan A, Da Ponte A, Tedeschi RM, De Re V, Carbone A, Ooka T, De Paoli P, Dolcetti R. Spontaneous T cell responses to Epstein-Barr Virus-encoded BARF1 protein and derived peptides in patients with nasopharyngeal carcinoma: bases for improved immunotherapy. *Int J Cancer* 2008;123(5):1100-7.
27. Merlo A, Turrini R, Bobisse S, Zamarchi R, Alaggio R, Dolcetti R, Zanovello P, Amadori A, Rosato A. EBV-specific cytotoxic CD4+ T cells: a potential new tool to improve the treatment of EBV-related tumors. (inviato per la pubblicazione).
28. Merlo A, Turrini R, Dolcetti R., Zanovello P, Amadori A, Rosato A. Adoptive cell therapy against EBV-related malignancies: a survey of clinical results. *Expert Opin Biol Th* 2008;8(9):1265-94.
29. Montrone M, Martorelli D, Rosato A, Dolcetti R. Retinoids as critical modulators of immune functions: new therapeutic perspectives for old compounds. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009;9(2):113-31.
30. Pasini E, Caggiari L, Dal Maso L, Martorelli D, Guidoboni M, Vaccher E, Barzan L, Franchin G, Gloghini A, De Re V, Sacchi N, Serraino D, Carbone A, Rosato A, Dolcetti R. Undifferentiated nasopharyngeal carcinoma from a nonendemic area: protective role of HLA allele products presenting conserved EBV epitopes. *Int J Cancer* 2009;125(6):1358-64.
31. Pavan A, Spina M, Canzonieri V, Sansonno S, Toffoli G, De Re V. Recent prognostic factors in Diffuse Large B-Cell lymphoma indicate NF-kB pathway as a target for new therapeutic strategies. *Leukemia and Lymphoma* 2008;49(11):2048-58.
32. Quartuccio L, Fabris M, Salvin S, Isola M, Soldano F, Falletti E, Beltrami CA, De Re V, De Vita S. Bone marrow B-cell clonal expansion in type II mixed cryoglobulinaemia: association with nephritis. *Rheumatology* 2007;46(11):1657-61.
33. Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, De PL, Cresta S, Rasi S, Spina V, Franceschetti S, Lunghi M, Vendramin C, Bomben R, Ramponi A, Monga G, Conconi A, Magnani C, Gattei V, Gaidano G. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 2008;142(2):202-15.
34. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, De Paoli L, Spina V, Gattei V, Capello D, Forconi F, Lauria F, Gaidano G. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 2009;15(3):995-1004.

35. Rossi D, Spina V, Cerri M, Rasi S, Deambrogi C, De Paoli L, Laurenti L, Maffei R, Forconi F, Bretoni F, Zucca E, Agostinelli C, Cabras A, Ludioni M, Martini M, Magni M, Deraglio S, Ladetto M, Nomdedeu JF, Besson C, Ramponi A, Canzonieri V, Paulli M, Marasca R, Larocca LM, Carbone A, Pileri SA, Gattei V, Gaidano G. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res* 2009;15(13):4415-22.
36. Rossi D, Zucchetto A, Rossi FM, Capello D, Cerri M, Deambrogi C, Cresta S, Rasi S, De PL, Lobetti BC, Bulian P, Del PG, Ladetto M, Gattei V, Gaidano G. CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2008;93(10):1575-9.
37. Sansonno D, Carbone A, De Re V, Dammacco F. Hepatitis C virus infection, cryoglobulinaemia, and beyond. *Rheumatology* 2007;46(4):572-8.
38. Sansonno D, Tucci FA, Lauletta G, De Re V, Montrone M, Troiani L, Sansonno L, Dammacco F. Hepatitis C virus productive infection in mononuclear cells from patients with cryoglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 2007;147(2):241-8.
39. Sansonno D, Tucci FA, Lauletta G, Troiani L, Gatti P, De Re V, Conteduca V, Chironna M, Sansonno S, Dammacco F. Combined interferon-ribavirin, and rituximab management of hepatitis c virus-related mixed cryoglobulinemia. A long-term study. (inviato per la pubblicazione).
40. Secchiero P, Melloni E, di Iasio MG, Tiribelli M, Rimondi E, Corallini F, Gattei V, Zauli G. Nutlin-3 up-regulates the expression of Notch1 in both myeloid and lymphoid leukemic cells, as part of a negative feedback antiapoptotic mechanism. *Blood* 2009;113(18):4300-8.
41. Simula MP, Caggiari L, Gloghini A, De Re V. HCV-related immunocytoma and type II mixed cryoglobulinemia-associated autoantigens. *Ann Ny Acad Sci* 2007;1110:121-30.
42. Spessotto P, Zucchetto A, Degan M, Wasserman B, Danussi C, Bomben R, Perris R, Canzonieri V, Radillo O, Colombatti A, Gattei V. Laminin-332 (Laminin-5) is the major motility ligand for B cell chronic lymphocytic leukemia. *Matrix Biol* 2007;26(6):473-84.
43. Terrin L, Trentin L, Degan M, Corradini I, Bertorelle R, Carli P, Maschio N, Bo MD, Noventa F, Gattei V, Semenzato G, De RA. Telomerase expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia predicts survival and delineates subgroups of patients with the same igVH mutation status and different outcome. *Leukemia* 2007;21(5):965-72.
44. Zauli G, di Iasio MG, Secchiero P, Dal Bo M, Marconi D, Bomben R, Del PG, Gattei V. Exposure of B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells to nutlin-3 induces a characteristic gene expression profile, which correlates with nutlin-3-mediated cytotoxicity. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9(4):510-8.
45. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D, Bossi F, Lorenzon D, Degan M, Rossi FM, Rossi D, Bulian P, Franco V, Del PG, Deaglio S, Gaidano G, Tedesco F, Malavasi F, Gattei V. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* 2009;69(9):4001-9.

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

Enrico Proietti

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

Base di partenza e 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 ancora insoddisfacente.

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

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

L’immunoterapia adottiva è una strategia terapeutica basata sull’infusione di elevate quantità di cellule attivate *ex vivo* con IL-2 (LAK) insieme alla somministrazione di alte dosi di IL-2. Sebbene questa strategia sia stata in grado di indurre regressioni tumorali in una piccola frazione di pazienti con melanoma metastatico, ad essa si associa una considerevole tossicità. È soprattutto rilevante il contributo della chemioterapia linfoablativa, non mieloablativa, 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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

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

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

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

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Sulla base di esperienze recenti è stato possibile riconsiderare l’uso di alcuni chemioterapici non più soltanto per i loro effetti diretti sulla cellula tumorale ma anche per gli effetti sull’organismo ed in particolare sul sistema emopoietico e linfopoietico. Infatti, 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 soppressiva operata dal tumore nel così detto *cancer immunoediting*, come anche la capacità di promuovere la risposta immunitaria 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).

Il progetto attuale si propone di approfondire la comprensione puntuale di questi meccanismi nell’uomo, attraverso l’applicazione ai pazienti oncologici di nuove strategie di combinazione di chemio e immunoterapia in trial clinici controllati e, in studi in modelli sperimentali di tumore, attraverso la collaborazione indipendente ma complementare di tre Unità Operative composte a loro volta da diversi gruppi di ricerca.

L’UO1 si è assunta l’impegno di svolgere ricerche nell’uomo, mediante studi clinici, e in modelli sperimentali animali in vivo e in vitro. Lo studio clinico che prevedeva la combinazione di chemioterapia con dacarbazina (DTIC) e somministrazione di cellule dendritiche (DC) autologhe provenienti da pazienti con melanoma avanzato (stadio IIb/IVa di malattia) ma resi liberi da tumore, è stato disegnato ed è pronto per essere avviato. Questo studio è stato preceduto, per motivi organizzativi, da uno studio di combinazione di chemioterapia con DTIC e vaccinazione convenzionale basata sull’uso di peptidi di antigeni melanoma-associati. Tale studio fornirà il materiale necessario per definire le migliori modalità di monitoraggio immunologico e per consentire la validazione dell’analisi molecolare mediante *microarray* della modulazione degli mRNA indotta dalla chemioterapia e dalla vaccinazione. La piattaforma per l’analisi mediante *microarray* è stata messa a punto dalla dott.ssa Aricò; contemporaneamente,

studi condotti in modelli animali hanno fornito già risultati sull'azione di geni che controllano i meccanismi di riparazione del DNA (Bignami), sulle condizioni di acidificazione del *milieu* tumorale e dei possibili interventi farmacologici per normalizzarlo (Podo), sull'azione della ciclofosfamide nel ridurre il numero e la funzionalità dei linfociti T regolatori (Doria) e sul coinvolgimento in questa attività del fattore di trascrizione IRF1 (Battistini).

L'UO2 è costituita da un gruppo interdisciplinare che vede la stretta collaborazione tra la Dermatologia Oncologica ISG (Catricalà), l'UO clinica dell'Oncologia Medica A (Ferraresi) e l'Unità del Laboratorio di Immunologia dell'Istituto Regina Elena per la cura dei tumori (Nisticò), che ha l'obiettivo di reclutare pazienti di melanoma III/IV stadio, da trattare con terapie combinate di DTIC e immunoterapia. Dalla correlazione tra l'attività funzionale di centinaia di cloni e l'analisi delle sequenze della catena beta del TCR, eseguita sia a livello della risposta spontanea che in quella indotta dai due diversi trattamenti, abbiamo dimostrato che l'inoculo della DTIC un giorno prima della vaccinazione è in grado di diversificare il repertorio dei linfociti CD8+ Melan-A-specifici, e che tale evento è correlabile ad una migliore risposta clinica. Sono in corso studi volti a individuare criteri di predittività di risposta clinica a terapie vaccinali o a terapie combinate, mediante la valutazione del repertorio spontaneo dei pazienti. Inoltre, il gruppo della Dott.ssa Franzese dell'Università Tor Vergata, afferente a questa UO, sta studiando il ruolo della senescenza nelle sottopopolazioni linfocitarie dei pazienti neoplastici e ha verificato come la perdita progressiva di due marcatori, CD28 e CD27, è correlata ad una progressiva erosione dei telomeri delle cellule linfocitarie e ad una marcata riduzione della capacità proliferativa in seguito a stimolazione antigenica. Tali eventi funzionali sono caratterizzati a livello biochimico da una difettiva fosforilazione di Akt e di hTERT. Tali saggi potranno essere utilizzati anche per lo studio della senescenza di alcuni cloni rappresentativi Melan-A-specifici e gp100-specifici, isolati dai pazienti trattati con terapia combinata di chemio/vaccinazione.

L'UO3 si è posta la finalità di verificare l'attività immunomodulatoria della chemioterapia e la possibilità di utilizzarla per migliorare i risultati clinici della immunoterapia con particolare riferimento al trasferimento adottivo di linfociti. Il gruppo della Dott.ssa Rivoltini (INT, Milano) ha studiato gli effetti clinici della ciclofosfamide a basse dosi (CTX, 300 mg/mq) sulla frequenza e sulla attività delle cellule Tregs in pazienti con melanoma metastatico nell'ambito di uno studio clinico di fase I-II di immunoterapia attiva con vaccino peptidico: i risultati hanno mostrato che la somministrazione di CTX non riduce le Tregs nel sangue periferico, mentre la frequenza di Tregs si riduce significativamente nei linfonodi drenanti. Le conclusioni preliminari di questo studio sono che la frequenza di Tregs nel sangue periferico non può essere considerata un fattore predittivo di risposta, e che sono necessarie ulteriori indagini sull'effetto di Tregs in altre sedi anatomiche, inclusi i linfonodi drenanti.

Il secondo gruppo (M. Bregni, OSG, Milano) aveva come obiettivo la messa a punto di un protocollo clinico di immunoterapia adottiva in pazienti con carcinoma del colon-retto e dell'ovaio con linfociti autologhi selezionati ed espansi *ex vivo*, somministrati dopo chemioterapia linfoablattiva (CTX e fludarabina). In questo caso la chemioterapia ha il duplice scopo di eliminare le Tregs e di mettere a disposizione delle cellule infuse le citochine omeostatiche (IL-2, IL-7), per permettere la loro crescita ed espansione in vivo. Lo studio in oggetto si propone di utilizzare linfociti dal sangue periferico anziché TIL, secondo una metodica già studiata dal gruppo di Pavia (Montagna *et al.*, Int J Immunogenet 2008;35(4-5):389-93), e di lavorare su tumori solidi non-melanoma. Anche in questo caso, come nello studio dell'INT, è previsto un monitoraggio immunologico per verificare l'effetto della chemioterapia sulle sottopopolazioni linfocitarie e sulle Tregs. Negli esperimenti preliminari il gruppo ha lavorato sulla messa a punto delle condizioni di isolamento e coltura delle cellule del tumore primarie, e ha completato il protocollo da sottoporre al Comitato Etico dell'Ospedale

San Giuseppe nel gennaio 2010. Il terzo gruppo (M. Rescigno, IEO, Milano) ha lavorato sulla messa a punto di un modello di tumore spontaneo di carcinoma del colon-retto e ne ha studiato l'infiltrato linfocitario, con l'obiettivo di utilizzare questo modello in esperimenti di immunoterapia attiva con *Salmonella typhimurium*.

In conclusione, il lavoro svolto finora ha già prodotto una mole consistente di informazioni necessarie alla comprensione dei meccanismi con cui il trattamento con chemioterapici sinergizza con la immunoterapia. Gli studi clinici per trasferire tali conoscenze nell'uomo sono in fase avanzata di realizzazione. L'insieme delle attività di ricerca svolte è in linea con quanto previsto nel progetto.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

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

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

Pier Giuseppe Pelicci

Dipartimento di Oncologia Sperimentale, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

Base di partenza e razionale

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

– Inibitori delle tirosino-chinasi

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

– Inibitori delle istone-deacetilasi

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

L'attività sperimentale sarà articolata in tre fasi:

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Obiettivo di questo programma di ricerca è l'identificazione di marcatori biologici e molecolari di predizione della risposta clinica ad inibitori di istone-deacetilasi, tirosino-chinasi e pompe ioniche in selezionati tipi di tumore.

1. Risposta agli HDACi in tumori mammari e melanomi

Il nostro studio su carcinomi mammari umani ha stabilito l'esistenza di una correlazione tra stato di acetilazione degli istoni e la sensibilità al trattamento con inibitori di istone deacetilasi (HDACi). I tumori acetilati sono risultati essere resistenti all'azione degli HDACi mentre quelli ipoacetilati sono risultati sensibili. Abbiamo analizzato il profilo di espressione genico di 100 diversi campioni di tumori mammari primari. L'analisi bioinformatica ha individuati meno di dieci geni sufficienti a discriminare la sensibilità dei tumori all'azione degli HDACi. La messa a punto dei reagenti per silenziare le diverse HDAC di classe I è stata ultimata e stiamo conducendo esperimenti preliminari di valutazione. Stiamo inoltre testando HDACi su mammosfere murine ed esaminando modelli murini HDAC-/-.

Stiamo continuando la caratterizzazione dei melanomi metastatici *in vitro* per avere validi modelli sperimentali su cui testare l'attività degli HDACi. I nostri risultati indicano una consistente e inattesa omogeneità di capacità tumorigenica delle cellule del melanoma metastatico che verrà approfondita.

2. *Risposta agli HDACi in glioblastomi*

Abbiamo esteso gli studi *in vitro* sugli effetti dell'HDACi SAHA in linee di neurosfere da glioblastoma confermando in tutti i casi un'inibizione della formazione di neurosfere, una riduzione significativa dell'espressione di CD133 e la riduzione di EZH2 nel 90% delle linee cellulari caratterizzate. Anche i livelli di espressione genica delle altre componenti del complesso PRC2 erano ridotti in tutte le linee analizzate ad eccezione di quella senza riduzione di EZH2. Infettando una linea di neurosfere con shRNA diretto contro EZH2 abbiamo osservato una riduzione del 70% dell'espressione di EZH2, con riduzione sia di CD133 che di HDAC1. L'inoculo di queste cellule in modelli murini non ha però mostrato differenze significative di sopravvivenza, i tumori derivati sono però fenotipicamente differenti e le indagini immunoistochimiche mostrano il 90% delle cellule positive per EZH2 nelle cellule di controllo e un 40% di cellule positive nel tumore da cellule silenziate.

Abbiamo anche effettuato studi di cDNA microarray su tre linee di neurosfere da glioblastoma dopo trattamento con SAHA per identificare modifiche ai pattern di espressione genica. Abbiamo identificato 42 geni target del complesso PRC2 la cui espressione si modifica di almeno due volte dopo trattamento con SAHA: valuteremo questi dati a livello di gene-expression in cellule trattate con SAHA e mediante esperimenti di ChIP in neurosfere di GBM.

3. *Rai e glioblastomi*

Per determinare il ruolo di Rai nella propagazione del tumore *in vivo*, abbiamo trapiantato in topi immunodeficienti cellule di controllo esprimenti Rai e cellule interferite per la proteina. Tutti gli animali inoculati con cellule non infettate e cellule di controllo hanno formato tumori con le caratteristiche di un glioblastoma. Al contrario, l'inoculo di cellule interferite per Rai ha ritardato la comparsa di sintomi neurologici e aumentato significativamente la sopravvivenza dei topi sottoposti ad inoculo. Il silenziamento genico di Rai sembra perciò ridurre il potenziale tumorigenico di cellule staminali/progenitori isolate da glioblastomi umani. Tumori estesi e infiltranti sono stati evidenziati in tutti gli animali inoculati con cellule di controllo; gli animali inoculati con cellule interferite per Rai non mostrano segni di tumore o presentano solo piccole masse localizzate nell'emisfero di inoculo. In assenza di Rai, inoltre, i tumori risultano maggiormente differenziati.

4. *Regolazione farmacologica di Itch and p73*

Abbiamo studiato gli effetti dell'inibitore delle HDAC LBH589 sui livelli della ligasi Itch e p73 nelle leucemie linfocitiche croniche (CLL). Abbiamo identificato un meccanismo che coinvolge l'E3 ubiquitina ligasi SCF^{FBXO45} nella degradazione di p73 dimostrando che FBXO45 controlla la stabilità proteica di p73 *in vivo*; il suo silenziamento induce morte in maniera p53-indipendente. Abbiamo dimostrato che l'enzima de-ubiquitinasi USP47 interagisce col complesso SCF^{Trcp} la cui deplezione sensibilizza diverse linee tumorali all'apoptosi indotta da agenti genotossici e che miR-217, regolando SirT1, è marcatore di aging. Inoltre il silenziamento di RAD51 incrementa la sensibilità alla bleomicina.

5. *Inibitori delle tirosino chinasi*

È stata studiata l'attività antiproliferativa di inibitori specifici di TRK (Gefitinib, Sorafenib) e mTOR (RAD001). Il trattamento singolo con Sorafenib ha un'elevata attività citotossica mentre il trattamento combinato con RAD001 seguito da Sorafenib induce un marcato effetto sinergico, suggerendo nuovi approcci terapeutici combinati.

Si è valutato *in vitro* su cellule COS1 transfettate transientemente, il profilo di risposta di KIT-L567P a imatinib, sunitinib, nilotinib, erlotinib, sorafenib, dasatinib e costruito il vettore di espressione KIT-L567P/V654A (un'altra mutazione KIT imatinib-resistente) per studiare l'effetto congiunto delle due mutazioni.

Il potenziale terapeutico dell'attività multitarget dell'inibitore tirosin-chinasico RPI-1 è stato esaminato in linee di mieloma multiplo esprimenti il recettore FGF-R3 osservando una inibizione dei processi di proliferazione/sopravvivenza dipendenti da FGF-R3, JAK2 e BCMA, con possibili implicazioni terapeutiche.

6. *Trabectedin nei liposarcomi mixoidi*

Il farmaco ET-743 è stato recentemente registrato in Europa per i liposarcomi mixoidi (MLS). Per validare l'ipotesi che il trascritto FUS-CHOP sia il bersaglio del farmaco, sono stati fatti studi di suscettibilità a ET-743 *in vitro* con linee cellulari transfettate e non con il trascritto. Studi *in vivo* di risposta al farmaco sono stati condotti con xenotrapianti di MLS che presentano tipi diversi di FUS-CHOP. Il farmaco riduce la produzione della proteina infiammatoria PTX3, prodotta ad alti livelli nei MLS, specificatamente nei tumori FUS-CHOP positivi, ma non in liposarcomi senza trascritto e in cellule normali PTX3. PTX3, quindi, si configura come marcatore biologico dell'attività di ET-743 in MLS trascritto-positivi.

7. *Inibitori di pompa protonica (PPI)*

L'effetto antineoplastico dei PPI è prevalentemente acido-dipendente e la somministrazione *in vivo* in topi SCID con melanomi umani porta ad una inibizione della crescita tumorale, con profonda alterazione dei gradienti di pH al livello della neoplasia e un incremento del 100% della sopravvivenza degli animali trattati. Lo studio clinico in pazienti con melanoma ha concluso la fase di arruolamento; quello in pazienti con osteosarcoma è stato prorogato per verificare su un numero maggiore di pazienti l'incremento di buone risposte osservato al raddoppiamento della dose di PPI ed è stato recentemente attivato uno studio su pazienti con recidive da carcinoma mammario.

Publicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Airolidi I, Di Carlo E, Cocco C, Caci E, Cilli M, Sorrentino C, Sozzi G, Ferrini S, Vicente Galiotta JL, Ribatti D, Pistoia V. Targeting of IL-12 to human non small cell lung cancer counters tumors growth *in vivo*. *PlosOne* 2009;4(7):6119.
2. Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18(1):3-10.
3. Bertolini G, Luca Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti E, Pratesi G, Fabbri A, Andriani F, Tinelli S, Roz E, Caserini R, Lo Vullo S, Camerini T, Mariani L, Delia D, Calabrò E, Pastorino U, Sozzi G. Highly tumorigenic lung cancer CD133 positive cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(38):16281-6.

4. Bruzzone MG, Eoli M, Cuccarini V, Grisoli M, Valletta L, Finocchiaro G. Genetic signature of adult gliomas and correlation with MRI features. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9(7):709-20.
5. Cassinelli G, Favini E, Degl'Innocenti D, Salvi A, De Petro G, Pierotti MA, Zunino F, Borrello M.G, Lanzi C. RET/PTC1-driven neoplastic transformation and proinvasive phenotype of human thyrocytes involve Met induction and β -catenin nuclear trans location. *Neoplasia* 2009;11:10-21.
6. Cassinelli G, Ronchetti D, Laccabue D, Mattioli M, Cuccuru G, Favini E, Nicolini V, Greco A, Neri A, Zunino F, Lanzi C. Concomitant downregulation of proliferation/survival pathways dependent on GFG-R3, JAK2 and BCMA in human multiple myeloma cells by multi-kinase targeting. *Biochem Pharmacol* 2009;78:1139-47.
7. Cincinelli R, Cassinelli G, Dallavalle S, Lanzi C, Merlini L, Botta M., Tuccinardi T, Martinelli A, Penco S, Zunino F. Synthesis, modeling, and RET protein kinase inhibitory activity of 3- and 4-substituted β -carboline-1-ones. *J. Med. Chem* 2008; 51:7777-87.
8. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30(7):1073-81.
9. Dallavalle S, Cincinelli R, Nannei R, Merlini L, Morini G, Penco S, Pisano C, Vesce L, Barbarino M, Zuco V, De Cesare M, Zunino F. Design, synthesis, and evaluation of biphenyl-4-yl-acrylohydroxamic acid derivatives as histone deacetylase (HDAC) inhibitors. *Eur J Med Chem* 2009;44:1900-12.
10. De Milito A, Canese, Marino ML, Iero M, Villa A, Borghi M, Venturi G, Lozupone F, Iessi E, Logozzi M, Della Mina P, Santinami M, Rodolfo M, Podo F, Rivoltini L, Fais S. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer* 2009 Oct 28 (online prima della stampa). prima della stampa).
11. Di Micco R, Sulli G, Dobrev M, Lontos M, Botrugno O, Dal Zuffo R, d'Ario G, Montani E, Mercurio C, Hahn WC, Gorgoulis V, Minucci S, d'Adda di Fagagna F. Interplay between oncogene-induced DNA Damage Response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nature* (inviato per la pubblicazione).
12. Gatti L, Beretta GL, Cossa G, Zunino F, Perego P. ABC transporters as potential targets for modulation of drug resistance. *Mini-Rev Med Chem* 2009;9:1102-12.
13. Hulleman E, Quarto M, Vernell R, Masserdotti G, Colli E, Kros JM, Levi D, Gaetani P, Tunici P, Finocchiaro G, Baena RR, Capra M, Helin K. A role for the transcription factor HEY1 in glioblastoma. *J Cell Mol Med* 2009;13(1):136-46.
14. Laghi L, Bianchi P, Miranda E, Balladore E, Pacetti V, Grizzi F, Allavena P, Torri V, Repici A, Santoro A, Mantovani A, Roncalli M, Malesci A. CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *Lancet Oncol* 2009;10(9):877-84.
15. Lanzi C, Cassinelli G, Nicolini V, Zunino F. Targeting RET for thyroid cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2009;77:297-309.
16. Lozupone F, Perdicchio M, Brambilla D, Borghi M, De Milito A, Meschini S, Barca S, Marino ML, Logozzi M, Federici C, Iessi E, Fais S. The human homologue of Dictyostelium discoideum phg1A is expressed by human metastatic melanoma cells. *EMBO Rep* 2009;10(12):1348-54.
17. Magnifico A, Albano L, Delia D, Castiglioni F, Campaner S, Fontanella E, Ménard S, Tagliabue E. Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to Trastuzumab. *Clin Cancer Res* 2009;15(6):2010-21.
18. Martelli MP, Sozzi G, Hernandez L, Pettirossi V, Navarro A, Conte D, Gasparini P, Perrone F, Modena P, Pastorino U, Carbone A, Fabbri A, Sidoni A, Nakamura S, Gambacorta M, Fernández PL, Ramirez J, Chan JKC, Grigioni Wf, Campo E, Pileri SA, Falini B. EML4-ALK rearrangement in non-mall cell lung cancer and non-tumor lung tissues. *Am J Pathol* 2009;174(2):661-70.

19. Mellai M, Caldera V, Annovazzi L, Chiò A, Lanotte M, Cassoni P, Finocchiaro G, Schiffer D. MGMT promoter hypermethylation in a series of 104 glioblastomas. *Cancer Genomics Proteomics* 2009;6(4):219-27.
20. Menghini R, Casagrande V, Cardellini M, Martelli E, Terrinoni A, Amati F, *et al.* MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1. *Circulation* 2009;120:1524-32.
21. Paradiso A, Mangia A, Orlando C, Verderio P, Belfiglio M, Marchetti A, Bertario L, Chiappetta G, Gion M, *et al.* The Integrated Oncology Program of the Italian Ministry of Health. Analytical and clinical validation of new biomarkers for early diagnosis: network, resources, methodology, quality control, and data analysis. *Int J Biol Markers* 2009;24(3):119-29.
22. Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, de Milito A, Coscia C, Iessi E, Logozzi MA, Molinari A, Colone M, Tatti M, Sargiacomo M, Fais S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* 2009;284(49):34211-22.
23. Pasini L, Turco MY, Luzi L, Aladowicz E, Fagiani E, Lanfrancone L. Melanoma: targeting signaling pathways and RaLP. *Expert Opin Ther Targets* 2009;13(1):93-104.
24. Passarella D, Comi D, Vanossi A, Paganini G, Colombo F, Ferrante L, Zuco V, Danieli B, Zunino F. Histone deacetylase and microtubules as targets for the synthesis of releasable conjugate compounds. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:6358-63.
25. Perrone F, Da Riva L, Orsenigo M, Losa M, Jocollè G, Millefanti C, Pastore E, Gronchi A, Pierotti MA, Pilotti S. PDGFRA, PDGFRB, EGFR and downstream signalling activation in malignant peripheral nerve sheath tumour. *Neuro Oncology* 2009;11(6):725-36.
26. Peschiaroli A, Scialpi F, Bernassola F, Pagano M, Melino G. The F-box protein FBXO45 promotes the proteasome-dependent degradation of p73. *Oncogene* 2009;28(35):3157-66.
27. Peschiaroli A, Skaar J, Pagano M, Melino G. The ubiquitin-specific protease USP47 is a novel beta-TRCP regulating cell survival. *Oncogene* 2009 (in corso di stampa).
28. Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Grazia Totaro M, Allavena P, Mantovani A, Sica A. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* 2009;214(9-10):761-77.
29. Rivetti di Val Cervo P, Tucci P, Majid A, Lena MA, Agostini M, Bernardini S, Candi E, Cohen G, Nicotera P, Dyer MJ, Melino G. p73, miR106b, miR34a, and Itch in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113(25):6498-9.
30. Rossi M, Inoue S, Walewska R, Knight RA, Dyer MJ, Cohen GM, Melino G. Caspase cleavage of Itch in chronic lymphocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;379(3):659-64.
31. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009;86(5):1065-73.
32. Stacchiotti S, Tamborini E, Marrari A, Brich S, Arisi Rota S, Orsenigo M, Crippa F, Morosi C, Gronchi A, Pierotti MA, Casali PG, Pilotti S. Response to sunitinib malate in advanced alveolar soft part sarcoma (ASPS). *Clin Cancer Res* 2009;15(3):1096-104.
33. Tamborini E, Virdis E, Orsenigo M, Arisi Rota S, Brich S, Conca E, Gronchi A, Stacchiotti S, Manenti G, Casali PG, Pierotti MA, Pilotti S. Analysis of receptor tyrosine kinases (RTK) and downstream pathways in chordomas. (inviato per la pubblicazione).
34. Vanoli F, Chiolo I, Robert T, Barlow J, Rothstein R, Oronza A, Botrugno O, Minucci S, Foiani M. Class I and II deacetylases influence the DNA damage response and link double strand break processing with autophagy. *Nature* (inviato per la pubblicazione).
35. Vernole P, Muzi A, Volpi A, Dorio AS, Terrinoni A, Shah GM, *et al.* Inhibition of homologous recombination by treatment with BVDU (brivudin) or by RAD51 silencing increases chromosomal damage induced by bleomycin in mismatch repair-deficient tumour cells. *Mutat Res* 2009;664:39-47.

36. Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Tunici P, Finocchiaro G, Eoli M, Ruckert C, Huynh T, Liu G, Kato M, Sanada M, Jauch A, Dugas M, Black KL, Koeffler HP. High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by single nucleotide polymorphism DNA microarray. *Mol Cancer Res* 2009;7(5):665-77.

IL MICROAMBIENTE TUMORALE COME BERSAGLIO TERAPEUTICO

Alessandro Gianni

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

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi generali del progetto sono:

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

Obiettivi specifici principali del progetto sono:

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

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

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

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

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

SPARC è una proteina della matrice extracellulare il cui gene è differenzialmente espresso in molti tumori. Dati ottenuti in topi knockout (KO) per SPARC e mediante

trapianti di midollo osseo reciproci tra questi e topi wild type hanno identificato ruoli distinti per SPARC prodotto da cellule leucocitarie e dal tumore stesso. L'anticorpo generato in topi KO contro tessuti esprimanti SPARC, pur non riconoscendo SPARC, interferisce con attività biologiche di SPARC. Per esempio, cellule di carcinoma mammario altamente metastatiche producono poche metastasi in topi SPARC KO ma anche in topi trattati con l'anticorpo.

Lo studio dell'interazione melanoma-stroma basato sulla valutazione dell'attività di IL-19 sul profilo di espressione genica dei fibroblasti tumore-associati (TAF) ha dimostrato che il cross-talk tra melanoma e stroma mediato da citochine espresse nel tumore, contribuisce alla produzione, nel microambiente neoplastico, di fattori dell'infiammazione, e che farmaci bersaglio specifici possono inibire questa interazione.

Sono stati eseguiti studi *in vitro* e *in vivo* per valutare la suscettibilità di linee cellulari umane di melanoma metastatico all'apoptosi e/o all'autofagia in condizioni di microambiente sfavorevole e la modulazione farmacologica di questi processi. Gli studi *in vitro* hanno evidenziato che il trattamento con anti-folati, quali la pirimetamina, induce una significativa apoptosi e inibisce il processo autofagico in cellule derivanti da melanoma metastatico. Conferma *in vivo* si è ottenuta studiando topi nudi inoculati con linee cellulari di melanoma umano altamente metastatiche.

È stata valutata la capacità di Trabectedin di inibire la produzione di citochine, chemochine e proteine della matrice. In linee di liposarcoma mixoide, è stato dimostrato che Trabectedin inibisce in modo significativo alcuni mediatori infiammatori (CCL2, CCL5, CXCL8, IL-6, VEGF). *In vivo*, in liposarcomi mixoidi umani trapiantati come xenograft in topi immunodeficienti, Trabectedin riduce CCL2 e CXCL8 nei tumori, così come l'infiltrazione dei macrofagi e la densità dei vasi tumorali. È stata inoltre valutata l'attività anti-angiogenica della cromogranina-A e della vasostatina-1 in saggi basati sull'uso di anelli di aorta di ratto e saggi CAM (chick corioallantoic membrane assay). La cromogranina A è risultata capace di inibire la formazione di capillari indotta da FGF mentre la vasostatina è risultata essere 30 volte meno attiva. La cromogranina circolante, ma non la vasostatina-1, potrebbe svolgere un ruolo rilevante nella regolazione dell'angiogenesi in condizioni normali e patologiche.

È stato approfondito da un punto di vista molecolare il ruolo svolto dall'inibitore del ciclo cellulare p21 nel processo leucemogenico e a caratterizzare le cellule leucemiche quiescenti. Le cellule staminali (*Stem Cells*, CS), sia normali che leucemiche, necessitano di una relativa quiescenza o di una "pausa" nella divisione cellulare. Questa pausa è necessaria alla SC leucemica per riparare, e contenere, l'accumulo di danno al DNA causato dallo stress proliferativo indotto da un oncogene (AML1-ETO e PML-RAR). In assenza di p21 le SC perdono la quiescenza e non sono più in grado di riparare il danno al DNA che si accumula fino a portare alla loro eliminazione. I nostri dati rivelano il potenziale oncogenico di p21, suggerendo come strategia efficace per l'eradicazione delle SC leucemiche poco proliferanti l'inibizione di meccanismi di riparazione del DNA.

È stato indagato il ruolo della chinasi ciclino-dipendente Cdk2 sia in cellule staminali ematopoietiche (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC) che in tumori ematopoietici. In saggi di ripopolazione, non è stato riscontrato alcun difetto/vantaggio delle HSC delete di Cdk2, ma la perdita di Cdk2 sensibilizza vari tipi cellulari, tra i quali i linfociti B, ad una risposta di senescenza dopo attivazione dell'oncogene c-myc. In un modello tumorale transgenico, questo ritarda la linfomagenesi indotta da c-myc in assenza di Cdk2. Inoltre, l'inibizione farmacologica di Cdk2 causa senescenza in cellule over-esprimanti c-myc, suggerendo un possibile approccio terapeutico in tumori con espressione elevata di questo oncogene.

2. *Studi clinici di chemioimmunoterapia o con farmaci antiangiogenetici aventi l'obiettivo di bersagliare sia le cellule neoplastiche che le cellule del microambiente tumorale.*

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

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18:3-10.
2. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 2008;222:155-61.
3. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:1-9.
4. Angelone T, Quintieri AM, Goumon Y, Di Felice V, Filice E, Gattuso A, Mazza R, Corti A, Tota B, Metz-Boutigue MH, Cerra MC. Cytoskeleton mediates negative inotropism and lusitropism of chromogranin A-derived peptides (human vasostatin1-78 and rat CgA(1-64) in the rat heart. *Regul Pept* 2009 (in corso di stampa).
5. Bellone M, Mondino A, Corti A. Vascular targeting, chemotherapy and active immunotherapy: teaming up to attack cancer. *Trends Immunol* 2008;29:235-41.
6. Bergamaschi A, Tagliabue E, Sorlie T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R, Tammi R, Giercksky H, Nesland JM, Ménard S, Borresen-Dale AL. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol* 2008;214:357-67.
7. Campaner S, Doni M, Hydbring P, Verrecchia A, Bianchi L, Sardella D, Schleker T, Perna D, Tronnersjö S, Murga M, Fernandez-Capetillo O, Barbacid M, Lars-Gunnar Larsson LG, Amati B. Cdk2 suppresses cellular senescence induced by the myc oncogene. *Nature Cell Biology* 2010;12(1):54-9.
8. Chiesa C, Botta F, Coliva A, Maccauro M, Devizzi L, Guidetti A, Carlo-Stella C, Seregini E, Gianni AM, Bombardieri E. Absorbed dose and biologically effective dose in patients with high-risk non-Hodgkin's lymphoma treated with high-activity myeloablative 90Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin®). *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009;36:1745-57.
9. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30:1073-81.
10. Corti A, Curnis F, Arap W, Pasqualini R. The neovasculature homing motif NGR: more than meets the eye. *Blood* 2008;112:2628-35.
11. Cretich M, Longhi R, Corti A, Damin F, Carlo GD, Sadini V, Chiari M. Epitope mapping of human chromogranin a by peptide microarrays. *Methods Mol Biol* 2009;570:221-32.

12. Crippa L, Gasparri A, Sacchi A, Ferrero E, Curnis F, Corti A. Synergistic damage of tumor vessels with ultra-low dose endothelial-monocyte activating polypeptide-II and neovasculature-targeted TNF α . *Cancer Res* 2008;68:1154-61.
13. Curnis F, Sacchi A, Gasparri A, Longhi R, Bachi A, Doglioni C, Bordignon C., Traversari C, Rizzardi GP, Corti A. Isoaspartate-glycine-arginine: a new tumor vasculature targeting motif. *Cancer Res* 2008;68:7073-82.
14. Devizzi L, Guidetti A, Tarella C, Magni M, Matteucci P, Seregini E, Chiesa C, Bombardieri E, Di Nicola M, Carlo-Stella C, Gianni AM. High-dose yttrium-90-ibritumomab tiuxetan with tandem stem-cell reinfusion: an outpatient preparative regimen for autologous hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2008;26:5175-82.
15. Di Comite G, Previtali P, Rossi CM, Dell'Antonio G, Rovere-Querini P, Praderio L, Dagna L, Corti A, Doglioni C, Maseri A, Sabbadini MG, Manfredi AA. High blood levels of chromogranin A in giant-cell arteritis identify patients refractory to corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis* 2009;68:293-5.
16. Di Comite G, Rossi CM, Marinosci A, Lolmede K, Baldissera E, Aiello P, Mueller RB, Herrmann M, Voll RE, Rovere-Querini P, Sabbadini MG, Corti A, Manfredi AA. Circulating chromogranin A reveals extra-articular involvement in patients with rheumatoid arthritis and curbs TNF- α -elicited endothelial activation. *J Leukoc Biol* 2009;85:81-7.
17. Di Nicola M, Zappasodi R, Carlo-Stella C, Mortarini R, Pupa SM, Magni M, Devizzi L, Matteucci P, Baldassari P, Ravagnani F, Cabras A, Anichini A, Gianni AM. Vaccination with autologous tumor-loaded dendritic cells induces clinical and immunological responses in indolent B-cell lymphoma patients with relapsed and measurable disease: a pilot study. *Blood* 2009;113:18-27.
18. Giammarioli AM, Maselli A, Casagrande A, Gambardella L, Gallina A, Spada M, Giovannetti A, Proietti E, Malorni W, Pierdominici M. Pyrimethamine induces apoptosis of melanoma cells via a caspase and cathepsin double-edged mechanism. *Cancer Res* 2008;68:5291-300.
19. Laghi L, Bianchi P, Miranda E, Balladore E, Pacetti V, Grizzi F, Allavena P, Torri V, Repici A, Santoro A, Mantovani A, Roncalli M, Malesci A. CD3 $^{+}$ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *Lancet Oncol* 2009;10:877-84.
20. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454:436-44.
21. Marchesi F, Piemonti L, Fedele F, Destro A, Roncalli M, Albarello, Doglioni, Anselmo, Doni, Bianchi, Laghi, Malesci, Cervo, Malosio, Reni, Zerbi, Di Carlo, Mantovani A, Allavena P. The Chemokine Receptor CX3CR1 Is Involved in the Neural Tropism and Malignant Behavior of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Res* 2008;68:9060-9.
22. Matarrese P, Ciarlo L, Tinari A, Piacentini M, Malorni W. Xeno-cannibalism as an exacerbation of self-cannibalism: a possible fruitful survival strategy for cancer cells. *Curr Pharm Des* 2008;14:245-52.
23. Matarrese P, Manganelli V, Garofalo T, Tinari A, Gambardella L, Ndebele K, Khosravi-Far R, Sorice M, Esposti MD, Malorni W. Endosomal compartment contributes to the propagation of CD95/Fas-mediated signals in type II cells. *Biochem J* 2008;413:467-78.
24. Mortarini R, Vegetti C, Molla A, Arienti F, Ravagnani F, Maurichi A, Patuzzo R, Santinami M, Anichini A. Impaired STAT Phosphorylation in T Cells from Melanoma Patients in Response to IL-2: Association with Clinical Stage. *Clin Cancer Res* 2009;15:4085-94.
25. Porta C, Laghi P, Rimoldi M, Grazia Totaro M, Allavena P, Mantovani A, Sica A. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* 2009;214:761-77.

26. Righi M, Giacomini A, Lavazza C, Sia D, Carlo-Stella C, Gianni AM. A computational approach to compare microvessel distributions in tumors following antiangiogenic treatments. *Lab Invest* 2009;89:1063-70.
27. Sangaletti S, Colombo MP. Matricellular proteins at the crossroad of inflammation and cancer. *Cancer Lett* 2008;267:245-253.
28. Sangaletti S, Di Carlo E, Gariboldi S, Miotti S, Cappetti B, Parenza M, Brekken RA, Chiodoni C, Colombo MP. Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer Res* 2008;68:9050-59.
29. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009;86:1065-73.
30. Spitaleri A, Mari S, Curnis F, Traversari C, Longhi R, Bordignon C, Corti A, Rizzardi GP, Musco G. Structural basis for the interaction of isoDGR with the RGD-binding site of alphav/beta3 integrin. *J Biol Chem* 2008;283:19757-68.
31. Viale A, De Franco F, Orleth A, Cambiaghi V, Giuliani V, Bossi D, Ronchini C, Ronzoni S, Muradore I, Monestiroli S, Gobbi A, Alcalay M, Minucci S, Pelicci PG. Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells. *Nature* 2009;457:51-6.

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

Vincenzo Bronte
Istituto Oncologico Veneto (IRCCS), Padova

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

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

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Il principale obiettivo di questo progetto è lo sviluppo di nuovi adiuvanti per l'immunoterapia di pazienti oncologici. Stiamo sviluppando molecole in grado di interferire con le vie metaboliche coinvolte nella produzione di radicali dell'azoto (RNS). Infatti, durante la loro progressione, i tumori diventano refrattari alle armi del sistema immunitario. È risaputo che il microambiente tumorale presenta profonde modifiche nel metabolismo di amminoacidi come L-arginina. La conoscenza di questi meccanismi complessi e parzialmente interconnessi sta offrendo nuovi bersagli per un approccio farmacologico integrato mirato a liberare i linfociti T tumore specifici dalle influenze negative del sistema tumorale.

Abbiamo sviluppato e testato una nuova classe di NO-donatori: queste molecole sono caratterizzate da una parte furossanica legata tramite un ponte estere alla funzione carbossilica dell'acido salicilico. Abbiamo testato un centinaio di composti e identificato diverse molecole attive *in vitro*. I saggi di screening si sono basati su due semplici metodiche, valutando la capacità di questi composti di ripristinare l'attività proliferativa e citotossica di linfociti T CD8⁺ in condizioni di forte immunosoppressione dovuta a produzione di RNOS, caratteristica tipica del microambiente tumorale.

Questa fase di screening *in vitro* ci ha permesso di individuare dei composti leader da utilizzare in una successiva fase operativa *in vivo*. In questi esperimenti si è scelto di iniziare con un modello tumorale murino molto aggressivo e si è somministrato il farmaco dal giorno successivo all'inoculo del tumore e per 9 giorni a seguire. Il tumore è stato analizzato in immunoistochimica per la presenza di nitrotirosine, utilizzando questo come marcatore dell'azione di RNOS sui tessuti tumorali. Uno dei composti analizzati, AT38, si è dimostrato molto efficace nel ridurre in maniera significativa la percentuale di cellule positive per nitrotirosine. In questi stessi tumori, la diminuzione di nitrotirosine, correla con un'aumentata capacità dei linfociti T di infiltrare la lesione neoplastica,

Abbiamo, quindi, valutato la capacità di questo composto di indurre una risposta T antigene-specifica su un tumore a crescita meno aggressiva. È stata scelta la linea EG-7 che esprime l'antigene OVA, in modo da poter usare linfociti specifici provenienti da topi transgenici OT-1,

che presentano una restrizione MHC-I per questo antigene. I risultati su questi animali sono stati altrettanto soddisfacenti, confermando il set di dati precedente. Inoltre, risultati recenti hanno confermato che AT38 è un adiuvante *in vivo* poiché sinergizza con linfociti T CD8⁺ tumore-specifici nell'indurre terapia di tumori stabilizzati. Lo studio ora volge a caratterizzare nel dettaglio il meccanismo d'azione, ad ottimizzare l'utilizzo terapeutico e a iniziare la descrizione della farmacocinetica del nostro composto.

Le relazioni dei singoli gruppi, vengono riportate negli appositi spazi. Di seguito, vengono descritti due sviluppi che non sono stati trattati nelle relazioni successive:

- a. NF-κB come potenziale bersaglio di nuovi approcci terapeutici. Il nostro gruppo ha recentemente dimostrato che i macrofagi-associati a tumore (TAM) e cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC) esprimono un programma funzionale alternativo o M2. Abbiamo, inoltre, riportato che i TAM esprimono alti livelli nucleari dell'omodimero p50 NF-κB e, più recentemente, che la subunità p50 NF-κB svolge un ruolo cruciale per l'attivazione della risposta infiammatoria polarizzata di tipo M2. In accordo i TAM deficienti per p50 NF-κB esprimono prevalentemente un programma funzionale antitumorale di tipo M1 (e.g. alti livelli di IL-12, TNFα), inibendo la crescita di tumorale. Basandoci su queste osservazioni abbiamo quindi investigato se p50 NF-κB potesse giocare un ruolo importante nelle funzioni immunosoppressive espresse dalle MDSC. Analogamente a quanto osservato nei TAM, abbiamo dimostrato che le MDSC purificate dalla milza di topi con tumore (fibrosarcoma MN/MCA1) presentano alti livelli nucleari della proteina p50 NF-κB. Studi mirati alla caratterizzazione della distribuzione delle MDSC negli organi linfoidi di topi portatori di tumore hanno evidenziato una loro alterata distribuzione nel midollo osseo, nel sangue e nel tumore, se confrontati a topi wt. In particolare, l'accumulo di MDSC nella milza di topi con tumore è fortemente inibita dall'assenza di p50. L'analisi dei meccanismi che guidano il reclutamento delle MDSC durante la crescita tumorale ha evidenziato che, sebbene l'espressione dei recettori CXCR2, CCR5 e CCR2 non sia significativamente diversa tra MDSC wt e p50^{-/-}, la migrazione delle MDSC p50 KO in risposta a CCL2 risulta fortemente ridotta. Questi risultati suggeriscono che p50 sia un fattore cruciale per il reclutamento delle MDSC negli organi linfoidi (milza) mediato da CCL2. Abbiamo inoltre investigato il ruolo di p50 per l'espressione del fenotipo soppressorio delle MDSC. Poiché diverse evidenze sperimentali suggeriscono che l'attività soppressoria delle MDSC dipende fortemente dall'aumentata espressione degli enzimi che regolano il metabolismo dell'arginina, abbiamo valutato l'espressione di Arginasi 1 e NOS2 nelle MDSC purificate dalla milza di topi con tumore, wt e p50^{-/-}. I risultati ottenuti hanno dimostrato che p50 NF-κB svolge un ruolo essenziale per l'espressione e l'attività di NOS2, suggerendo che il catabolismo dell'arginina mediato da questo enzima sia il meccanismo fondamentale per l'attività soppressoria mediata da p50 NF-κB. In accordo le cellule MDSC p50^{-/-} purificate dalla milza di topi con tumore sono incapaci di sopprimere *in vitro* la risposta antigene specifica mediata da cellule T.

Nel loro insieme questi risultati identificano la proteina p50 NF-κB come un regolatore cruciale delle funzioni protumorali espresse dalle cellule mieloidi associate ai tumori (TAM e MDSC) e suggeriscono nuove strategie antitumorali basate sull'inibizione dell'accumulo nucleare di p50 NF-κB in TAM e MDSC.

- b. Nuovi inibitori di c-Myc. Lo studio dell'inibizione di c-Myc è stata condotta utilizzando un minianticorpo (G11-int) di tipo scFv diretto contro la porzione amino terminale dell'onco proteina (aa 1-152). Esperimenti di growth inhibition condotti su differenti linee cellulari umane, hanno dato risultati diversi, con linee "non-responding" come le

MCF-7 derivanti da carcinoma mammario, linee “low-responding” come le HCT-116 derivanti da carcinoma del colon e linee “high-responding” come le Namalwa derivanti da linfoma di Burkitt.

L'anatomia molecolare della regione del signaling network di cui ci siamo occupati, concernente la transizione G0-G1 del ciclo cellulare (una fase cruciale nel controllo della proliferazione), con speciale attenzione a cellule di tumori umani di origine epiteliale (colon, mammella, polmone), è stata ricostruita utilizzando Mappe di Interazione Molecolare (MIM).

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Abraham S, Yeo M, Montero-Balaguer M, Paterson H, Dejana E, Marshall CJ, Mavria G. VE-cadherin mediated cell-cell interaction suppresses sprouting via signaling to MLC2 phosphorylation. *Curr Biol* 2009;19(8):668-74.
2. Agliano A, Martin-Padura I, Marighetti P, Mancuso P, Rabascio C, Pruneri G, Shultz LD, Bertolini F. Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. *Int J Cancer* 2008;123:2222-7.
3. Avignolo C, Bagnasco L, Biasotti B, Melchiori A, Tomati V, Bauer I, Salis A, Chiossone L, Mingari MC, Orecchia P, Carnemolla B, Neri D, Zardi L, Parodi S. Internalization via Antennapedia Protein Transduction Domain (PTD) of a scFv antibody toward c-Myc protein. *FASEB J* 2008;2:1-9.
4. Bertolini F, Mancuso P, Braidotti P, Shaked Y, Kerbel RS. The multiple personality disorder phenotype(s) of circulating endothelial cells in cancer. *Biochim Biophys Acta Reviews Cancer* 2009;1796:27-32.
5. Bertolini F. Chemotherapy and the tumor microenvironment: the contribution of circulating endothelial cells. *Cancer Metastasis Review* 2008;27:95-101.
6. Birdsey GM, Dryden NH, Amsellem V, Gebhardt F, Sahnun K, Haskard DO, Dejana E, Mason JC, Randi AM. The transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. *Blood* 2008;111(7):3498-506.
7. Bronte V, Mocellin S. Suppressive influences in the immune response to cancer. *J Immunother* 2009;32:1-11.
8. Bronte V. Th17 and cancer: friends or foes? *Blood* 2008;112:214.
9. Calleri A, Bono A, Bagnardi V, Quarna J, Mancuso P, Rabascio C, Dellapasqua S, Campagnoli E, Shaked Y, Goldhirsch A, Colleoni M, Bertolini F. Predictive potential of angiogenic growth factors and circulating endothelial cells in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapy plus bevacizumab. *Clin Cancer Res* 2009;15(24):7652-7.
10. Castellone MD, De Falco V, Rao DM, Bellelli R, Muthu M, Basolo F, Fusco A, Gutkind JS, Santoro M. The beta-catenin axis integrates multiple signals downstream from RET/papillary thyroid carcinoma leading to cell proliferation. *Cancer Res* 2009;69(5):1867-76.
11. Cera MR, Fabbri M, Molendini C, Corada M, Orsenigo F, Rehberg M, Reichel CA, Krombach F, Pardi R, Dejana E. JAM-A promotes neutrophil chemotaxis by controlling integrin internalization and recycling. *J Cell Sci* 2009;122(2):268-77.

12. Cermenati S, Moleri S, Cimbri S, Corti P, Del Giacco L, Amodeo R, Dejana E, Koopman P, Cotelli F, Beltrame M. Sox18 and Sox7 play redundant roles in vascular development. *Blood* 2008;111:2657-66.
13. Contento RL, Molon B, Boularan C, Pozzan T, Manes S, Marullo S, Viola A. CXCR4-CCR5: a couple modulating T-cell functions. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2008;105:10101-6.
14. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* 2008;121(13):2115-22.
15. Dejana E, Orsenigo F, Molendini C, Baluk P, McDonald DM. Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell Tissue Res* 2009;335(1):17-25.
16. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications. *Dev Cell* 2009;16(2):209-221.
17. Dellapasqua S, Bertolini F, Bagnardi V, Campagnoli E, Scarano E, Torrisi R, Shaked Y, Mancuso P, Goldhirsch A, Rocca A, Pietri E, Colleoni M. Metronomic cyclophosphamide and capecitabine combined with bevacizumab in advanced breast cancer: clinical and biological activity. *J Clin Oncol* 2008;26:4899-905.
18. Dolcetti L, Marigo I, Mantelli B, Peranzoni E, Zanovello P, Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation. *Cancer Lett* 2008;267(2):216-25.
19. Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, Marigo I, Fernandez Gomez A, Mesa C, Geilich M, Winkels G, Traggiai E, Casati A, Grassi F, Bronte V. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur J Immunol* 2009 (in corso di stampa).
20. François M, Caprini A, Hosking B, Orsenigo F, Wilhelm D, Browne C, Paavonen K, Karnezis T, Shayan R, Downes M, Davidson T, Tutt D, Cheah KS, Stacker SA, Muscat GE, Achen MG, Dejana E, Koopman P. Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature* 2008;456(7222):643-7.
21. Gri G, Piconese S, Frossi B, Manfroi V, Merluzzi S, Tripodo C, Viola A., Odom S., Rivera J, Colombo MP, Pucillo CE. 2008. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 2008;29(5):771-81.
22. Guarino V, Castellone MD, Avilla E, Melillo RM. Thyroid cancer and inflammation. *Mol Cell Endocrinol* 2009 (in corso di stampa).
23. Kerbel RS, Benezra R, Lyden DC, Hattori K, Heissig B, Nolan D, Mittal V, Bertolini F, Rafii S. Endothelial progenitors are cellular hubs essential for neo-angiogenesis of certain aggressive tumors and metastatic transition. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 2008;105(34):E54; author reply E55.
24. Li H, Raia V, Bertolini F, Price DK, Figg WD. Circulating endothelial cells as a therapeutic marker for thalidomide in combined therapy with chemotherapy drugs in a human prostate cancer model. *BJU International* 2008;101:884-8.
25. Liebner S, Corada M, Bangsow T, Babbage J, Taddei A, Czupalla CJ, Reis M, Felici A, Wolburg H, Fruttiger M, Taketo MM, von Melchner H, Plate KH, Gerhardt H, Dejana E. Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 2008;183(3):409-17.
26. Lodyga M, De Falco V, Bai XH, Kapus A, Melillo RM, Santoro M, Liu M. XB130, a tissue-specific adaptor protein that couples the RET/PTC oncogenic kinase to PI 3-kinase pathway. *Oncogene* 2009;28(7):937-49.
27. Mancuso P, Antoniotti P, Quarna J, Calleri A, Rabascio C, Tacchetti C, Braidotti P, Wu H, Zurida AJ, Saronni L, Cheng JB, Shalinsky DR, Heymach JV, Bertolini F. Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry, molecular and ultrastructural analyses. *Clinical Cancer Research* 2009;15:267-73.

28. Mancuso P, Calleri A, Bertolini F, Tacchetti C, Heymach JV, Shalinsky DR. Quantification of Circulating Endothelial Cells by Flow Cytometry. *Clin Cancer Res* 2009;15:3640.
29. Mandruzzato S, Solito S, Falisi E, Francescato S, Chiarion-Sileni V, Mocellin S, Zanon A, Rossi CR, Nitti D, Bronte V, Zanovello P. IL4Ralpha+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *J Immunol* 2009;182:6562-8.
30. Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P, and Bronte V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid-derived suppressor cells. *Immunol Rev* 2008;222:162-79.
31. Martin-Padura I, Bertolini F. Circulating endothelial cells as biomarkers for angiogenesis in tumor progression. *Front Biosci* (Schol Ed) 2009;1:304-18.
32. Martin-Padura I, Bertolini F. Circulating endothelial cells in cancer: Towards marker and target identification. *Current Pharmaceutical Design* 2008;14(36):3780-9.
33. Martin-Padura I, Bertolini F. The circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Curr Pharm Des* 2008;14:378-9.
34. Mazzone M, Dettori D, Leite de Oliveira R, Loges S, Schmidt T, Jonckx B, Tian YM, Lanahan AA, Pollard P, Ruiz de Almodovar C, De Smet F, Vinckier S, Aragonés J, Debackere K, Luttun A, Wyns S, Jordan B, Pisacane A, Gallez B, Lampugnani MG, Dejana E, Simons M, Ratcliffe P, Maxwell P, Carmeliet P. Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell* 2009;136(5):839-51.
35. Mennuni C, Ugel S, Mori F, Cipriani B, Iezzi M, Pannellini T, Lazzaro D, Ciliberto G, La Monica N, Zanovello P, Bronte V, Scarselli E. Preventive vaccination with telomerase controls tumor growth in genetically engineered and carcinogen-induced mouse models of cancer. *Cancer Res* 2008;68(23):9865-74.
36. Nyqvist D, Giampietro C, Dejana E. Deciphering the functional role of endothelial junctions by using *in vivo* models. *EMBO Rep* 2008;9(8):742-745.
37. Peranzoni E, Marigo I, Dolcetti L, Ugel S, Sonda N, Taschin E, Mantelli B, Bronte V, Zanovello P. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology* 2008;212:795-812.
38. Persano L, Moserle L, Esposito G, Bronte V, Barbieri V, Iafrate M, Gardiman MP, Larghero P, Pfeffer U, Naschberger E, Stürzl M, Indraccolo S, Amadori A. Interferon-alpha counteracts the angiogenic switch and reduces tumor cell proliferation in a spontaneous model of prostatic cancer. *Carcinogenesis* 2009;30:851-60.
39. Ponassi R, Biasotti B., Tomati V, Bruno S, Poggi A, Malacarne D, Cimoli G, Salis A, Pozzi S, Miglino M, Damonte G, Cozzini P, Spyraiki F, Campanini B, Bagnasco L, Castagnino N, Tortolina L, Mumot A, Frassoni F, Daga A, Cilli M, Piccardi F, Monfardini I, Perugini M, Zoppoli G, D'Arrigo C, Pesenti R, Parodi S. A novel Bim-BH3-derived Bcl-XL inhibitor *Cell Cycle* 2008;7(20):1-14.
40. Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D, Dieli F, Ghisletti S, Natoli G, De Baetselier P, Mantovani A, Sica A. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(35):14978-83.
41. Rudini N, Dejana E. Adherens junctions. *Curr Biol* 2008;18(23):R1080-2.
42. Rudini N, Felici A, Giampietro C, Lampugnani MG, Corada M, Swirsding K, Garrè M, Liebner S, Letarte M, ten Dijke P and Dejana E. VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J* 2008;27(7):993-1004.
43. Salerno P, De Falco V, Tamburrino A, Nappi TC, Vecchio G, Schweppe R, Bollag G, Santoro M, Salvatore G. Cytostatic activity of ATP-competitive kinase inhibitors in BRAF mutant thyroid carcinoma cells. *JCEM* 2009 (in corso di stampa).

44. Shaked Y, Henke E, Roodhart J, Mancuso P, Langenberg M, Colleoni M, Daenen LG, Man S, Xu P, Emmenegger U, Tang T, Zhu Z, Witte L, Strieter RM, Bertolini F, Voest E, Benezra R, Kerbel RS. Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: Implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell* 2008;14:1263-73.
45. Shaked Y, Tang T, Woloszynek J, Daenen LG, Man S, Xu P, Cai S, Armit JM, Voest EE, Chaplin D, Smythe J, Harris A, Nathan P, Judson I, Rustin G, Bertolini F, Link DC, Kerbel RS. Contribution of G-CSF to the acute mobilization of endothelial precursor cells by vascular disrupting agents. *Cancer Research* 2009;69:7524-8.
46. Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, Potente M, Daly C, Dimmeler S, Dejana E. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol* 2008;10(8):923-34.
47. Tosello V, Zamarchi R, Merlo A, Gorza M, Piovan E, Mandruzzato S, Bronte V, Wang X, Ferrone S, Amadori A, Zanovello P. Differential expression of constitutive and inducible proteasome subunits in human monocyte-derived DC differentiated in the presence of IFN-alpha or IL-4. *Eur J Immunol* 2009;39:56-66.
48. Turowski P, Martinelli R, Crawford R, Wateridge D, Papageorgiou AP, Lampugnani MG, Gamp AC, Vestweber D, Adamson P, Dejana E, Greenwood J. Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. *J Cell Sci* 2008;121:29-37.
49. Ugel S, Scarselli E, Iezzi M, Mennuni C, Pannellini T, Calvaruso F, Cipriani B, De Palma R, Ricci Vitiani L, Peranzoni E, Musiani P, Zanovello P, Bronte V. Autoimmune B cell lymphopenia following successful adoptive therapy with telomerase-specific T lymphocytes. *Blood* 2009 (in corso di stampa).
50. Ugel S, Zoso A, De Santo C, Li Y, Marigo I, Zanovello P, Scarselli E, Cipriani B, Schneck JP, Oelke M, Bronte V. aAPC immunization licenses low affinity T cells for the treatment of cancer. *Cancer Res* 2009 (in corso di stampa).
51. Vetrano S, Rescigno M, Cera MR, Correale C, Rumio C, Doni A, Fantini M, Sturm A, Borroni E, Repici A, Locati M, Malesci A, Dejana E, Danese S. Unique role of junctional adhesion molecule-1 in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008;135(1):173-84.
52. Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2008;48:171-97.
53. Viola A, Molon B, Contento RL. Chemokines: coded messages for T cell missions. *Frontiers in Biosciences* 2008;13:6341-53.

Brevetti conseguiti nell'ambito del progetto

Viola A, Bronte E, Crosetti M, Lazzarato L, Fruttero R, Gasco A. Nitric oxide furoxan derivative compounds endowed with antitumoral activity. PCT/EP2009/000206.

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

Stefania Scala

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

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi del progetto sono:

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

L'obiettivo principale del secondo anno di attività è stata la validazione *in vivo* dei peptidi inibenti il CXCR4. Al fine di validare la capacità dei peptidi di spiazzare il ligando endogeno del recettore esperimenti di *binding* sono stati condotti utilizzando ligando SDF-1 α /CXCL12 marcata con il fluorocromo Alexa Fluor647. In questo saggio i peptidi Ciclo-Phe-7inv e Ciclo-Hys-7inv hanno dimostrato una capacità di spiazzamento analoga a quella dell'inibitore modello AMD3100.

I peptidi Ciclo-Hys-OH, Ciclo-Hys-7inv e Ciclo-Phe-7inv sono stati valutati nell'inibizione metastatica in un sistema di melanoma murino B16 trasfettate con il recettore CXCR4 umano (B16-hCXCR4). Il trattamento con i peptidi Ciclo-Phe-7inv e Ciclo-Hys-OH ha determinato una riduzione, sia nel numero che nella dimensione, delle metastasi polmonari maggiore di quella ottenuta con l'AMD3100. Un altro modello *in vivo* ha utilizzato cellule di carcinoma renale umano SN12C, trasfettate con il plasmide p-EGFP: il trattamento con i peptidi Ciclo-Phe-7inv e Ciclo-Hys-OH riduce la crescita del tumore primario. Attualmente è in corso validazione in un sistema di osteosarcoma murino K7M2 in topi BALB/c immunocompetenti.

I peptidi che hanno mostrato una marcata attività antagonista sono stati selezionati per ulteriori saggi *in vivo*. Questi corrispondono ai peptidi allungati di due residui all'N-terminale rispetto al nucleo ciclico a 5 termini, in modo da inserire un altro residuo carico positivamente conservato nelle due sequenze di chemochine considerate (SDF-1 α e vMIP-II) e con il verso della sequenza corrispondente a quella della chemochina endogena (SDF-1 α). Parallelamente, è stato condotto uno studio teorico per l'ottenimento di un modello tridimensionale del complesso

SDF-1 α /CXCR4, La regione N-terminale del recettore è stata modellata usando come vincolo la conformazione assunta nel complesso con SDF-1 α . Al fine di effettuare studi di imaging ottico, paramagnetico ed eventualmente radioattivo, sono stati progettati e sintetizzati coniugati in cui la sequenza di Ciclo-Phe 7 inv è covalentemente legata ad un fluoroforo sulla sua estremità N-terminale e ad un agente chelante sulla catena laterale di un residuo di lisina inserito nel segmento peptidico.

Cellule CXCR4 positive in campioni di melanoma metastatico e i livelli di espressione di tale recettore nella popolazione staminale tumorale sono state valutate. Cellule di melanoma CXCR4+ migrano rispetto alle cellule che non esprimono il recettore. È attualmente in corso la valutazione della capacità di inibire la formazione di metastasi in topi nudi inoculati con cellule di melanoma utilizzando inibitori peptidici specifici per il CXCR4.

È stata identificata una regolazione dell'espressione di CXCR4 da parte del miR146a, del miR-219 (mediante la regolazione di una glicoproteina nota come CD164 che si associa al recettore) e del miR-222. Per quest'ultimo e per l'inibitore del ciclo cellulare p27Kip, è stato individuato quale target il fattore trascrizionale Ets-1, fattore che regola l'espressione di geni prometastatici, CD44 e CXCR4. Inoltre in leucemie acute mieloidi (LAM) è stato valutato un effetto della downmodulazione del recettore. Dati preliminari suggeriscono che il blocco dell'asse CXCR4/SDF-1 sensibilizza le cellule leucemiche al trattamento chemioterapico. Inoltre, sempre su cellule di LAM, è stato valutato l'effetto dell'ipossia sull'espressione di CXCR4 e del miR146a, dimostrando come l'ipossia moduli in maniera opposta l'espressione di entrambe le molecole.

CXCR4 nei meccanismi migratori e invasivi in delle cellule di glioblastoma umano U87. Mediante saggi di stimolazione effettuati in microambiente condizionato con CXCL12, AMD3100, peptide Ciclo-Phe-7Inv è stato osservato che l'SDF-1 α incrementa l'attività migratoria delle cellule U87 del 15%, ma non invasione in Matrigel. Trattamento Ciclo-Phe-7Inv riduce la capacità migratoria e per circa un quarto l'invasività delle cellule U87, in assenza di CXCL12. Tale inibizione risulta essere significativamente maggiore dell'AMD3100, sia in assenza che in presenza di CXCL12.

In vivo è stata valutata la risposta al trattamento con il peptide PhE-7 in un modello di glioblastoma ottenuto dall'impianto di cellule U87 nel topo nudo mediante immagini MR.

L'inizio del trattamento nello stesso giorno dell'inoculo ha indicato che i trattamenti sia con PhE-7 che AMD rallentavano la crescita del tumore rispettivamente di circa 35% e 60%, in confronto al trattamento con salina.

Prosegue lo studio delle relazioni tra l'asse CXCR4/CXCL12 e il ciclo della fosfatidilcolina (PC) cellule leucemiche (CEM), per valutare il significato diagnostico e prognostico del profilo spettrale ^1H MRS della "colina totale" in cellule tumorali. I risultati hanno mostrato che: 1) il contenuto medio intracellulare di fosfocolina è sensibile sia alla stimolazione di CXCR4 da parte della chemochina SDF-1 α , sia all'inibizione recettoriale da parte di AMD3100; 2) l'espressione su membrana di CXCR4 viene down-modulata per inibizione selettiva di una fosfolipasi specifica per PC. Inoltre, l'esistenza di una associazione molecolare tra CXCR4 e PC-plc è stata evidenziata mediante esperimenti di co-immunoprecipitazione.

Il ruolo di CXCR4/CXCL12 nel processo di metastatizzazione del carcinoma prostatico è stato studiato mediante due diverse azioni:

1. Analisi dell'espressione di CXCR4 in biopsie di tumore umano e su modelli in vivo di neoplasia prostatica (TRAMP, TRansgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate)

Sono stati testati 11 anticorpi commerciali specifici per CXCR4 al fine di identificare i candidati all'uso in immunoistochimica su materiale fissato e incluso in paraffina. Sono stati selezionati due anticorpi con pattern di reazione atteso (membrana e citoplasma), di

cui uno mono e uno policlonale. Sono stati quindi valutati 120 campioni di carcinoma prostatico con varie caratteristiche di stadio ed evoluzione clinica. In parallelo all'analisi per CXCR4 i campioni sono stati valutati per l'espressione di CXCL12, così come per altri marcatori di staminalità, quali CD133 e SOX2, che hanno mostrato reattività nei campioni selezionati.

Abbiamo inoltre raccolto sieri e apparato urogenitale da topi TRAMP e wild type (WT) di differenti età. Abbiamo quindi condotto studi in citofluorimetria e immunoistochimica per valutare l'espressione di CXCR4/SDF1 sulle cellule neoplastiche e stromali nel modello TRAMP. Le analisi in citofluorimetria dei tumori prostatici hanno evidenziato in generale una bassa espressione di CXCR4. Il dato è stato confermato sulla linea di tumore prostatico TRAMP-C1, che ha mostrato una bassa espressione di CXCR4, per altro ristretta a < 20% della popolazione cellulare. Purtroppo gli anticorpi a nostra disposizione hanno dimostrato una bassa affinità in immunoistochimica per i tessuti murini.

2. *Generazione di cellule staminali tumorali da topi TRAMP e analisi dell'espressione di CXCR4/SDF1 in cellule staminali tumorali*

Utilizzando specifiche condizioni di coltura siamo riusciti ad ottenere linee di cellule staminali da prostata murina sana e linee di cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cells*, CSC) da lesioni PIN, adenocarcinoma e tumore neuroendocrino. Tutte le linee hanno dimostrato *in vitro* la capacità di autorigenerarsi e differenziarsi.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Cecchetti S, Ricci A, Iorio E, Pisanu M, Paris L, Portella L, Scala S, Podo F. Links between CXCR4/CXCL12 axis and phosphatidylcholine cycle in a human lymphoblastoid cell line. In: *SIC 2009 Annual Meeting abstracts - 51° Congresso Nazionale della Società Italiana di Cancerologia - Cancer research in the technological post-industrial era*, November 23-26, Milano. Poster P46.
2. Felicetti F, Errico MC, Bottero L, Segnalini P, Stoppacciaro A, Biffoni M, Felli N, Mattia G, Petrini M, Colombo MP, Peschle C, Carè A. The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer Res* 2008;68(8):2745-54.
3. Felicetti F, Errico MC, Segnalini P, Mattia G, Carè A. MicroRNA-221 and -222 pathway controls melanoma progression. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8(11):1759-65.
4. Ierano C, Giuliano P, D'Alterio C, Cioffi M, Mettievier V, Portella L, Napolitano M, Barbieri A, Arra C, Liguori G, Franco R, Palmieri G, Rozzo C, Pacelli R, Castello G, Scala S. A point mutation (G574A) in the chemokine receptor CXCR4 detected in human cancer cells enhances migration. *Cell Cycle* 2009;8(8):1228-37.
5. Labbaye C, Spinello I, Quaranta MT, Pelosi E, Pasquini L, Petrucci E, Biffoni M, Nuzzolo ER, Billi M, Foà R, Brunetti E, Grignani F, Testa U, Peschle C. A three-step pathway comprising PLZF/miR-146a/CXCR4 controls megakaryopoiesis. *Nat Cell Biol* 2008;10(7):788-801.
6. Napolitano M, Ottaiano A, Mauro F, Ieranò C, Satriano R, Pacelli R, Franco R, De Angelis V, Castello G, Scala S. CD4(+)CD45RA(+)CXCR4 (+) lymphocytes are inversely associated with progression in stages I-III melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2009 Sep 25 (online prima della stampa). prima della stampa).
7. Portella L, Napolitano M, Consales C, D'Alterio C, Polimero M, Cioffi M, Vitale RM, Amodeo P, De Luca S, Monfregola L, Castello G, Scala S. *In vitro* and *in vivo* functional characterization of

new cycle-peptides inhibitors for C-X-C chemokine receptor-4 (CXCR4). In: *SIC 2009 Annual Meeting abstracts - 51° Congresso Nazionale della Società Italiana di Cancerologia - Cancer research in the technological post-industrial era*, November 23-26, Milano. Poster P79.

8. Ricci A, Cecchetti S, Iorio E, Pisanu M, Paris L, Portella L, Scala S, Podo F. Relationship between CXCR4/CXCL12 axis and phosphatidylcholine cycle in a human lymphoblastoid cell line monitored by ¹H MRS. In: *ESMRMB 2009 Congress*, October 1-3, Antalya (Turkey). Peer-reviewed abstract n. 652.

Brevetti conseguiti nell'ambito del progetto

In corso di deposito: "Peptidi e peptidomimetici ciclici che legano il recettore CXCR4 e loro uso come agenti diagnostici, terapeutici e mobilizzatori."

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

Piero Picci

Dipartimento di Oncologia Muscoloscheletrica, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna

Base di partenza e razionale

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

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

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

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

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

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

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi del progetto sono:

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

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

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

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

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Il progetto di Ricerca è stato organizzato e strutturato in due Unità Operative (UO), ognuna delle quali composta da diverse sotto-Unità Operative (o Gruppi di Ricerca) (*vedi* Tabella 1).

Nel secondo anno di progetto sono state proseguite le analisi delle potenzialità di approcci immunoterapeutici indirizzati contro la molecola CD99 e il proteoglicano NG2, assieme alla valutazione dell'efficacia preclinica su cellule di osteosarcoma e sarcoma di Ewing del nuovo agente antitumorale 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX).

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

- i gruppi di ricerca IOR-Serra e UniRoma-Caccuri hanno cooperato per la parte del programma di ricerca inerente la valutazione pre-clinica e la definizione delle potenzialità terapeutiche di NBDHEX, valutandone gli effetti in trattamenti combinati con doxorubicina e methotrexate in linee cellulari di osteosarcoma, e doxorubicina e vincristina in linee cellulari di sarcoma di Ewing. È stata anche analizzata l'efficacia *in vivo* su topi atimici di NBDHEX, anche se questa parte dello studio dovrà essere implementata e completata nei prossimi anni di attività del progetto. Inoltre, è stata completata, nella linea U-2OS, l'analisi del pathway apoptotico attivato dal trattamento con NBDHEX ed è stato analizzato il meccanismo di morte cellulare indotto nella linea resistente al cisplatino U-2OS/CDDP4 μ g
- i gruppi di ricerca IOR- Scotlandi, ISS-Cianfriglia, e INT-Colombo, si sono integrati per quanto riguarda il targeting immunoterapeutico dell'antigene di membrana CD99. Al fine di rendere utilizzabili a livello clinico le potenzialità curative del mAb 0662 l'immunoglobulina murina è stata geneticamente modificata in una versione umanizzata

mediante costruzione di appropriati vettori di espressione contenenti i geni per le VH e VL murine ed Fc umane di classe IgG1. È stato inoltre completato il clonaggio del gene murino considerato l'omologo del gene umano CD99, e il cDNA del CD99 di topo (cromosoma 4, GeneID: 673094) è stato inserito all'interno del plasmide pcDNA3 sotto il controllo del promotore costitutivo del citomegalovirus (CMV).

- i gruppi di ricerca IST-Borsi e CBA-Zardi hanno analizzato l'efficacia della Gemcitabina usata come agente terapeutico singolo e in combinazione con L19mTNFa/melphalan su topi affetti da sarcoma.
- i gruppi di ricerca UniParma-Perris e IOR-Benassi hanno validato il ruolo predittivo e prognostico di NG2 su un'ampia casistica di sarcomi di differente istotipo con la definizione di un cut-off utile a una stratificazione dei pazienti, in termini di rischio di sviluppo di metastasi, basata principalmente sul tipo istologico del tumore, grado di malignità, sede e risposta alla terapia. Per valutare i meccanismi molecolari alla base del significato clinico di questa molecola, l'espressione di NG2 è stata abrogata in un pannello di linee cellulari di sarcoma causando una riduzione della motilità e adesione cellulare e un rallentamento della crescita *in vivo* del tumore parallelamente alla modificazione del profilo di espressione genica globale. L'acquisizione delle informazioni relative al ruolo prognostico e prometastatico hanno confermato il ruolo di NG2 come target terapeutico consolidando due differenti approcci: l'utilizzo di anticorpi monoclonali contro la porzione extracellulare, efficaci nel ridurre la motilità e crescita cellulare, e l'identificazione di sequenze immunodominanti per la produzione di vaccini peptidici.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Balza E, Carnemolla B, Mortara L, Castellani P, Soncini D, Accolla RS, Borsi L. Therapy-induced antitumor vaccination in neuroblastomas by the combined targeting of IL-2 and TNFalpha. *Int J Cancer* 2009 Oct 29 (online prima della stampa). prima della stampa).
2. Balza E, Sassi F, Ventura E, Parodi A, Fossati S, Blalock W, Carnemolla B, Castellani P, Zardi L, Borsi L. A novel human fibronectin cryptic sequence unmasked by the insertion of the angiogenesis-associated extra type III domain B. *Int J Cancer* 2009;125(4):751-8.
3. Benassi MS, Pazzaglia L, Chiechi A, Alberghini M, Conti A, Cattaruzza S., Wassermann B., Picci P., Perris R. NG2 expression predicts the metastasis formation in soft-tissue sarcoma patients. *J Orthop Res* 2009;27(1):135-40.
4. Cattaruzza S, Nicolosi PA, Perris R. Proteoglycans in the control of tumor growth and metastasis formation. *Connect Tissue Res* 2008;49:225-229.
5. Federici L, Lo Sterzo C, Pezzola S, Di Matteo A, Scaloni F, Federici G, Caccuri AM. Structural basis for the binding of the anticancer compound 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol to human glutathione s-transferases. *Cancer Res* 2009;69(20):8025-34.
6. Pasello M, Michelacci F, Scionti I, Hattinger CM, Zuntini M, Caccuri AM, Scotlandi V, Picci P, Serra M. Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma. *Cancer Res* 2008;68:6661-8.
7. Pazzaglia L, Chiechi A, Conti A, Gamberi G, Magagnoli G, Novello C, Morandi L, Picci P, Mercuri M and Benassi MS. Genetic and molecular alterations in rhabdomyosarcoma: mRNA overexpression of MCL1 and MAP2K4 genes. *Histol Histopathol* 2009;24:61-67.

8. Scotlandi K, Remondini D, Castellani G, Manara MC, Nardi F, Cantiani L, Francesconi M, Mercuri M, Caccuri AM, Serra M, Knuutila S, Picci P. Overcoming Resistance to Conventional Drugs in Ewing Sarcoma and Identification of Molecular Predictors of Outcome. *J Clin Oncol* 2009;27(13):2209-16.
9. Ventura E, Sassi F, Fossati S, Parodi A, Blalock W, Balza E, Castellani P, Borsi L, Carnemolla B, Zardi L. Use of uteroglobin for the engineering of polyvalent, polyspecific fusion proteins. *J Biol Chem* 2009;284(39):26646-54.

Brevetti conseguiti nell'ambito del progetto

Generation of human single-chain fragment variable (scFv) antibody to the extracellular domain of the CD99 cell surface determinant specifically recognizing Ewing's sarcoma tumor cells. Il 50% parte ISS è rappresentata dai seguenti autori: Gellini M, Cianfriglia M, Ascione A, Flego M, Mallano A, Dupuis ML.

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

Giorgio Parmiani
Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor, Milano

Base di partenza e razionale

Precedenti studi hanno dimostrato che l'immunoterapia, mentre induce frequenti risposte biologiche nei pazienti trattati, raramente influenza la storia naturale del tumore. Esistono altri approcci terapeutici che, pur avendo da soli un'efficacia limitata, hanno la potenzialità di amplificare la funzione del sistema immunitario. Quindi proponiamo trials di fase I-II in cui la vaccino-terapia viene combinata con questi trattamenti, prevalentemente biologici che, utilizzando meccanismi rivelati da precedenti studi pre-clinici e clinici, possono migliorare la risposta immunologica e clinica in pazienti con neoplasie farmaco-resistenti. Inoltre verranno introdotte nei protocolli manipolazioni destinate a inibire fattori che recentemente si sono dimostrati capaci di ridurre la risposta immune alle terapie immuno-biologiche. Tra questi fattori i più importanti sono la presenza di linfociti T regolatori (Treg) e le cellule mieloidi soppressive (*Myeloid Suppressive Cells*, MSC). Infatti, cercheremo di aumentare tale risposta somministrando ATRA (*All trans Retinoic Acid*) per ridurre le MSC, e ciclofosfamide per impedire la funzione soppressiva dei linfociti T regs.

Valuteremo anche se il polimorfismo di alcuni geni può spiegare la variabilità individuale della risposta biologica e clinica al trattamento. Sarà anche analizzata la risposta immunologica sia anticorpale sia cellulare vaccino- e tumore-specifica nel sangue e, quando possibile, nei linfonodi e nell'infiltrato neoplastico. Poiché il ruolo dell'immunità innata è ignoto nell'attivazione della risposta adattativa dipendente, valuteremo l'utilità di monitorare la concentrazione di un pannello di citochine e chemochine seriche (mediante Bioplex) nonché di marcatori della immunità innata e di attivazione alternativa dei macrofagi.

Attiveremo quattro studi clinici che combinano la vaccinazione con i seguenti approcci terapeutici nelle patologie indicate:

1. Studio di fase II randomizzato di IFN- α 2b ad alte dosi somministrato per un mese in combinazione con un vaccino peptidico in pazienti con melanoma metastatico (razionale: recenti risultati indicano la capacità di IFN- α di amplificare le risposte immuni);
2. Studio di fase I-II di vaccinazione con oncolisato cellulare autologo associato ad IFN- α in pazienti con melanoma metastatico (razionale: gli antigeni unici espressi dal tumore autologo possono evocare forti risposte immuni amplificabili dall'IFN- α , iniettato ad alte dosi nella sede di inoculo del vaccino). In entrambi gli studi, obiettivi primari sono la tossicità e la risposta immune anticorpo e cellulo-mediata. Come obiettivo secondario verrà valutata la risposta clinica.
3. Studio di fase I-II di combinazione di chemio/tomoterapia e vaccino peptidico in pazienti con carcinoma spinocellulare della testa/collo localmente avanzato (razionale: il trattamento chemio/radiante migliora il controllo locale, induce rilascio di antigene delle cellule tumorali e aumenta l'espressione del complesso HLA/antigene sulla loro

membrana aumentando così il bersaglio per la risposta immune indotta dal vaccino che potrebbe migliorare il controllo delle metastasi a distanza).

4. Studio di fase I-II di combinazione di vaccino peptidico e del reagente anti-angiogenico NGR-hTNF attualmente in fase II, come aggiunta alla chemioterapia in pazienti con cancro del colon (razionale: risultati pre-clinici indicano un potenziamento dell'effetto antitumorale della vaccinazione in seguito alle alterazioni dell'endotelio tumorale). La risposta clinica verrà valutata secondo i criteri RECIST.

A livello pre-clinico si propongono tre studi i cui risultati potranno avere un rapido trasferimento clinico anche sui protocolli proposti. Il primo consiste nella ri-analisi della immunogenicità dei peptidi dell'antigene hTERT già utilizzato in clinica come vaccino con risultati discordanti. Nel secondo verranno identificati epitopi promiscui dell'antigene survivina riconosciuti da linfociti T CD4 così da poterli usare per stimolare linfociti dei pazienti. Nel terzo si verificherà se un trattamento de-metilante *in vitro* possa aumentare l'espressione di antigeni e quindi l'immunogenicità dei tumori e se ciò sia ottenibile anche *in vivo* utilizzando farmaci appropriati.

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivo principale è di valutare se la combinazione di vaccino con altri agenti terapeutici (citochine, es. IFN- α), chemio/radioterapia (tomoterapia), nuovo reagente anti-vascolare (NGR/TNF) può indurre una più forte e duratura risposta immunologica e una migliore risposta clinica in confronto (storico) alla sola vaccinazione già praticata con gli stessi vaccini peptidici in pazienti con le patologie e lo stadio di malattia indicato. Inoltre se la riduzione dei principali effetti soppressori indotti dalla presenza del tumore (MSC, linfociti T reg) può tradursi in un significativo miglioramento della risposta immunologica e clinica.

Obiettivi secondari sono:

- Nello studio di vaccinazione con oncolisato di cellule di melanoma autologo, valutare se, interferendo coi meccanismi soppressori (Treg e MSC) e migliorando l'attivazione delle cellule dendritiche mediante somministrazione *in vivo* di IFN- α , si ottengono risposte di linfociti T dirette anche contro gli antigeni unici (da mutazione) in confronto a quelli cross-reagenti "self";
- Valutare se la risposta immune al vaccino si associa a varianti alleliche (polimorfismo) di geni coinvolti nella risposta immune dei singoli pazienti;
- Valutare se l'effetto dell'IFN- α di amplificazione della risposta autoimmune può far aumentare anche la risposta al vaccino, condizione essenziale per ottenere anche una risposta clinica;
- Valutare l'utilità di molecole marcatrici innovative (Pentrassine) per il monitoraggio della risposta macrofagica/infiammatoria (immunità innata);
- Valutare la potenzialità immunogena *in vitro* di hTERT, un antigene universale già usato come vaccino in clinica con risultati contraddittori, con lo scopo di verificare se la immunizzazione genera CTL capaci di lisare cellule tumorali e non solo di riconoscere cellule presentanti l'epitopo;
- Valutare la possibilità di aumentare la risposta ad antigeni tumorali (soprattutto di melanoma) in seguito a stimolazione con cellule trattate con composti de-metilanti.

Obiettivo generale è di verificare se qualcuna delle combinazioni terapeutiche testate può generare una frequenza e intensità di risposta immune ai vaccini tale da tradursi in una significativa risposta clinica misurata come risposta del tumore (RECIST) o come tempi di sopravvivenza rispetto a controlli storici.

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione del progetto Terapie biologiche combinate e personalizzate nei tumori solidi: studi di fase I-II

Proponente (Coordinatore del progetto)	Unità Operativa (UO) (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
HSR (Giorgio Parmiani)	UO1 (HSR: Giorgio Parmiani)	HSR	Giorgio Parmiani
		HSR	Ferruccio Fazio
		HSR	Angelo Corti
		HSR	Paolo Dellabona
		INT	Licia Rivoltini
	UO2 (ISTGE: Paola Queirolo)	Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena	Michele Maio
		ISS	Maria Ferrantini
		Humanitas	Cecilia Garlanda
		ISTGE	Paola Queirolo
		ISTGE	Paolo Bruzzi
	UO3 (IOV: Paola Zanovello)	ISTGE	Silvano Ferrini
		IOV	Paola Zanovello
		IOV	Vanna Chiarion-Sileni
		Università di Padova	Carlo Riccardo Rossi

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Nel contesto della UO1 coordinata da Giorgio Parmiani, sono stati proposti due studi clinici coordinati da HSR (Milano) e comprendenti: a) Studio di fase II randomizzato di IFN- α 2b ad alte dosi per un mese in combinazione con vaccino peptidico in pazienti con melanoma metastatico; b) Studio di fase I/II di combinazione di NGR-hTNF (anti-angiogenico) e vaccino peptidico in pazienti con melanoma.

Per gli studi clinici spontanei si è proceduto alla stesura dei protocolli che hanno incontrato difficoltà e subito ritardi a causa di fattori esterni non scientifici determinati da due elementi. Primo, la interruzione dell'uso dei vaccini peptidici prodotti dalla Merck Biosciences AG e già acquistati da diversi centri europei. Ciò ha richiesto di identificare un'altra fonte di produzione di vaccini peptidici GMP e di negoziare *ex-novo* l'acquisto dei peptidi costringendo anche ad una scelta diversa da quella originale e più ristretta in termini di numero di antigeni da utilizzare per ragioni di costi e di tempi di consegna. Questo problema ha richiesto mesi per essere risolto e oggi, grazie anche alla collaborazione del Ludwig Institute di Bruxelles e New York, abbiamo la disponibilità dei vaccini per iniziare gli studi programmati. La seconda causa di ritardo è da identificare nella rinegoziazione della fornitura di IFN- α 2b o di PegIntron con la Schering Plough che è stata nel frattempo acquistata da Merck con la conseguenza rivalutazione di tutti i programmi di oncologia e cambio dei dirigenti tra cui coloro che avevano manifestato interesse per il nostro protocollo. Intanto abbiamo ottenuto un parere informale della commissione ISS sul protocollo b (vedi sopra) che viene sottoposto entro novembre 2009 al comitato etico di HSR per la parte relativa alla fase II e alla Commissione ISS per la parte riguardante la fase I.

Il protocollo di combinazione IFN e vaccino è in fase di stesura finale e verrà sottoposto alle autorità regolatorie entro dicembre 2009.

Relativamente alla UO2 coordinata da Paola Queirolo, l'Oncologia Medica A e il Laboratorio di Terapia Immunologica dell'IST hanno proseguito l'iter per la sottomissione del protocollo (Studio di fase I-II di vaccinazione con oncolisato cellulare di melanoma autologo associato ad IFN- α 2b in pazienti con melanoma metastatico). Sono state preparate le istruzioni inerenti la preparazione del vaccino e ultimato la stesura del *Technology Transfer Report* (TTR). Parallelamente sono stati allestiti i documenti per la richiesta di autorizzazione dell'Officina Farmaceutica Cell Factory GMP dell'IST all'AIFA al fine della visita di ispezione ministeriale. Il ritardo nella sottomissione è dovuto alla necessità di eseguire adeguamenti della struttura GMP dell'IST e del protocollo sulla base dell'evoluzione della normativa vigente. Inoltre, previa approvazione da parte del Comitato Etico dell'IST, abbiamo eseguito 11 cicli di convalida del processo di preparazione del vaccino. I cicli sono stati condotti in condizione di GMP con monitoraggio microbiologico ambientale e certificazione di sterilità del vaccino prodotto da parte di una ditta esterna autorizzata. Il materiale è stato sufficiente per preparare 5 lotti di vaccino da pazienti diversi. Le maggiori difficoltà incontrate sono state la ridotta quantità del materiale di partenza e/o la ridotta crescita in coltura delle cellule tumorali.

Sono stati messi a punto i test per valutare risposte anticorpali su cellule di melanoma autologo e allogenico; questi test verranno utilizzati per la valutazione della risposta anticorpale al vaccino autologo e nel protocollo di vaccinazione peptidica +IFN α nel melanoma metastatico. Sono stati raccolti sieri di 15 pazienti trattati con IFN presso l'IST e l'IOV a 30, 90 e 180 giorni dalla somministrazione di IFN. Come test di screening è stata usata immunofluorescenza con anti Ig umane totale su cellule integre e su cellule permeabilizzate. I primi risultati indicano una reattività dei sieri dei pazienti contro antigeni intracellulari che viene confermata anche utilizzando cellule di melanoma allogeniche.

Si sta ampliando la casistica e valutando l'uso di microarrays proteici e di tecniche della proteomica per individuare antigeni riconosciuti dagli anticorpi in questione

L'attività della UO3 coordinata da Paola Zanovello, è articolata secondo due linee principali: 1) studio a livello preclinico delle proprietà immunologiche di hTERT (gruppo di ricerca Zanovello); 2-reclutamento e trattamento di pazienti con melanoma per lo studio multicentrico di alte dosi di IFN α associato a vaccino, e raccolta di materiale da pazienti selezionati per gli studi immunologici (gruppi di ricerca - Chiarion-Sileni e Rossi)

La ricerca condotta nel secondo anno di finanziamento ha studiato i bersagli cellulari dei linfociti T citotossici (CTL) specifici per l'antigene telomerasi (TERT) e ristretti per il peptide R865. Infatti, benché i CTL specifici per l'epitopo R865 siano in grado di riconoscere *in vitro* linee tumorali di diverso istotipo e di indurre *in vivo* un incremento della sopravvivenza di topi immunodeficienti inoculati con linee tumorali umane trapiantabili HLA-A2 positive, tali CTL non inducono completa regressione del tumore se non in una bassa percentuale di topi. Abbiamo pertanto ipotizzato che il bersaglio dei CTL TERT-specifici non sia l'intera massa tumorale ma solo la sottopopolazione di cellule ad alta proliferazione definita come *Cancer Stem Cells* (CSC). Le CSC esprimono costitutivamente telomerasi, e quindi rappresentano il bersaglio ideale di immunoterapia adottiva specifica. In collaborazione con il gruppo del prof. De Maria (ISS-Roma), abbiamo verificato prima la presenza e attività di telomerasi e poi l'espressione di HLA-A2. Tale indagine ci ha permesso di caratterizzare una linea CSC HLA-A2 positiva (CSC-13) e una HLA-A2 negativa (CSC-12). Entrambe le due linee cellulari presentavano la medesima attività di telomerasi. Abbiamo pertanto inoculato a gruppi distinti di animali immunodeficienti cellule CSC-13 o cellule CSC-12 come controllo. Dopo poche ore gli animali sono stati inoculati con CTL specifici per l'epitopo R865 o per l'epitopo R30 (utilizzato come controllo) di hTERT. Successivamente gli animali sono stati inoculati con IL-2. Il trasferimento

dei linfociti specifici per l'epitopo R865 ha abrogato la crescita delle cellule CSC-13 in tutti i topi trattati. I nostri dati, quindi, dimostrano che il trasferimento adottivo di CTL specifici per TERT è in grado di eliminare il pool di CSC e suggeriscono che questo approccio possa essere usato in combinazione con trattamenti anti-tumorali tradizionali potenziandone l'efficacia.

La collaborazione dei tre gruppi di ricerca afferenti all'UO prevede una valutazione preliminare sulla presenza di cellule soppressorie di derivazione mieloide nel sangue di pazienti con melanoma in stadio III radicalmente resecati e trattati con IFN adiuvante ad alte dosi. A questo scopo sono state separate cellule mononucleate e granulociti polimorfonucleati dal sangue dei pazienti prima dell'inizio della terapia e ad intervalli mensili. Le cellule così separate vengono analizzate mediante citofluorimetria dopo marcatura con un pannello di anticorpi monoclonali utili per l'identificazione fenotipica delle cellule oppresse nei campioni umani.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Bellone M, Mondino A, Corti A. Vascular targeting, chemotherapy and active immunotherapy: teaming up to attack cancer. *Trends Immunol* 2008;29:235-41.
2. Fratta E, *et al.* Epigenetically-regulated clonal heritability of Cancer Testis Antigens expression profiles in human melanoma. *J Cell Physiol* (in corso di stampa).
3. Mennuni C, Ugel S, Mori F, Cipriani B, Iezzi M, Pannellini T, Lazzaro D, Ciliberto G, La Monica N, Zanovello P, Bronte V, Scarselli E. Preventive vaccination with telomerase controls tumor growth in genetically engineered and carcinogen-induced mouse models of cancer. *Cancer Res* 2008;68(23):9865-74.
4. Sigalotti L, *et al.* Cancer testis antigens and melanoma stem cells: new promises for therapeutic intervention. *Cancer Immunol Immunother* 2009 Oct. 28 (online prima della stampa). prima della stampa).
5. Ugel S, Scarselli E, Iezzi M, *et al.* Autoimmune B cell lymphopenia following successful adoptive therapy with telomerase-specific T lymphocytes. *Blood* 2009 (in corso di stampa).

NUOVE MOLECOLE E PEPTIDI QUALI FARMACI REGOLATORI DEL CICLO CELLULARE E DELLA RISPOSTA A CHEMIOTERAPICI NEI TUMORI EPITELIALI E CUTANEI

Gerry Melino

Laboratorio di Biochimica, Istituto Dermopatico dell'Immacolata IRCCS, Roma

Base di partenza e razionale

La famiglia di p53 comprende tre membri: p53, p63 e p73. p53 è il gene mutato più frequentemente nei tumori umani. È un fattore trascrizionale, che è attivato rapidamente come risposta a danni genotossici od ad attivazione d'oncogeni, regolando l'espressione di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi. Analogamente a p53, p73 e p63 contengono un dominio di transattivazione (TA), un dominio di legame al DNA (DBD) e un dominio d'oligomerizzazione (*Oligomerization Domain*, OD). La struttura genica di p63 e p73 è molto complessa in quanto entrambi i geni codificano per diverse isoforme e per diverse varianti che derivano da splicing alternativi e da inizi di trascrizione diversi. In particolare, le varianti ΔN mancano del dominio TA e quindi agiscono da dominanti negativi. Dal momento che p53, p63 e p73 sono altamente omologhi, questi geni dovrebbero avere funzioni ridondanti. Infatti, sia p53 che p73 sono in grado di bloccare la crescita cellulare e indurre apoptosi. Conseguentemente, sia p63 che p73 sono coinvolti nella tumorigenesi, in particolare nei tumori epiteliali. Le proteine p53/p63/p73 cooperano nella tumorigenesi regolando l'apoptosi. Lo "status" dei geni della famiglia di p53 è un fattore importante nella prognosi e chemiosensibilità tumorale: l'azione di p63/p73 diventa quindi essenziale nei frequenti casi di inattivazione di p53. Infatti, deregolazioni di p63/p73 inducono resistenza alla citotossicità da chemioterapici.

Similmente a p53, l'espressione di p63 e p73 è mantenuta a bassi livelli nelle cellule di mammiferi, e la loro induzione e attivazione cellulare è principalmente controllata a livello post-traduzionale. Sia p63 che p73 sono ubiquitinati *in vivo* e degradati attraverso la via proteolitica proteasoma-dipendente. Mentre p53 è degradato da mdm2, noi abbiamo scoperto che la degradazione di p63/p73 è regolata da Itch, una ubiquitina E3 ligasi contenente HECT e appartenente alla famiglia Nedd4. Itch ha come bersaglio sia le varianti TAp73 che $\Delta Np73$, tenendo i loro livelli proteici bassi in condizioni normali. Oltre a p63/p73, Itch reprime la via di Hedgehog e dei suoi trasduttori (proteine Gli), la cui attivazione è frequentemente responsabile dell'insorgenza di tumori neuroectodermici.

Oltre ai farmaci anti-Itch per regolare i livelli di p63/p73, genereremo inibitori delle interazioni molecolari di p73. Sono stati identificati peptidi sintetici (che rappresentano la sequenza del dominio di legame specifico al DNA della proteina p73) che interagendo con la proteina p53 mutata ripristinano la funzione apoptotica della proteina p73. Il bersaglio molecolare individuato è rappresentato dal complesso proteico mutp53/p73, la cui attività oncogenica e il diretto coinvolgimento nella chemioresistenza di tumori a p53 mutata è stato documentato da vari studi *in vitro* e *in vivo*. Oltre ad usare Itch come target farmacologico diretto, è possibile ipotizzare un'azione sinergica con altre molecole che regolano punti diversi della stessa via: cicline-chinasi dipendenti (*Cyclin-Dependent Kinases*, CDK) e regolatori di IKK/NF- κ B. Nelle cellule tumorali si riscontra quasi costantemente un'aumentata attività delle

CDK e una modulazione negativa della loro attività/espressione può determinare inibizione della crescita tumorale *in vitro* e in modelli animali. Analogamente, la protein-chinasi RaLP regola proliferazione e sopravvivenza cellulare, promuovendo la tumorigenesi, e IKK/NF- κ B è costitutivamente attivata nei tumori, dove NF- κ B causa resistenza all'apoptosi da farmaci antitumorali. Inoltre, p63 e p73 regolano il ciclo cellulare, interagiscono con NF- κ B e transattivano IKK.

La regolazione farmacologia di Itch su p63/p73/Hedgehog/Gli ed eventuali sinergie con CDK/IKK/NF- κ B/RaLP è un'area totalmente inesplorata nel cancro e in particolare nei tumori epiteliali.

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

L'obiettivo principale di questo progetto è quello di sviluppare nuove molecole (da noi identificate) inibitori della E3-ubiquitina-ligasi Itch e di validare tali molecole nella via p63/p73 e nella via Hedgehog/Gli. Inoltre, valuteremo il potenziale terapeutico di peptidi capaci di disassemblare complessi proteici (mp53/p73) ad attività oncogenica, e studieremo il potenziale terapeutico di inibitori selettivi di NF- κ B/IKK e di CDK, come singoli agenti e in associazione con gli inibitori di Itch e chemioterapici convenzionali. Analizzeremo l'espressione della proteina chinasi RaLP nei melanomi e caratterizzeremo la trasduzione del segnale da essa attivata. Il progetto è suddiviso nei seguenti obiettivi specifici.

- Valutazione dell'espressione di p63/p73/Itch in tumori cutanei/linfomi.
- Studio delle proprietà biochimiche delle proteine leganti/regolanti ITCH.
- Generazione topi transgenici che esprimono alti livelli di p63 nei tessuti epiteliali.
- Identificazione di inibitori della E3 ligasi Itch.
- Caratterizzazione del complesso proteico mp53/p73 come bersaglio molecolare di peptidi sintetici; sintesi dei peptidi.
- Studio dell'effetto di piccole molecole ciclopentenoniche inibitrici della via IKK/NF- κ B e caratterizzazione del sistema IKK/NF- κ B e del *pathway* di HSF1 nei modelli prescelti.
- Identificazione delle molecole con proprietà agoniste di Numb, caratterizzarne l'interazione con Itch, Numb e le proteine Gli (Gli1, Gli2 e Gli3), e identificare i domini funzionali.
- Definizione degli effetti antitumorali di inibitori di CDK, come singoli agenti e in combinazione con chemioterapici convenzionali, su linee cellulari di melanoma umano e in modelli animali.
- Identificazione delle molecole coinvolte nella trasduzione del segnale migratorio mediato da RaLP, identificazione di inibitori della funzione di RaLP.

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione del progetto Nuove molecole e peptidi quali farmaci regolatori del ciclo cellulare e della risposta a chemioterapici nei tumori epiteliali e cutanei

Proponente (Coordinatore del progetto)	Unità Operativa (UO) (ente di appartenenza: responsabile)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
IDI (Gerry Melino)	UO1 (IDI: Gerry Melino)	IDI	Gerry Melino
		Università Tor Vergata	Eleonora Candi
	UO2 (IRE: Giovanni Blandino)	IRE	Giovanni Blandino
		Università Tor Vergata	Maria Grazia Santoro
	UO3 (IDI: Stefania D'Atri)	IEO	Luisa Iannone
		ISTGE CNR	Stefania D'Atri Ulrich Pfeffer Ester Alvino

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

L'obiettivo principale di questo progetto è quello di sviluppare nuove molecole inibitori della E3-ubiquitina-ligasi Itch e di validare tali molecole nella via p63/p73 e nella via Hedgehog/Gli. Inoltre, abbiamo intrapreso la valutazione del potenziale terapeutico di diversi agenti, quali i) peptidi capaci di disassemblare complessi proteici (mp53/p73); ii) inibitori selettivi di NF- κ B/IKK e di CDK, come singoli agenti e in associazione con gli inibitori di Itch e chemioterapici convenzionali.

Le diverse unità hanno sviluppato le ricerche descritte nel progetto, raggiungendo gli obiettivi intermedi previsti per il secondo anno, di seguito in dettaglio.

- Unità operativa 1

Sviluppo di nuove molecole inibitorie della E3-ubiquitina-ligasi Itch e di validare tali molecole nella via p63/p73

Questa unità ha dimostrato le proprietà di oncosoppressore dell'isoforma TAp73 tramite la caratterizzazione di topi TAp73^{-/-}. Abbiamo dimostrato che TAp73 interagisce con le proteine regolatrici del fuso Bub1, Bub3 e BubR1 e fibroblasti derivanti da topi TAp73^{-/-} hanno un'elevata incidenza di aneuploidia caratterizzata da difetti dell'assemblaggio del fuso mitotico.

Per quanto riguarda i meccanismi regolativi dell'espressione dei geni della famiglia di p53 abbiamo identificato una nuova E3 ubiquitina ligasi capace di legare, ubiquitinare e regolare la degradazione proteica di p73: il complesso SCF^{FBXO45}.

Per quanto riguarda l'identificazione di nuove vie potenzialmente importanti nel modulare la risposta apoptotica indotta da trattamenti chemioterapici, abbiamo dimostrato che la regolazione dell'espressione dell'enzima de-ubiquitinasi USP47 può essere importante nei processi apoptotici indotti da diversi agenti genotossici in cellule tumorali. Abbiamo inoltre dimostrato il potenziale terapeutico dei mediatori farmacologici dei flussi autofagici, quali il clomipramin (approvata dall'FDA) e il suo metabolita attivo desmethylelomipramina (DCMI).

Per quanto riguarda p63 abbiamo identificato un nuovo meccanismo c-Abl/TAp63 importante nella regolazione dell'infertilità causata dagli agenti chemioterapici.

- *Unità operativa 2*

Il complesso proteico m-p53/p73 come bersaglio terapeutico nel trattamento dei tumori umani

Abbiamo generato due versioni del peptide SIMP1 che è in grado di rompere i complessi m-p53/p73 in cellule tumorali portatrici della mutazione p53His-273. La sostituzione del K138 in Ala138 non impedisce la formazione del complesso DNA/p73/mutp53His273; la sostituzione del residuo K138 con Arginina potenzia gli effetti interferenti esercitati dal peptide SIMP1 sul complesso proteico mm-p53/p73. Il trapianto in topi nudi di cellule tumorali di carcinoma della mammella (MDA-MB-468) e di carcinoma del colon (HT-29) trasdotte con i peptidi SIMP1 e SIMP1M evidenziava una drastica riduzione del calibro dei tumori rispetto a quelli presenti nei gruppi di controllo inoculati con i peptidi SIMP1KO o con il SIMP5M. Inoltre, il trattamento quotidiano per via intramuscolare di topi nudi portatori di tumori indotti dall'inoculo di cellule HT29 con peptidi SIMP1 e SIMP1M. evidenziava una riduzione significativa della massa tumorale, rispetto ai topi di controllo trattati con i peptidi di controllo SIMP5 (specifici per la m His175).

Il sistema IKK/NF- κ B come bersaglio strategico nella terapia antitumorale

Abbiamo identificato e caratterizzato un nuovo gene bersaglio del fattore HSF1: il gene AIRAP. Attraverso un'analisi di mutagenesi sito-specifica è stato identificato il sito HSE di HSF1-binding responsabile dell'induzione dopo stress termico, identificando AIRAP come un gene 'heat shock'.

Identificazione delle molecole coinvolte nella trasduzione del segnale migratorio mediato da RaLP e inibizione della sua funzione

Abbiamo dimostrato che l'espressione di RaLP in 154 casi di melanomi primari è specifica dei melanomi invasivi. Una prima analisi ha indicato che la presenza di RaLP nel melanoma correla significativamente con l'indice di Breslow, il livello di Clark, l'ulcerazione e l'istotipo. generati un topo geneticamente delecto per RaLP (RaLP-KO) e un topo transgenico (topo RaLP Kin). Il topo RaLP-KO, rappresenta un eccellente modello per lo studio del ruolo di RaLP sia nella migrazione, sia nella differenziazione *in vitro*. Il topo RaLP-Kin consente invece l'iperespressione di RaLP mediante inserimento del cDNA umano all'interno del locus HPRT murino, e questi animali verranno caratterizzati per eventuale formazione di tumori spontanei o indotti da DMBA e per eventuale potenziale metastatico.

- *Unità operativa 3*

Studio del potenziale terapeutico di inibitori di chinasi ciclina-dipendenti (CDK-Is) nel melanoma

Abbiamo caratterizzato i meccanismi molecolari implicati nell'attività antiproliferativa del CDK2-I nelle linee di melanoma GL-Mel, M10. Nella linea GL-Mel trattata con il CDK2-I, è stata evidenziata una significativa riduzione dei livelli di RB, fosfo-RB-Thr826, fosfo-RB-Thr821 e ciclina A, mentre è stato osservato un aumento dei livelli di p27^{Kip1}, p21^{Cip1}, p53, ciclina D1 e ciclina E. Nella linea M10, circa 4 volte meno sensibile della linea GL-Mel al CDK2-I, è stata evidenziata una moderata diminuzione dell'espressione di fosfo-RB-Thr821 e un moderato aumento dell'espressione di p21^{Cip1}. Sono stati inoltre determinati i profili d'espressione genica di cellule GL-Mel di controllo o trattate con il CDK2-I (0.625 mM per 24 h). L'analisi bionformatica dei dati ha evidenziato 71 geni significativamente sotto-espressi e 50 geni significativamente sovra-espressi nelle cellule trattate rispetto alle cellule di controllo. L'analisi di arricchimento di

categorie funzionali ha rivelato esclusivamente categorie associate a ciclo cellulare, mitosi, divisione cellulare, compatibilmente con il meccanismo d'azione dell'inibitore.

Identificazione di inibitori della pathway oncogenica di Hedgehog/Gli e loro uso nella soppressione della tumorigenesi cerebrale

Sono state identificate "signature" di espressione di microRNA in una casistica di medulloblastomi umani che caratterizzano il tipo istologico, le caratteristiche molecolari e la prognosi. Sono stati inoltre identificati tre microRNA che regolano la pathway di Hedgehog (Smoothed e Gli1) e la crescita e differenziamento di progenitori neurali e cellule di medulloblastoma, la cui espressione è ridotta nel tumore umano per alterazioni genetiche ed epigenetiche.

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

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

1. Belardo G, Piva R, Santoro MG. Heat stress triggers apoptosis by impairing NF-kappaB survival signalling in malignant B cells. *Leukemia* 2009 Nov 19 (online prima della stampa). prima della stampa).
2. Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, Melino G. The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell* 2008;14:10-21.
3. Caporali S, Alvino E, Starace G, Ciomei M, Brasca MG, Levati L, Garbin A, Castiglia D, Covaciu C, Bonmassar E, and D'Atri S. The cyclin-dependent kinase inhibitor PHA-848125 suppresses the *in vitro* growth of melanomas sensitive or resistant to temozolomide and shows synergistic effects in combination with this triazene compound. *Pharmacol Res* (inviato per la pubblicazione).
4. Careccia S, Mainardi S, Pelosi A, Gurtner A, Diverio D, Riccioni R, Testa U, Pelosi E, Piaggio G, Sacchi A, Lavorgna S, Lo-Coco F, Blandino G, Levrero M, Rizzo MG. A restricted signature of miRNAs distinguishes APL blasts from normal promyelocytes. *Oncogene* 2009;28(45):4034-40.
5. Ciuffini L, Belardo G, Angelini M, Santoro MG. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 triggers apoptosis in human melanoma cells by impairing NF-kB survival signaling: role of the Jun-N-terminal kinase. Manoscritto in preparazione.
6. Di Agostino S, Cortese G, Monti O, Dell'orso S, Sacchi A, Eisenstein M, *et al.* The disruption of the protein complex mutantp53/p73 increases selectively the response of tumor cells to anticancer drugs. *Cell Cycle* 2008;7(21):3440-7.
7. Di Agostino S, Dell'Orso S, Cortese G, Eisenstein M, Citro G, Strano S, Blandino G. SIMP1 impairs *in vivo* tumor growth and response to anticancer agents of mutant p53 tumors. Manoscritto in preparazione.
8. Enzler T, Chang X, Facchinetti V, Melino G, Karin M, Su B, *et al.* MEKK1 binds HECT E3 ligase Itch by its amino-terminal RING motif to regulate Th2 cytokine gene expression. *J Immunol* 2009;183:3831-8.
9. Ferretti E, De Smaele E, Miele E, Laneve P, Po A, Pelloni M, *et al.* Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *EMBO J* 2008;27:2616-27.
10. Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MSB, *et al.* microRNA profiling in human medulloblastoma. *Int J Cancer* 2009;124(3):568-77.
11. Fontemaggi G, Dell'Orso S, Trisciuglio D, Shay T, Melucci E, Fazi F, Terrenato I, Mottolese M, Muti P, Domany E, Del Bufalo D, Strano S, Blandino G. The execution of the transcriptional axis

- mutant p53, E2F1 and ID4 promotes tumor neo-angiogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16(10):1086-93.
12. Gagiannis S, Muller M, Uhlemann S, Koch A, Melino G, Krammer PH, *et al.* Parathyroid hormone-related protein confers chemoresistance by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. *Int J Cancer* 2009;125:1551-7.
 13. Gonfloni S, Di Tella L, Caldarola S, Cannata SM, Klinger FG, Di Bartolomeo C, *et al.* Inhibition of the c-Abl-TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death. *Nat Med* 2009;15:1179-85.
 14. Hansen TM, Rossi M, Roperch JP, Ansell K, Simpson K, Taylor D, *et al.* Itch inhibition regulates chemosensitivity *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:33-6.
 15. Klanrit P, Taebunpakul P, Flinterman MB, Odell EW, Riaz MA, Melino G, *et al.* PML involvement in the p73-mediated E1A-induced suppression of EGFR and induction of apoptosis in head and neck cancers. *Oncogene* 2009;28:3499-512.
 16. Melino G, Gallagher E, Aqeilan RI, Knight R, Peschiaroli A, Rossi M, *et al.* Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell Death Differ* 2008;15:1103-12.
 17. Peschiaroli A, Scialpi F, Bernassola F, Pagano M, Melino G. The F-box protein FBXO45 promotes the proteasome-dependent degradation of p73. *Oncogene* 2009;28:3157-66.
 18. Peschiaroli A, Skaar J, Pagano M, Melino G. The ubiquitin-specific protease USP47 is a novel beta-TRCP regulating cell survival. *Oncogene* 2009 (in corso di stampa).
 19. Piva R, Ciucci A, Ferreri C, Belardo G, Evans P, Roberts SM, Santoro MG. Antitumoral activity of novel prostanoid mimetics targeting the NF-kB pathway. Manoscritto in preparazione.
 20. Pockley AG, Calderwood SK, Santoro MG. *Prokaryotic and eukaryotic heat shock proteins in infectious disease*. New York: Springer-Verlag; 2009.
 21. Raimondo D, Giorgetti A, Bernassola F, Melino G, Tramontano A. Modelling and molecular dynamics of the interaction between the E3 ubiquitin ligase Itch and the E2 UbCH7. *Biochem Pharmacol* 2008;76(11):1620-7.
 22. Rivetti di Val Cervo P, Tucci P, Majid A, Lena MA, Agostini M, Bernardini S, *et al.* p73, miR106b, miR34a, and Itch in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113:6498-9; author reply 6499-6500.
 23. Rossi A, Santoro M.G. Differential regulation of human versus mouse HSP70 gene expression by cyclopentenone prostaglandin A1: role of HSF1 phosphorylation. Manoscritto in preparazione.
 24. Rossi A, Trotta E, Brandi R, Arisi I, Coccia M, Santoro MG. AIRAP: a new heat shock gene regulated by Heat Shock Factor 1. 2009. (inviato per la pubblicazione).
 25. Rossi M, Inoue S, Walewska R, Knight RA, Dyer MJ, Cohen GM, *et al.* Caspase cleavage of Itch in chronic lymphocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009a;379:659-64.
 26. Rossi M, Munarriz ER, Bartesaghi S, Milanese M, Dinsdale D, Guerra-Martin MA, *et al.* Desmethyleclomipramine induces the accumulation of autophagy markers by blocking autophagic flux. *J Cell Sci* 2009b;122:3330-9.
 27. Schilling T, Schleithoff ES, Kairat A, Melino G, Stremmel W, Oren M, *et al.* Active transcription of the human FAS/CD95/TNFRSF6 gene involves the p53 family. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;387:399-404.
 28. Scialpi F, Malatesta M, Peschiaroli A, Rossi M, Melino G, Bernassola F. Itch self-polyubiquitylation occurs through lysine-63 linkages. *Biochem Pharmacol* 2008;76(11):1515-21.
 29. Seitz SJ, Schleithoff ES, Koch A, Schuster A, Teufel A, Staib F, *et al.* Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. *Int J Cancer* 2009 Aug 26 (online prima della stampa).

30. Tomasini R, Tsuchihara K, Tsuda C, Lau SK, Wilhelm M, Ruffini A, *et al.* TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:797-802.
31. Vernole P, Neale MH, Barcaroli D, Munarriz E, Knight RA, Tomasini R, *et al.* TAp73alpha binds the kinetochore proteins Bub1 and Bub3 resulting in polyploidy. *Cell Cycle* 2009;8:421-9.

PROGRAMMA 4

Promozione della collaborazione internazionale con particolare riferimento a quella europea

Coordinatori

Filippo Belardelli, Claudio Lombardo

PROGRAMMA 4 DELL'ART. 3 DM 21 LUGLIO 2006: LE BASI RAZIONALI DELL'INTERVENTO

Claudio Lombardo (a, b), Francesca d'Alessandro (a, b), Tania Rondanina (a, b), Nadia Nasso (a, b), Daniela Majerna (b), Giuliano D'Agnolo (b), Franca Moretti (c), Maria Romero (b, c), Ugo Visconti (b, c), Filippo Belardelli (c)

(a) *Rapporti Scientifici Internazionali, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova*

(b) *Alleanza Contro il Cancro, Roma*

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

Premessa

L'identificazione di bersagli molecolari e di farmaci ad essi mirati e la modulazione dei fenomeni mediati dal sistema immunitario hanno completamente modificato i meccanismi di controllo della malattia oncologica per gli aspetti di prevenzione, diagnosi e trattamento. L'acquisizione di nuove conoscenze derivanti da studi di biologia molecolare e cellulare e le applicazioni che ne conseguono rendono indispensabile il superamento del gap disciplinare esistente ed una maggiore interazione tra la ricerca di base, l'epidemiologia e la clinica.

L'approccio multidisciplinare allarga i confini della programmazione nazionale anche al di là di quella europea e da questo vincolo non può esulare la programmazione di un'Associazione di riferimento quale Alleanza Contro il Cancro (ACC) che, pur agendo a livello nazionale, ha il dovere di guardare oltre i confini territoriali, al fine di contribuire efficacemente al continuo divenire del progresso scientifico e tecnologico in un'ottica di sviluppo che tenga conto delle aspettative dei pazienti e delle priorità stabilite dai programmi nazionali, esaltando la professionalità dei ricercatori e di quanti operano nelle strutture che la compongono, innalzandone i livelli di eccellenza.

Quanto sopra esposto giustifica un intervento programmatico inteso ad armonizzare gli adempimenti di ricerca di ACC in un'ottica di partecipazione consapevole e coerente con la necessità di partecipare da protagonisti alla costruzione dell'area europea della ricerca in oncologia e discipline biomediche correlate, con riferimento particolare agli aspetti traslazionali: a queste finalità deve considerarsi asservito e in continuo divenire il Programma 4 dell'art. 3 del DM 21 luglio 2006.

Per affrontare la malattia oncologica ed in generale le malattie croniche, il National Institutes of Health (US) ha sviluppato un piano strategico, denominato "P4 Medicine Initiative", dove le P significano "Predictive, Personalised, Pre-emptive and Participative".

L'approccio coordinato mira a realizzare nuovi sistemi diagnostici e terapeutici che dovrebbero essere sviluppati grazie ad una migliore comprensione dell'origine della malattia a livello genico. Sulla stessa lunghezza d'onda si è mossa la Commissione Europea che oltre alle attività previste dalla programmazione "traslazionale" del tema Health del VII PQ, ha recentemente lanciato la "European Partnership for Action Against Cancer", un'iniziativa che, facendo leva su fondi che dovrebbero essere resi disponibili anche da parte degli Stati Membri, mira a ridurre del 15% (circa mezzo milione) il numero di casi di cancro entro il 2020. Questa iniziativa è in linea con la strategia globale enunciata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità con il Piano d'Azione 2008-2013 per la prevenzione ed il controllo delle malattie non trasmissibili.

Uno dei settori chiave della strategia europea per la ricerca oncologica rimane comunque la promozione del processo di traslazione inteso come supporto per la realizzazione di nuove infrastrutture o potenziamento delle esistenti, sviluppo di attività formative e ricerca collaborativa sia per aspetti di coordinamento che per lo sviluppo di attività finalizzate.

È proprio sul potenziamento del processo di traslazione che si è focalizzato il Progetto per l'internazionalizzazione messo a punto tramite il Programma 4.

Frammentazione della ricerca oncologica in Europa

Nonostante i notevoli passi compiuti per una migliore comprensione dei processi biologici alla base della patogenesi del processo neoplastico, risulta ancora molto difficile pervenire a risultati che migliorino la sopravvivenza e la qualità della vita dei malati di tumore. Tale apparente paradosso può essere spiegato dal fatto che il cancro sembra essere molto più complesso di quanto si pensasse e che i percorsi attraverso i quali le scoperte vengono tramutate in cure più efficaci risultano molto impegnativi e difficili da gestire anche per gli aspetti di natura finanziaria che comportano.

Dal punto di vista organizzativo, la ricerca sul cancro è frammentata, con la conseguente moltiplicazione degli sforzi di programmazione, dell'identificazione delle priorità e degli strumenti di finanziamento. L'approccio moderno alla ricerca traslazionale sul cancro, oltre ad impiegare approcci multidisciplinari basati sulla conoscenza per ottenere strumenti diagnostici e cure mirate per il tumore, richiede la possibilità di accedere a campioni biologici e ad infrastrutture, quali le biobanche, che dispongano di informazioni cliniche, bioinformatica, piattaforme tecnologiche, accesso a nuove tecnologie standardizzate, nonché a centri di sperimentazione clinica.

È pertanto fondamentale definire un coordinamento di livello sovranazionale che coinvolga aspetti organizzativi, di comunicazione, l'interazione e la cooperazione tra i ricercatori di base e i clinici, i decisori politici nell'ambito scientifico, le agenzie regolatorie ed etiche, gli enti finanziatori, l'industria, i malati e la società nel suo insieme, al fine di accelerare la trasformazione ed il trasferimento delle nuove scoperte e tecnologie alla pratica clinica.

La comunità scientifica nazionale dovrebbe pertanto essere stimolata a trovare forme di collaborazione in tutti i settori della biomedicina al fine di ridurre le improvvisazioni ed aumentare le possibilità di successo grazie ad una programmazione concertata degli interventi. La partecipazione alla costruzione dell'area europea della ricerca oncologica deve basarsi su un sistema organizzativo concordato a livello centrale che agisca da ponte con la comunità scientifica e gli enti governativi preposti ad interagire formalmente con le entità sovranazionali. L'approccio ISS / ACC / Ministeri sembra essere una buona soluzione per pervenire a risultati di interesse comune lasciando ovviamente ai ricercatori ed alle loro istituzioni di appartenenza la libertà di partecipare a singoli progetti di ricerca dove l'unicità della competenza è il presupposto per la partecipazione stessa.

Razionale dell'intervento di programmazione delle attività per l'internazionalizzazione di ACC

A livello nazionale si osservano molte disparità nelle possibilità terapeutiche che vengono offerte ai pazienti oncologici. Le strutture partecipanti ad ACC si devono attestare ai massimi livelli terapeutici riscontrabili proprio per il ruolo di riferimento che viene loro riconosciuto a

livello regionale, nazionale e internazionale. Tale collocazione può essere garantita privilegiando un approccio traslazionale e multidisciplinare che dia continuità all'evoluzione degli interventi clinici basati sulle evidenze in un contesto di sviluppo internazionale.

Nel rispetto del mandato che ACC ha assegnato al Programma 4 per quanto attiene alla promozione del trasferimento dell'eccellenza nazionale verso la programmazione internazionale, era necessario definire un Programma di lavoro che potesse concretamente sostenere il processo sopra brevemente descritto. Tale programma denominato "Promozione della collaborazione internazionale con particolare riferimento a quella europea" è stato disegnato nel 2007 ed ha iniziato la sua operatività nei primi mesi del 2008 sostenendo lo sviluppo di interventi che hanno consentito di pervenire ai risultati di seguito descritti.

In generale, seppure il Programma identificasse singole progettualità che potevano ottenere sostegno nella programmazione europea, si confidava sulla possibilità di poter pervenire a 5 obiettivi fondamentali:

- definire e sostenere una posizione italiana da promuovere a livello internazionale;
- sostenere i gruppi e le reti eccellenti di ricerca nel loro processo di internazionalizzazione;
- partecipare alla realizzazione di una piattaforma europea per la ricerca traslazionale in oncologia dove il Paese potesse svolgere un ruolo di riferimento;
- proiettare ACC nel contesto internazionale acquisendo credibilità verso gli enti governativi e di ricerca;
- porre le basi per poter consentire una sostenibilità delle attività di ACC anche al termine del periodo di riferimento del DM.

A due anni dal lancio del programma 4 ed alla luce dei risultati ottenuti, si può affermare che l'approccio coordinato per lo sviluppo di un processo di internazionalizzazione basato sul merito ha avuto il successo sperato anche grazie al modello organizzativo messo a punto ed alla conoscenza approfondita dello scenario internazionale.

Tale approccio ha contribuito ad aumentare l'autorevolezza del Paese nel settore oncologico e consentirà di sostenere delle scelte che saranno potenzialmente in grado di migliorare la qualità e la certezza della cura, e nel contempo offrire ai nostri giovani ricercatori maggiori possibilità di sperare in un futuro che risponda alle loro aspettative.

Tale processo potrà ulteriormente svilupparsi solo se, dopo la fase molto impegnativa finora sostenuta dagli organi preposti di ACC ed ISS, si realizzi un coinvolgimento di quanti abbiano le competenze per contribuire allo svolgimento delle attività che attualmente fanno parte del pacchetto di iniziative a diverso titolo finanziate o finanziabili da parte di organismi internazionali.

Poiché il Programma 4 ha puntato al rilancio delle capacità nazionali di sviluppare interventi in ricerca traslazionale, appare evidente che nella seconda fase di attivazione delle attività e per il periodo 2010-2015, un'attenzione particolare potrà essere rivolta anche al rapporto con l'industria di settore. ACC si potrà quindi confrontare anche con i partner industriali al pari di una grande impresa il cui prodotto terminale è il "malato-curato" o gli interventi di informazione - prevenzione rivolti alla società. Per raggiungere tale obiettivo il sistema organizzativo interno di ACC dovrà svilupparsi ponendo maggiore attenzione alla realizzazione di sistemi gestionali di qualità, dove efficienza e capacità innovativa possano confluire a beneficio della comunità scientifica che ha posto anche su ACC le sue aspettative di successo.

Occorre tuttavia registrare che esistono ancora carenze e difficoltà di comunicazione tra i membri di ACC. Tali ostacoli devono essere superati se si vorrà sviluppare al meglio un processo di internazionalizzazione della ricerca oncologica nazionale. Affrontare in modo organico tali difficoltà e sfide, con la lucidità derivante da una valutazione meritocratica e dalla conoscenza dell'esistente, può portare a raggiungere i traguardi che seguono:

- uso efficiente delle risorse;
- riduzione delle situazioni di “casualità” nel processo decisionale;
- miglioramento della qualità della ricerca oncologica;
- programmazione degli interventi con una visione globale e conseguente potenziamento dei risultati;
- potenziamento del ruolo di ACC tra gli attori della programmazione nazionale ed europea;
- riduzione dei conflitti interni all’organizzazione che spesso possono essere la prima causa del naufragio delle iniziative;
- stimolo al sostegno da parte degli enti governativi preposti .

Nell’ambito del Programma 4 del DM “ISS per ACC”, e per l’anno 2009 sono stati sostenuti macrosettori di attività che hanno puntato su opportunità emergenti nella programmazione internazionale.

Nel complesso, nel corso del secondo anno di attività, sono state avviate una serie di iniziative progettuali; non potendo prevedere in anticipo quali interventi avrebbero condotto a risultati concreti e in che misura avrebbero dovuto essere sostenuti, in fase di attivazione si è proceduto ad una ripartizione finanziaria indicativa dei fondi residui del primo anno. Tale ripartizione ha consentito di consolidare le iniziative che hanno dimostrato una concreta possibilità di sviluppo ed a sostenere nuove ipotesi di lavoro anche a scapito di interventi già programmati che, seppure avessero buone prospettive operative, non hanno trovato nel Paese concreti interessi scientifici in grado di sostenerle nel loro processo di maturazione e realizzazione. L’approccio adottato dal Programma 4 mira anche a stimolare una riflessione interna al Paese che possa dare nuovo slancio agli aspetti traslazionali della ricerca oncologica per renderla più consona alle esigenze applicative della ricerca clinica.

Attuazione del programma: strategia, risultati e prospettive

In generale si può affermare che il Programma 4 si è dimostrato in grado di dare valore aggiunto agli investimenti nazionali, di partecipare con uno spirito-Paese alla costruzione dell’Area Europea della Ricerca in oncologia e discipline biomediche correlate, di offrire maggiori possibilità al Paese di svolgere un ruolo da protagonista nel contesto internazionale stabilendo una sinergia tra merito, organizzazione e interazione con gli organi governativi di riferimento.

A due anni dal lancio del Programma 4 sembrano essere state raggiunte le condizioni necessarie a sviluppare in maniera sistematica l’abitudine a collaborare stabilendo interfacce formali con le istituzioni omologhe ad ACC presenti in altri Paesi e con i progetti europei d’interesse oncologico in atto o in fase di progettazione.

Particolare attenzione è stata posta allo sviluppo di alcune infrastrutture di ricerca della fase preparatoria della *roadmap* disegnata dallo *European Strategy Forum on Research Infrastructures*, nel cui ambito il Programma 4 ha consentito al Paese di colmare l’assenza in alcuni dei settori più promettenti per lo sviluppo della ricerca biomedica e per l’impatto economico e sanitario. Tale approccio, oltre a garantire il MIUR ed il Ministero della Salute nel processo di investimento per il sostegno alle infrastrutture nazionali, qualifica la partecipazione italiana che, da una fase di intervento spontaneo, si trasforma in programma di Governo da sostenere anche a livello regionale, a conferma del fatto che il concetto di globalizzazione della

ricerca e dello sviluppo industriale non possono esulare da un sostegno nazionale e locale. Uno sforzo sempre maggiore dovrà essere dedicato in futuro alla promozione del collegamento alle infrastrutture europee in fase di preparazione e alla realizzazione di reti di ricerca traslazionali agendo in sinergia con il Ministero della Salute.

Il Programma 4 ha dato l'avvio ad un processo a cascata che si auspica possa consentire ai gruppi operanti nel contesto di ACC di partecipare ad interventi di valenza sovranazionale, dai quali, probabilmente, sia la comunità scientifica di riferimento sia il Paese sarebbero rimasti esclusi o per i quali si sarebbero potute verificare partecipazioni casuali e comunque non rientranti in una strategia nazionale.

A tal riguardo è necessario sottolineare come, per ragioni di opportunità, in molti casi è apparso necessario favorire la partecipazione dell'Istituto Superiore di Sanità con un ruolo di leader, in qualità di braccio operativo del Ministero della Salute.

Tale opportunità è stata applicata per la partecipazione alle infrastrutture di ricerca (dove rientra anche l'oncologia), per l'ERA-Net sulla ricerca traslazionale e per il progetto di formazione tramite la mobilità TRAIN (*Training through Research Application Italian iNitiative*), ovviamente senza escludere ACC dal partenariato europeo.

Un altro aspetto qualificante del processo in corso è l'impiego di 5 unità di personale, a tempo determinato, specificamente dedicato alle attività collaborative internazionali e al loro sviluppo nazionale. È auspicabile che al termine del periodo di contratto, almeno in parte tale personale possa essere confermato gravando su progetti acquisiti o nell'ambito di interventi previsti nel quadro di sviluppo delle attività collaborative promosse. ACC non si può permettere di disperdere le competenze del personale che attualmente fornisce l'indispensabile sostegno organizzativo ai progetti acquisiti.

La partecipazione all'infrastruttura europea per la ricerca traslazionale EATRIS (*European Advanced Translational Research InfraStructure in Medicine*) ha dato l'avvio ad un processo di ampio respiro, caratterizzato da un ruolo leader del nostro Paese sugli aspetti regolatori ed etici per la ricerca traslazionale, che ha suggerito di promuovere l'attivazione della fase preparatoria per realizzare l'*Italian Advanced Translational Research Infrastructure* (IATRIS) in accordo con il Ministero della Salute. Inoltre, grazie alle attività sviluppate nell'ambito del Programma 4, sono state create le basi per un'importante partecipazione di ISS e ACC nelle fasi preparatorie dei progetti per la creazione di altre 2 infrastrutture europee nel settore della biomedicina: quella per i trial clinici e le bioterapie, ECRIN (*European Clinical Research Infrastructures Network*), e quella sulle biobanche e le risorse molecolari BBMRI. Allo stesso tempo, è stata formalizzata la partecipazione di ACC in qualità di Programme Manager nella proposta di ERA-Net sulla ricerca traslazionale in oncologia coordinato dal Ministero della Salute che coinvolgerà 25 istituzioni in 19 nazioni europee e potrebbe rappresentare il primo risultato di successo al quale il Paese porrebbe nell'applicazione dello strumento di rete europea nel settore biomedico.

A seguito dell'organizzazione della settimana oncologica europea OECI 2008 della *Organisation of European Cancer Institutes* tenutosi a Genova dal 20 al 24 maggio 2008, nel cui ambito è stata ipotizzata la necessità di promuovere attività di ricerca in nano-oncologia, si è concretizzato il lancio di un bando europeo e la conseguente sottomissione di una proposta di ricerca per gli aspetti di nanotecnologie applicate al cancro, dove ACC svolge funzioni da co-leader fornendo un'ulteriore dimostrazione delle capacità di coordinamento che ACC può rendere disponibili.

Per quanto concerne gli aspetti formativi, è in fase di conclusione la negoziazione del progetto TRAIN, una proposta per l'attivazione di 51 borse annuali di mobilità in ricerca traslazionale in oncologia. Tale programma, oltre a posizionare ACC nel contesto internazionale tra le grandi istituzioni oncologiche attive nel settore formativo, darà l'avvio ad un intervento a

sostegno di una migrazione mirata di ricercatori italiani, attivando nel contempo un processo di rientro di scienziati da altri Paesi europei o terzi.

Non si può nascondere che sono stati incontrati ritardi e difficoltà che, seppure attesi in un programma di vaste dimensioni e aspettative, potrebbero essere superati grazie ad un auspicabile maggiore impegno del Paese a disegnare e sostenere politiche di internazionalizzazione derivanti dalla definizione di una posizione Paese da difendere su tutti i tavoli di trattativa nazionali ed europei ed in un processo di concertazione interministeriale.

Oltre ai risultati pratici conseguiti, al Programma 4 deve comunque essere riconosciuto il merito di aver attirato l'attenzione dei Ministeri competenti dando vita ad un processo di collaborazione nel settore biomedico che costituisce l'elemento di maggior rilievo di tutto il processo avviato. Il Programma 4, a due anni dall'avvio effettivo della sua attività, ha fornito risposte concrete anche per gli aspetti di immagine che ne è scaturita a livello europeo.

PROGRAMMA 4 DEL DM ISS PER ACC: RELAZIONE CONSUNTIVA 2009

Claudio Lombardo (a, b), Filippo Belardelli (c)

(a) *Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova*

(b) *Alleanza Contro il Cancro, Roma*

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

Sono di seguito indicati, punto per punto, seppur brevemente, i risultati conseguiti nel corso del secondo anno di attività del Programma 4.

Le attività svolte sono state anche pubblicizzate grazie alla realizzazione di un opuscolo informativo e alcuni poster che sono regolarmente utilizzati in occasione di convegni e conferenze per promuovere l'immagine e le attività dell'associazione.

Promozione della mobilità in entrata, in uscita e di reintegrazione

Alla luce della sempre maggiore complessità della ricerca sul cancro, l'impegno di Alleanza Contro il Cancro con l'Istituto Superiore di Sanità è rivolto alla promozione della partecipazione italiana alla costruzione dello Spazio Europeo della Ricerca, dove viene data priorità assoluta alla formazione tramite la ricerca. L'Italia si trova ad affrontare grandi difficoltà nel trattenere i migliori scienziati e nell'offrire un ambiente capace di attirare ricercatori che hanno maturato una grande esperienza all'estero. Al fine di superare in parte questo problema fortemente sentito all'interno della comunità scientifica e di promuovere interventi formativi di ricerca traslazionale in oncologia, ACC ed ISS, hanno sviluppato il piano di mobilità internazionale denominato "Training through Research Application Italian iNitiative" (TRAIN2). Tale progetto consisterà di un totale di 51 borse in uscita, in entrata e di reintegrazione, con il sostegno del Programma europeo PEOPLE, nell'ambito dell'Azione Marie Curie "COFUND" per il cofinanziamento di programmi internazionali, nazionali e regionali.

TRAIN è regolamentato dall'Art. 1 della legge n. 138 del 26.06.2006 "Reti di solidarietà nazionale e iniziative di cooperazione internazionale" del Ministero della Salute. Il progetto si rivolge a ricercatori post-doc ovvero ricercatori con almeno 4 anni di esperienza di ricerca che desiderino migliorare la propria formazione trascorrendo un anno all'estero.

Parte del progetto si rivolge a ricercatori italiani di esperienza che abbiano svolto almeno tre anni di ricerca nell'UE o in un Paese Terzo e siano interessati a rientrare in Italia. TRAIN2 è anche aperto a ricercatori di nazionalità non italiana e non residenti che desiderino trascorrere un anno in Italia. Ogni richiesta di partecipazione verrà valutata da un gruppo internazionale di esperti indipendenti i cui requisiti soddisfano criteri di selezioni quali parole chiave legate all'argomento, il sesso e la diversa nazionalità. Il primo bando partirà nell'estate 2010 e sarà seguito da altri due bandi successivi nell'autunno 2010 e primavera 2011 per un totale di 51 anni/uomo di mobilità. Il progetto triennale europeo di formazione attraverso la mobilità TRAIN2 ha superato il processo di valutazione e si avvia alla fase conclusiva di negoziazione.

Partecipazione all'infrastruttura europea di ricerca per le risorse di biobanking e biomolecolari (BBMRI)

Nonostante in tutta Europa vi siano numerose biobanche di ricerca, il sistema di raccolta e conservazione dei campioni biologici varia notevolmente da Paese a Paese. Nel 2008 è stato avviato il processo per la creazione dell'Infrastruttura di ricerca per le risorse di biobanking e biomolecolari (*Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure*, BBMRI) avente un bilancio iniziale di € 5 milioni per migliorare il coordinamento tra le biobanche in Europa. La BBMRI è una delle iniziative raccomandate dal Forum Strategico Europeo per le Infrastrutture di Ricerca (*European Strategy Forum on Research Infrastructures*, ESFRI), lanciato nell'ambito del VI Programma Quadro (PQ) ed arrivato al finanziamento della fase preparatoria nel VII PQ. L'infrastruttura europea proposta rappresenta la rete delle biobanche e risorse biomolecolari esistenti e da realizzare. La durata della fase preparatoria inizialmente pensata per due anni è stata prolungata, mediante una fase prototipale, al dicembre 2010.

ACC partecipa alla fase preparatoria e di sviluppo del progetto europeo di biobanking compreso nelle priorità del piano nazionale di internazionalizzazione definito nell'ambito del Programma 4, articolo 3 del DM del 21 luglio 2006. La creazione di una infrastruttura europea coordinata ha l'obiettivo di promuovere studi di prevenzione e sperimentazione per le malattie rare e di quelle più comuni. La rete dovrebbe far fronte alla frammentazione e all'uso ridotto delle attuali banche, con particolare riferimento alla raccolta di campioni ematici, tissutali congelati, cellulari e di DNA, e dei centri di risorse molecolari. L'impiego delle Biobanche per scopi di ricerca e cura potrebbe aumentare qualora queste fossero associate ai dati conservati in altre banche europee. L'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico) ha già fornito ai governi nazionali linee guida per favorire il processo di accreditamento delle banche esistenti e da realizzare.

Nel maggio 2009, il Consiglio Europeo ha adottato un regolamento che considera le infrastrutture europee di ricerca alla stregua di un'organizzazione internazionale per quanto attiene ai fini fiscali (EurActiv 03/06/09). I così detti Consorzi Europei (*European Research Infrastructure Consortium*, ERIC) che si costituiranno quali soggetti sostenitori delle Infrastrutture di Ricerca beneficeranno quindi di un'esenzione IVA. La promozione dell'iniziativa di biobanking, utilizzando lo status giuridico europeo ERIC, comporterà l'associazione tra un gruppo ristretto di entità di Paesi Membri, a cui seguirà successivamente la partecipazione di altri. ACC si impegna a sostenere la partecipazione italiana all'ERIC di BBMRI per promuovere la rete italiana di biobanche oncologiche RIBBO quale modello di prototipo BBMRI Europeo (<http://www.iss.it/ribo/>).

L'Infrastruttura BBMRI fornirà servizi di gestione, di razionalizzazione delle risorse, e delle tecnologie, e fungerà da necessaria infrastruttura per la promozione della interazione tra strutture pubbliche/private/no profit, con il valore sociale della collaborazione. Costituirà la base per la globalizzazione dei campioni biologici raccolti al fine della ricerca scientifica. La *construction phase* (2011-2013) di BBMRI avrà l'obiettivo di raggruppare e coordinare le Biobanche esistenti negli stati membri. Il prosieguo della partecipazione delle biobanche italiane alla *construction phase* di BBMRI dipende dall'impegno del governo a sottoscrivere l'ERIC e dalla identificazione del coordinamento nazionale. Allo stato attuale l'attività di coordinamento è stata svolta dall'Istituto Superiore di Sanità, in collaborazione con il Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita (CNBBSV). Il CNBBSV, ha finanziato la realizzazione presso l'Istituto Superiore di Sanità di un server dedicato e del relativo software per la gestione delle costituenti reti nazionali di biobanche per ricerca scientifica. Il server ed il

software specifico sono attualmente già utilizzati per la costituzione del database della rete delle biobanche oncologiche italiane.

Durante il 2009 e tutto 2010 BBMRI ha avviato una fase prototipale alla quale l'Italia sta attivamente partecipando attraverso un'azione coordinata dell'ISS. Questa azione le ha permesso di partecipare al bando INFRA-2010-1.1.12. Solo i risultati tangibili della fase prototipale ed il coinvolgimento del nostro Paese in BBMRI, permetterà all'Italia di accedere agli eventuali fondi che deriveranno dal successo di tale richiesta. Per consentire alla comunità italiana delle biobanche di partecipare è indispensabile ed urgente una scelta di governo in questo senso.

Partecipazione all'ERA-Net CoCanGPC e ruolo del progetto START

L'Istituto Superiore di Sanità e Alleanza contro il Cancro partecipano al progetto *Coordination of Cancer Clinical Practice Guideline in Europe* (CoCanCPG) finanziato dall'Unione Europea (ERA-Net, febbraio 2006-gennaio 2010). CocanCPG è un consorzio di 16 istituzioni (Ministeri della salute e/o istituzioni chiave nell'area della salute a livello nazionale o regionale) di 11 Paesi europei ed extraeuropei. Il consorzio, coordinato dall'*Institut National du Cancer* (Francia), ha come fine ultimo quello di progettare una cooperazione trans-nazionale di produzione, diffusione e implementazione di linee guida di argomento oncologico.

La partecipazione italiana a questo ERA-Net consegue alle attività sviluppate nel corso del 2008 che hanno consentito l'ingresso del Paese nel consorzio europeo con la finalità di promuovere il progetto START (*State of the ART in Oncology*) nella sua dimensione europea. Nell'ambito del gruppo di lavoro dell'OECI preposto alle linee guida (Guidelines WG), START è stato accolto quale strumento che fornisce opzioni di diagnosi e terapia che possono essere utilizzate dai singoli istituti per la loro pratica quotidiana e per lo sviluppo di linee guida locali. START opera secondo una metodologia coerente, in cui ogni capitolo è il risultato di un processo interno di collaborazione ben definito: una prima bozza viene proposta da uno dei redattori START, sulla base di contributi selezionati provenienti da autori da varie aree disciplinari. Successivamente, uno o più esperti europei nel settore si occupano della revisione del capitolo che viene poi pubblicato sul sito web di START (<http://www.startoncology.net>) e nella rivista *Critical Reviews in Oncology and Haematology*. Oltre il 25% dei collaboratori al progetto START è rappresentato da soci ACC ed il 30% da professionisti operanti nei centri che fanno riferimento ad OECI. Nel 2010 si prevede la pubblicazione di un'edizione cartacea che raccolga tutti i capitoli di START.

L'Istituto Superiore di Sanità rappresenta un partner naturale, quale ente riconosciuto dal Ministero della Salute e responsabile dell'attuazione e del mantenimento delle linee guida nazionali.

ISS-ACC nel periodo 2008-2009 ha partecipato alle seguenti attività incluse nei vari *workpackage* del progetto:

- definizione di strumenti e moduli nell'elaborazione e nell'adattamento di linee guida.
- identificazione di fasi chiave del processo di produzione di linee guida condivisibili a livello transnazionale.
- progettazione della futura cooperazione CoCanCPG.

In particolare ISS-ACC è stato responsabile del *task* sulla pianificazione della forma di cooperazione del network CoCanCPG oltre il termine dei finanziamenti della Comunità Europea.

In questo ambito ISS-ACC ha svolto un'indagine conoscitiva delle aspettative dei partner circa gli obiettivi, le attività, la struttura organizzativa della futura collaborazione CoCanCPG.

Sulla base dei risultati dell'indagine sono stati elaborati gli scenari di cooperazione presentati nel *Rome strategic workshop*, svoltosi a Roma presso l'ISS il 18-19 giugno 2009.

EUROCARE-5: ottimizzazione dell'uso dei registri tumori per finalità di ricerca

EUROCARE è un progetto di ricerca onco-epidemiologica sulla sopravvivenza e la cura dei pazienti europei malati di tumore. Il progetto si basa su una collaborazione stabilita nel 1989 tra l'Istituto Nazionale Tumori di Milano, l'Istituto Superiore di Sanità e un gran numero di registri di popolazione presenti in tutta Europa.

L'attività, inizialmente supportata dall'Unione Europea, è attualmente finanziata da Alleanza Contro il Cancro e dalla Fondazione Compagnia di San Paolo.

Grazie ad un continuo aumento di contributi da parte dei partecipanti al progetto, EUROCARE ha realizzato con regolarità la pubblicazione di indici di sopravvivenza in tutta Europa.

EUROCARE ha raccolto e analizzato dati di sopravvivenza su pazienti la cui diagnosi si riferiva al periodo 1978-1984 (EUROCARE-1), periodo 1985-1989 (EUROCARE-2), periodo 1990-1994 (EUROCARE-3), e periodo 1988-2002 (EUROCARE-4), mentre la sopravvivenza valutata in anni più recenti sarà resa possibile grazie alla quinta fase di EUROCARE. Il database dello studio, che attualmente include dati su più di 13 milioni di casi di cancro forniti dai 93 registri presenti in 23 Paesi europei, è l'unica e preziosa risorsa per analizzare e comparare indici tra regioni e Paesi partecipanti. A lungo termine sarà anche possibile avere indicazioni precise per i tumori rari.

Le informazioni che conseguono a studi di sopravvivenza di pazienti oncologici sono indispensabili per un controllo effettivo del cancro, e i paragoni di sopravvivenza possono fornire informazioni sulla reale efficacia dei metodi di cura. La missione di EUROCARE è sostenuta da Alleanza Contro il Cancro per fornire alla società ed agli enti di controllo preposti, dati necessari alla sorveglianza della malattia oncologica ed alla programmazione sanitaria, oltre a fornire indicazioni e individuare possibili soluzioni laddove si individuino discrepanze di sopravvivenza non attese. I risultati di EUROCARE hanno avuto un impatto diretto sulla programmazione oncologica nel Regno Unito e in Danimarca, come conseguenza di loro tassi di sopravvivenza più bassi, e in Italia, con lo scopo di ridurre le diversità di trattamento tra Nord e Sud del Paese.

Al fine di consentire il lancio di EUROCARE-5, si è svolta a Genova dal 10 al 12 marzo 2009 il primo meeting plenario dei registri tumori che aderiscono allo studio.

Durante il convegno sono stati concordati i seguenti punti:

- data del *kick-starting meeting* del progetto;
- accordo sul protocollo per la raccolta dei dati e loro analisi per la quinta fase del progetto;
- accordo sul protocollo di studio di EUROCARE-5 per gli studi ad alta risoluzione;
- collegamento con altri progetti europei in corso ed in particolare con l'ERA-Net EUROCOURSE per il coordinamento dei registri tumori;

Nel corso dell'incontro sono stati anche presentate e discusse le esperienze sui metodi di analisi della sopravvivenza da parte dei registri del cancro europei.

Partecipazione al progetto di accreditamento degli istituti europei del cancro

Un progetto europeo finanziato dall'OECD e dalla Fondazione Wallenberg si propone di definire standard di qualità consensuali per l'oncologia europea e di sviluppare uno strumento per consentire ad esperti del settore di mettere in atto valutazioni interne ed esterne (accreditamento dei Centri Oncologici nell'UE) delle prestazioni dei Comprehensive Cancer Centres.

Avviato nel 2002 e dopo due round di studi sviluppati con istituti pilota per mettere a punto lo strumento informatico per l'autovalutazione, il Programma di Accredimento OECD è mirato all'identificazione di quei mezzi dove sia fattibile uno sviluppo accelerato di trattamenti innovativi o di ricerca clinica di alta qualità.

Un gruppo di lavoro italiano sull'accREDITamento, composto da esperti di qualità degli IRCCS oncologici si è costituito a seguito di numerosi incontri che si sono svolti nel corso del 2009 ed in particolare il 10 e 11 febbraio a Roma presso l'Istituto Superiore di Sanità, il 2 luglio a Bari presso l'Istituto Tumori ed il 12 Novembre a Milano presso l'Istituto Europeo di Oncologia.

Il convegno dal titolo: "AccREDITamento e modelli di eccellenza per gli istituti oncologici, Verso un Position Paper Italiano", ha consentito di definire un piano di intervento nazionale che potrebbe consentire di pervenire in futuro ad un modello di accREDITamento specifico per l'oncologia applicato da tutti gli IRCCS italiani anche quale strumento per consentire al Ministero della Salute una valutazione dell'eccellenza degli istituti basandosi su parametri simili accettati da tutti.

Il contributo italiano al progetto di Accredimento europeo è fondamentale per raggiungere i seguenti obiettivi:

- avviare il processo di valutazione necessario per l'accREDITamento degli Istituti e/o per il riconoscimento delle loro condizioni di "eccellenza" in relazione alle altre entità che operano a livello nazionale;
- eseguire test su strumenti dimostrativi;
- formare revisori esperti in controllo di qualità;
- partecipare in maniera organizzata a tutte le fasi di sviluppo del progetto europeo.

Partecipazione di ACC alla Terza Conferenza Mondiale per il Controllo del Cancro

A Cernobbio dal 8 all'11 novembre 2009 si è svolto il terzo congresso mondiale sul controllo del cancro sponsorizzato da Alleanza Contro il Cancro ed organizzato dalla Fondazione Istituto Nazionale Tumori. Il congresso è stato un successo oltre ogni migliore aspettativa, sia per la partecipazione, che per i contributi scientifici, che per gli aspetti organizzativi. Il congresso ha avuto oltre 450 iscritti e vi hanno partecipato delegazioni da 84 Paesi. I risultati in termini scientifici e di prospettive collaborative appaiono molto importanti: in fase preparatoria è stata approntata una Monografia edita dalla rivista Tumori che rappresenta un materiale unico per descrivere l'impegno internazionale sul controllo del cancro. Anche se l'obiettivo del congresso era lo sviluppo delle collaborazioni internazionali nel cancer control, è ancora presto per delineare un quadro delle iniziative avviate, ma emergono due azioni di importanza strategica. Il congresso ha infatti promosso: a) la Cernobbio Declaration, un atto che chiede ai leader delle

Unioni Europea e Africana di definire un protocollo d'intesa sul cancro nell'ambito dei processi di cooperazione; e b) un movimento internazionale della diaspora africana che include scienziati e volontari di origine africana ora uniti per aiutare il loro continente di origine nella lotta contro il cancro.

Nel corso dell'incontro sono state inoltre avviate da parte del Focal Point di ACC e dal Ministero della Salute, concrete proposte di collaborazione con l'OMS per l'attivazione di interventi concordati per il controllo del cancro nell'area euromediterranea. Il programma di sviluppo di future iniziative vedrà anche il supporto dell'OECI che ha garantito il supporto dell'associazione europea che si propone anche di interagire con l'omologa istituzione degli USA.

ACC ha partecipato alla conferenza allestendo uno stand assieme all'OECI dove è stato distribuito anche materiale divulgativo delle due associazioni.

Progetto CONCORD

Lo studio CONCORD fornisce valutazioni di sopravvivenza per 1,9 milioni di adulti (età compresa tra i 15 e i 99 anni) che hanno avuto una prima diagnosi di tumore invasivo della mammella, al colon-retto e prostata durante gli anni 1990-1994. I pazienti sono stati seguiti fino al 1999 tramite l'utilizzo di dati raccolti da 101 registri tumori di 31 Paesi in cinque continenti.

CONCORD è la prima analisi mondiale di sopravvivenza che utilizza procedure standard di controllo di qualità e metodi analitici simili per tutte le serie di dati. Il progetto CONCORD ha potuto definire una ampia variazione globale nella sopravvivenza al cancro in Nord America, Australia, Giappone e nord, ovest, sud Europa si osservano dati di sopravvivenza superiori ai 5 anni per cancro al seno, colon-retto, e prostata mentre si osservano valori più bassi per Algeria, Brasile Europa dell'est. Fino ad oggi, il paragone diretto di sopravvivenza al cancro tra Paesi con reddito elevato e basso reddito non era ancora disponibile e le informazioni derivanti da CONCORD potrebbero rappresentare un'utile risorsa per interventi di programmazione sanitaria in oncologia.

Le conclusioni dovrebbero facilitare la valutazione comune di *trend* internazionali di incidenza, sopravvivenza, e mortalità come indicatori del controllo del cancro. ACC, finanzia uno studio di fattibilità per il lancio di una nuova fase del progetto insieme ai *Centers for Disease Control and Prevention* (Atlanta, GA, USA), al *Department of Health* (London, Regno Unito) e il *Cancer Research UK* (London, Regno Unito), per studiare più efficacemente le differenze di sopravvivenza osservate.

Progetto europeo EUROCANCERCOM

La mancanza di comunicazione efficiente tra i professionisti operanti in oncologia, i pazienti e la componente politica, costituisce uno degli elementi della frammentazione osservata a livello europeo (vedi rapporto EUROCAN+PLUS al Parlamento Europeo 2008). Troppi dati, non sempre verificati ed attendibili, sono riversati sulla rete e sui media e questo sovraccarico di informazione è spesso un complice involontario del ritardo del processo di trasferimento dei risultati alla pratica clinica e fornisce false aspettative ai pazienti ed ai loro famigliari. L'esplosione ed il sovraccarico di dati inducono a stimare che la situazione non dovrebbe certo migliorare nel tempo se non interverranno filtri di valutazione, raccolta e rilascio di dati certificati.

L'UE ha bisogno di rendere disponibile un modello integrato per un portale di informazione e scambio in oncologia che soddisfi i bisogni di professionisti della salute, pazienti e *policy maker*. Tale modello potrebbe in seguito essere applicato ad altre aree del settore biomedico.

Il consorzio che si è costituito per il progetto EUROCANCERCOM, coordinato dall'Istituto Europeo di Oncologia ed al quale partecipa OECI, realizzerà un inventario di tutti gli strumenti di informazione esistenti, valuterà difetti e/o debolezze ed individuerà le esigenze di sviluppo futuro. Questo includerà la raccolta delle attuali regolamentazioni per l'immissione di dati in rete, aspetti di accesso ai dati, flussi delle informazioni, problemi che si riscontrano nella distribuzione di informazioni in rapporto alle case farmaceutiche ed ostacoli per l'accesso dei pazienti a dati attendibili. Tutte le attività che verranno sviluppate saranno valutate da un Comitato Scientifico che dovrà fornire concrete indicazioni ai partner per lo sviluppo dello studio. Tutte le attività saranno soggette all'approvazione di un controllo da parte di un Comitato Etico Indipendente. Il progetto proposto avrà due coordinatori, un rappresentante dei professionisti e l'altro incaricato di provvedere a soluzioni per implementare il sistema. Il prototipo informatico di EUROCANCERCOM sarà il portale Ecancer.eu. Tramite il website potrà essere visualizzato il risultato finale consegnabile *at one-stop shop*.

ACC parteciperà nel progetto avendo ricevuto da OECI la delega a partecipare in sua vece e sosterrà, coordinandolo, il WP relativo alla comunicazione con i pazienti tramite il coinvolgimento dell'associazione FAVO ed il progetto CIGNO Web.

Progetto integrato NANOCANCER

Negli ultimi anni abbiamo assistito ad uno sviluppo senza precedenti nel campo delle scienze biomediche. Un'enorme mole di dati scientifici è stata messa a disposizione dei clinici da esperimenti di genomica e proteomica. L'esplosione del fenomeno "nanotecnologie" non poteva capitare in un momento migliore. Le nanoscienze, infatti, sono capaci di offrire nuove opportunità per lo sfruttamento delle conoscenze biomediche.

Il termine "nanotecnologia" indica genericamente la manipolazione della materia a livello atomico e molecolare, in sostanza la capacità di agire e lavorare sulla materia sulla scala di milionesimi di millimetro. Poter maneggiare le proprietà chimico-fisiche della materia a questi livelli dimensionali consente ai ricercatori la possibilità di costruire nuovi strumenti per il trasporto intelligente di farmaci, nuovi vettori per agenti di contrasto e nuovi sistemi per la diagnostica con sostanziali risparmi di tempo e di denaro e auspicabile migliore efficacia degli interventi. Esiste un diffuso ottimismo su questa nuova disciplina, la nanomedicina (o nanobiotecnologie), nonostante i ricercatori debbano ancora fronteggiare numerosi problemi e difficili sfide. Alcuni sistemi per il trasporto di agenti di contrasto e di farmaci, specialmente in oncologia, sono già stati sperimentati con successo ma esistono ancora problemi di carattere tossicologico ed etico. La scienza delle nanobiotecnologie costituisce chiaramente un approccio multidisciplinare al problema della malattia, integrando al suo interno esperti in medicina, biologia, chimica, fisica ed ingegneria dei materiali. ACC, congiuntamente con OECI, ha da tempo avviato un dibattito sulle applicazioni delle nanobiotecnologie in oncologia che si è recentemente concretizzato con la presentazione di una domanda di finanziamento "Large Scale" alla Commissione Europea all'interno del VII PQ. Il Consorzio "Nanocancer" è coordinato dal *Nanomanufacturing Institute* dell'Università di Leeds (Regno Unito) affiancato da ACC quale co-coordinatore. Nanocancer si occuperà di ricerca su applicazioni delle nanotecnologie per la detezione, diagnosi e cura dei tumori gastro-intestinali ed urinari. Il progetto prevede 7 piattaforme tecnologiche e 13 *Work package*. ACC è rappresentata in tutti questi gruppi, coordinando il WP1 (*Integrated bio-oncological data provision*) e WP11

(*Dissemination, education and training*). Nanocancer ha un'importante componente industriale incorporando nel Consorzio industrie tra le maggiori a livello planetario, quali General Electric, Roche e Karl Storz nonché piccole e medie industrie leader nel settore delle nanotecnologie (Scriba, INsightTech, Nanovector e Nanexa). Infine Nanocancer raggruppa al suo interno i maggiori Istituti Oncologici Europei e alcune tra le migliori Università Continentali nel settore Nanotecnologico. Il consorzio di eccellenza NANOCANCER ha presentato una proposta che è attualmente nella prima fase di valutazione (*Stage 1*) ed è in attesa dell'esito per poter procedere con la formulazione della proposta definitiva.

ERA-Net on Translational Cancer Research (TRANSCAN)

In quest'ultimo anno, l'Italia, grazie ad un'iniziativa congiunta sviluppata nell'ambito del programma 4 del Progetto "ISS per ACC", ha assunto un ruolo di coordinamento per la preparazione di una proposta di ERA-Net per la Ricerca Traslazionale sul Cancro, coinvolgendo 19 Paesi e 25 istituzioni partecipanti. La proposta trova le sue basi di partenza nei risultati del progetto EUROCAN+PLUS, lo studio di fattibilità finanziato dalla Commissione Europea dal 2005 al 2007 e coordinato dalla IARC (International Agency for Research on Cancer) al fine di identificare le esigenze e le iniziative da intraprendere per un efficiente coordinamento della ricerca oncologica in Europa. Una delle principali raccomandazioni emerse dal progetto EUROCAN+PLUS riguarda la costruzione di una piattaforma per la ricerca traslazionale sul cancro in grado di realizzare il coordinamento tra ricerca di base, clinica ed epidemiologica, la cooperazione tra *comprehensive cancer centres* e laboratori di ricerca, e l'interazione in rete di enti di finanziamento. In tale contesto, il *Working Group* dell'EUROCAN+PLUS composto dalle *funding organizations* aveva raggiunto un consenso sulla necessità di lanciare un ERA-Net per la ricerca traslazionale sul cancro e aveva contattato la Commissione Europea al fine di sostenere l'inserimento di tale ERA-Net nell'ambito del VII PQ. Nell'ambito del programma 4 del Progetto "ISS per ACC" sono stati organizzati 3 incontri preparatori con i rappresentanti dei Paesi partecipanti (1° ottobre 2008, ISS, Roma; 16 marzo 2009, Bruxelles; 9 ottobre 2009, Bruxelles). È in corso di finalizzazione una proposta che sarà inviata dall'ISS a nome del Ministero della Salute alla Commissione Europea entro la scadenza del 19 gennaio 2010.

Obiettivo principale dell'ERA-Net è quello di accelerare la traduzione delle conoscenze in applicazioni per il beneficio dei pazienti. Tale processo comprende due tipi/fasi di ricerca traslazionale: 1) traduzione dei risultati dalla ricerca di laboratorio alla ricerca clinica e utilizzo dei risultati della ricerca clinica per la formulazione di nuove domande e ipotesi da verificare mediante la ricerca di laboratorio, e 2) traduzione dell'evidenza nella pratica clinica, cioè nell'implementazione di sistemi di prevenzione, diagnosi e cura. L'approccio per sostenere tali tipi/fasi di traduzione è di facilitare progetti di ricerca transnazionali attraverso *calls for proposals* comuni, e potenziare i legami tra i programmi di finanziamento nazionali/regionali per la ricerca traslazionale sul cancro al fine di superare la frammentazione dell'area europea della ricerca. L'ISS e ACC agiranno come Programme Managers a nome del Ministero della Salute e svolgeranno attività di coordinamento e di *management* del progetto, oltre ad altre specifiche attività in diversi WPs del progetto. L'ISS e ACC contribuiranno, per conto del Ministero della Salute, al processo di identificazione dei temi dei bandi e potranno beneficiare di un supporto finanziario per la ricerca traslazionale nell'ambito dei progetti che saranno finanziati.

Programma ECRIN e Infrastructure for Clinical Trials and Biotherapy

In quest'ultimo anno, grazie ad un'iniziativa congiunta sviluppata nell'ambito del programma 4 del Progetto "ISS per ACC", è stato possibile garantire la presenza italiana nel progetto ECRIN (*European Clinical Research Infrastructures Network*), informando i membri di ACC sul significato, le prospettive e ricadute di tale partecipazione. ECRIN dovrà rappresentare la infrastruttura pan-europea per gli studi clinici avanzati (dalla fase II in poi), come raccomandato nella *roadmap* dell'ESFRI, in grado di fornire servizi di elevata qualità per la ricerca clinica multinazionale. Grazie alla sua struttura, che collega network nazionali di centri di ricerca clinica e di unità di studi clinici, ECRIN può fornire servizi integrati del tipo *one-stop shop* a ricercatori e sponsor in studi clinici multinazionali.

Uno degli obiettivi principali della fase preparatoria è l'identificazione delle istituzioni governative che nei singoli Stati Membri attualmente partecipanti in ECRIN-PPI assumeranno l'impegno di sostenere finanziariamente la successiva fase di costruzione dell'infrastruttura e, quindi, della sua operatività. Appare quindi urgente e importante identificare: a) il network che, analogamente a quanto già avviene per gli altri Paesi partecipanti a ECRIN-PPI, si proponga come nodo nazionale dell'infrastruttura europea; b) il ministero o ente governativo che parteciperà per l'Italia alla fase di costruzione di tale infrastruttura. Riguardo al punto a) si ricorda che l'Italia è rappresentata da tre partner: il Consorzio Italiano per la Ricerca in Medicina (CIRM), l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri (IRFMN), e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS). In particolare, l'ISS è responsabile del WP4 (*GMP facilities for biotherapy*).

Con lettera del MiUR si identificava l'ISS come coordinatore della partecipazione italiana alla futura costruzione dell'infrastruttura ECRIN. Appare inoltre opportuno ricordare la raccomandazione di ECRIN ad individuare un partner che rappresenti il nodo nazionale di ciascun Paese. Va altresì considerato che attori importanti della ricerca clinica italiana, quali IRCCS così come Dipartimenti e Policlinici universitari, non compresi nel CIRM, non sono rappresentati nell'infrastruttura. Riguardo al punto b), da contatti avviati con il Ministero della Salute e con l'AIFA è emerso l'interesse di entrambi ad una partecipazione.

Infrastruttura EATRIS

In quest'ultimo anno si è registrato un grande impegno da parte di diversi colleghi dell'ISS, in collaborazione con alcuni colleghi di ACC e rappresentanti di altre istituzioni per sviluppare la partecipazione italiana al progetto EATRIS (*European Advanced Translational Research Infrastructure*). EATRIS intende fornire, mediante una rete di nodi nazionali di centri di eccellenza interagenti tra di loro e distribuiti in 10 Paesi europei, servizi di alta qualità per favorire il passaggio dei risultati della ricerca di base all'attuazione di studi clinici (fino alla fase IIa) (si veda il sito EATRIS <http://www.eatris.eu/>). La fase di apertura dell'infrastruttura agli utenti è prevista per l'inizio del 2010.

ISS/ACC ha partecipato attivamente alla fase progettuale; ciò ha permesso l'ingresso a pieno titolo tra i partner della fase preparatoria dell'Infrastruttura. In particolare, l'ISS è responsabile del WP8 (*Regulatory issues in translational research*). Scopo dell'attività del WP8 è la definizione di un insieme di regole e raccomandazioni condivise dai vari centri EATRIS che implementino gli aspetti etici e regolatori importanti per la ricerca traslazionale in medicina. Il lavoro svolto finora ha permesso una prima identificazione delle differenze principali

nell'implementazione delle direttive europee in materia regolatoria, esistenti tra i vari Stati che partecipano al progetto EATRIS. I risultati di questa attività sono stati condensati nella produzione di alcuni documenti, tra i quali: i) un manuale contenente le informazioni di rilievo per lo sviluppo di un IMP (*Investigational Medicinal Product*) dal laboratorio alla prima somministrazione a volontari/pazienti in Trial Clinici di Fase I (*First-In-Man Manual*); ii) un documento concernente la sperimentazione animale nei vari Paesi partecipanti ad EATRIS e raccomandazioni generali per lo sviluppo di un'infrastruttura congiunta; iii) un documento sugli aspetti etici della ricerca traslazionale. ACC ha partecipato al WP7 riguardante gli aspetti di standardizzazione, e al WP5, riguardante la caratterizzazione specifica delle infrastrutture per i vari prototipi di prodotti, e al WP2, riguardante gli aspetti legali dell'infrastruttura EATRIS. Nell'agosto 2009 è stata formalizzata la partecipazione del Ministero della Salute allo Steering Committee del progetto EATRIS.

È stato di recente formalizzato un accordo attraverso il quale l'ISS, individuato nel progetto EATRIS della fase preparatoria come partner di riferimento per l'Italia, potrà formalmente rappresentare anche le altre istituzioni presenti sul territorio nazionale in grado di contribuire alle reti di servizi in base alle specifiche competenze. Tale accordo ha identificato il primo nucleo del nodo nazionale per EATRIS (IATRIS, *Italian Advanced Translational Research Infrastructure*), rappresentato dall'ISS, da ACC, dal Network Italiano per l'Imaging Molecolare (IMINET), dall'Istituto Mario Negri e dal dipartimento di Medicina Sperimentale del CNR. Con l'avvio imminente della fase di implementazione di EATRIS, l'ISS ha coordinato la compilazione di un documento che descrive, in termini di strutture e competenze, le realtà nazionali impegnate nella ricerca traslazionale in medicina. Nello stesso ambito l'ISS sta svolgendo il ruolo di coordinatore delle costituenda Rete Italiana per i Prodotti Medicinali per Terapie Avanzate (PMTA), che rappresentano uno dei prodotti-prototipi oggetto del percorso traslazionale, e si occuperà dell'organizzazione del primo Workshop EATRIS sui PMTA a livello europeo. Attraverso un intenso lavoro di incontri e verifiche, l'ISS ha potuto candidare il Paese a presentarsi come riferimento europeo per servizi per la medicina traslazionale nel settore dello sviluppo di "piccole molecole", biomarcatori, traccianti per *imaging* molecolare e PMTA. Alcuni IRCCS di ACC rappresentano attori importanti nella rete italiana per EATRIS. L'Italia ha pertanto assunto un ruolo autorevole nel consorzio EATRIS sia per la capacità di garantire reti di servizi coordinati per diverse tipologie di prodotti sia per il ruolo di riferimento a livello europeo dell'ISS sui problemi regolatori ed etici per la medicina traslazionale, i quali rappresentano "colli di bottiglia" particolarmente rilevanti per il passaggio alla sperimentazione clinica, sia a livello nazionale che europeo. Fondamentale nello scenario dell'immediato futuro sarà la possibilità di un finanziamento dedicato alla complessa attività di *coordination and support* nazionale al progetto EATRIS che potrebbe rendere la rete IATRIS particolarmente competitiva nel contesto europeo, in collegamento con un processo di coordinamento e partecipazione anche alle altre infrastrutture di ricerca collegate (in particolare ECRIN e BBMRI). La proposta dell'ISS di realizzare un Centro Nazionale per la Ricerca Traslazionale in Biomedicina (Bio-CIRT) potrebbe sia portare al completamento, in una visione strategica di rete, delle strutture esistenti nelle aree mancanti e di maggiore impatto (ad esempio l'allestimento di laboratori GLP per i PMTA) sia promuovere le interazioni tra i partner italiani, rendendo il Paese sempre più coeso e competitivo.

CONSUNTIVO DELLE ATTIVITÀ CONGRESSUALI, LETTURE PLENARIE, ATTIVITÀ PROPEDEUTICA ALLA REALIZZAZIONE DI INCONTRI SCIENTIFICI, PUBBLICAZIONI

Claudio Lombardo (a, b), Filippo Belardelli (c)

(a) *Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova*

(b) *Alleanza Contro il Cancro, Roma*

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

Organizzazione di convegni e conferenze anno 2009

Sono di seguito elencate le numerose iniziative convegnistiche organizzate nel contesto del Programma 4.

- 25 giugno 2007 – Roma, Istituto Superiore di Sanità
“La costruzione dell’area europea della ricerca in biomedicina e il contributo degli enti di ricerca del servizio sanitario nazionale”
- 21 aprile 2008 – Roma, Istituto Superiore di Sanità
Convegno di presentazione delle attività iniziate dei programmi 1, 2, 3, 4 ISS per ACC.
“Rete nazionale solidale e collaborazioni internazionali”
- 20-24 maggio 2008 – Genova, Palazzo Ducale
“The OEI 2008 Scientific Week”
- 11 giugno 2008 – Roma, Istituto Superiore di Sanità
1° incontro dei partecipanti italiani al progetto EATRIS
- 10 settembre 2008 – Roma, Istituto Superiore di Sanità
2° incontro dei partecipanti italiani al progetto EATRIS
- 8 ottobre 2007– Roma, Istituto Superiore di Sanità
“Rete Nazionale solidale e collaborazioni internazionali del Programma Straordinario Oncologia 2006 (ISS per ACC)”
- 1-3 ottobre 2008 – Roma, Istituto Superiore di Sanità
“Needs and challenges in translational medicine: Filling the gap between basic research and clinical applications”
- 1 ottobre 2008 – Roma, Istituto Superiore di Sanità
Simposio satellite “Toward an ERA-Net on Translational Cancer Research”
- 27 ottobre 2008 – Londra, Italian Cultural Institute
Conferenza “e-Oncology: a bi-lateral Italy-UK Workshop”
- 28 novembre 2008 – Milano, Fondazione Istituto Tumori
Conferenza “Nanotechnologies in oncology”
- 27 gennaio 2009 – Roma, Istituto Superiore di Sanità
“OEI educational activities: perspectives in the accreditation of European CCCs”

- 9-10 febbraio 2009– Roma, Istituto Superiore di Sanità
“Sviluppo della rete oncologica nazionale per il progresso della ricerca sanitaria-Consuntivo Attività Scientifica 2007 ISS per ACC”
- 10-11 febbraio 2009 – Roma, Istituto Superiore di Sanità
“Meeting of the OECI Accreditation project”
- 10-12 marzo 2009 – Genova
Conferenza degli 83 rappresentanti dei registri tumori europei per la messa a punto del nuovo progetto EURO CARE-5 finanziato dalla Compagnia di San Paolo
- 16 marzo 2009 – Bruxelles, Jolly Hotel Sablon
“II meeting of the funding agencies involved in the setting-up of the ERA-Net for translational research”
- 17 marzo 2009 – Bruxelles, Centro Congressi MPS
Conferenza “Research and exploitation: toward cancer patients expectations”
- 9 ottobre 2009 – Bruxelles, Brussels Airport Meeting Centre
“A European Research Area Network to reduce fragmentation in translational cancer research” - 3rd Meeting of National Funding Organisations Representatives interested in the setting-up of a European Research Area Network to reduce fragmentation in translational cancer research
- 7-11 novembre 2009 – Cernobbio
“3rd International Cancer Control Congress”

Pubblicazioni conseguite nell’ambito del progetto

Il Programma 4 ha prodotto le seguenti pubblicazioni:

1. Belardelli F. The Italian initiative for biomedical translational research. In: Moretti F, Romero M, Belardelli F (Ed.). *International Meeting. Needs and Challenges in Translational Medicine: filling the gap between basic research and clinical applications. Istituto Superiore di Sanità. Rome, Italy, October 1-3, 2008. Abstract Book.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (ISTISAN Congressi 08/C7). p. 73.
2. Belardelli F, D’Alessandro F, Ferrantini M, Lombardo C, Moretti F (Ed.). *Costruzione dell’area europea della ricerca in biomedicina e contributo degli enti di ricerca del Servizio Sanitario Nazionale.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/27).
3. Belardelli F. Contributo dell’Istituto Superiore di Sanità nella costruzione dell’area europea della ricerca biomedica: esperienze, iniziative e prospettive. In: Belardelli F, D’Alessandro F, Ferrantini M, Lombardo C, Moretti F (Ed.). *Costruzione dell’area europea della ricerca in biomedicina e contributo degli enti di ricerca del Servizio Sanitario Nazionale.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/27). p. 26-32.
4. Berrino F, Verdecchia A, Lutz JM, Lombardo C, Micheli A, Capocaccia R, the EURO CARE Working Group. Comparative cancer survival information in Europe. *European Journal of Cancer* 2009;45: 901-8.
5. Boyle P, Anderson BO, Andersson LC, Ariyaratne Y, Auleley GR, Barbacid M, Bartelink H, Baselga J, Behbehani K, Belardelli F, Berns A, Bishop J, Brawley O, Burns H, Clanton M, Cox B, Currow D, Dangou JM, de Valeriola D, Dinshaw K, Eggermont A, Fitzpatrick J, Forstmane M, Garaci E, Gavin AT, Kakizoe T, Kasler M, Keita N, Kerr D, Khayat D, Khuhaprema

- T, Knezevic T, Kubinova R, Mallath M, Martin-Moreno J, McCance D, McVie JG, Merriman A, Ngoma T, Nowacki M, Orgelbrand J, Park JG, Pierotti M, Ashton LP, Puska P, Escobar CV, Rajan B, Rajkumar T, Ringborg U, Robertson C, Rodger A, Roovali L, Santini LA, Sarhan M, Seffrin J, Semiglazov V, Shrestha BM, Soo KC, Stamenic V, Tamblyn C, Thomas R, Tuncer M, Tursz T, Vaitkiene R, Vallejos C, Veronesi U, Wojtyla A, Yach D, Yoo KY, Zatonski W, Zaridze D, Zeng YX, Zhao P, Zheng T. Need for global action for cancer control. *Ann Oncol* 2008;19(9):1519-21.
6. Ferrantini M, Lombardo C, Moretti F, Belardelli F. Biotherapy of cancer. Break the barriers to foster translation of Knowledge. *Tumori* 2008;94(2):182-7.
 7. Ferrantini M, Moretti F, Belardelli F. Il ruolo dell'Istituto Superiore di Sanità nel coordinamento della ricerca sul cancro e nello sviluppo di infrastrutture. *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* 2007;20(11):15-8.
 8. Ferrantini M, Moretti F, Belardelli F. Infrastruttura europea EATRIS (European Advanced Translational Research Infrastructure in Medicine). In: Belardelli F, D'Alessandro F, Ferrantini M, Lombardo C, Moretti F (Ed.). *Costruzione dell'area europea della ricerca in biomedicina e contributo degli enti di ricerca del Servizio Sanitario Nazionale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/27). p. 55-8.
 9. Lombardo C, Belardelli F. Programma 4 del DM ISS per ACC: Relazione consuntiva 2008 e programmatica 2009 In: Belardelli F, Romero M, Moretti F. (Ed.). *Programma Straordinario Oncologia 2006. Art. 3 "Rete nazionale solidale e collaborazioni internazionali (ISS per ACC)". Consuntivo dell'attività scientifica (2007-2008)*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009. (Rapporti ISTISAN 09/1). p. 148-55.
 10. Lombardo C, Campione B, Albanese D, D'Alessandro F, Rondanina T. Il contributo italiano nella costruzione dello spazio europeo della ricerca: le aspettative per l'oncologia. In: *Collaborazione sanitaria internazionale e programmi europei*. Roma: Ministero della Salute; 2008. p. 95-102.
 11. Lombardo C, Cope J, De Andres Medina R, Ferrantini M, Guillemette B, Wetteraurer B. Coordinating Cancer Research in Europe: the role of Member States. In: Moretti F, Romero M, Belardelli F (Ed.). *International Meeting. Needs and Challenges in Translational Medicine: filling the gap between basic research and clinical applications. Istituto Superiore di Sanità. Rome, Italy, October 1-3, 2008. Abstract Book*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (ISTISAN Congressi 08/C7). p.71
 12. Lombardo C, d'Alessandro F, Moretti F, Rondanina T, Ferrantini M, Belardelli F. Programma 4 dell'art. 3 DM 21 luglio 2006: le basi razionali dell'intervento. In: Belardelli F, Romero M, Moretti F. (Ed.). *Programma Straordinario Oncologia 2006. Art. 3 "Rete nazionale solidale e collaborazioni internazionali (ISS per ACC)". Consuntivo dell'attività scientifica (2007-2008)*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009. (Rapporti ISTISAN 09/1). p. 143-7.
 13. Lombardo C, D'Alessandro F. Considerazioni conclusive. In: Belardelli F, D'Alessandro F, Ferrantini M, Lombardo C, Moretti F (Ed.). *Costruzione dell'area europea della ricerca in biomedicina e contributo degli enti di ricerca del Servizio Sanitario Nazionale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/27). p. 83-4.
 14. Lombardo C, D'Alessandro F. Costruzione e internazionalizzazione delle reti di ricerca nazionali in oncologia: il contributo italiano e la strategia per la competitività. In: Belardelli F, D'Alessandro F, Ferrantini M, Lombardo C, Moretti F (Ed.). *Costruzione dell'area europea della ricerca in biomedicina e contributo degli enti di ricerca del Servizio Sanitario Nazionale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/27). p. 17-22.
 15. Lombardo C, Rondanina T, D'Alessandro F, Albanese D. Training and mobility, a priority for the network of European Comprehensive Cancer Centers. How a national mobility initiative could enhance the EU cooperation in cancer research contributing to ERA development: the example of the Alleanza Contro il Cancro Italian CCCs Network. *Tumori* 2008;94(2):147-53.

16. Maio M, Nicolay HJ, Ascierto P, Belardelli F, Camerini R, Colombo MP, Queirolo P, Ridolfi R, Russo V, Anzalone L, Fonsatti E, Parmiani G. The Italian Network for Tumor Biotherapy (NIBIT): getting together to push the field forward. *J Transl Med* 2008;6:8
17. Maio M, Nicolay HJ, Ascierto PA, Belardelli F, Camerini R, Colombo MP, Queirolo P, Ridolfi R, Russo V, Fonsatti E, Parmiani G, for the NIBIT. Sixth annual meeting of the Italian network for tumor biotherapy (NIBIT), Siena, 16-18 October 2008. *Cancer Immunol Immunother* 2009 Mar 28 (online prima della stampa).
18. Micheli A, Di Salvo F, Lombardo C, Ciampichini R, Ugolini D, Baili P, Pierotti M. Italian performance in cancer research. *Tumori* 2009;95:133-41.
19. Micheli A, Sanz N, Lombardo C et al. International Collaboration in cancer control and the Third International Cancer Control Congress. *Tumori* 2009;95:579-96.
20. Moretti F, Romero M, Belardelli F (Ed.). *International meeting. needs and challenges in translational medicine: filling the gap between basic research and clinical applications. Istituto Superiore di Sanità. Rome, Italy, October 1-3, 2008. Abstract Book.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (ISTISAN Congressi 08/C7).
21. Pierotti MA, Lombardo C, Rosano C. Nanotechnology: going small for a giant leap in cancer diagnostics and therapeutics. *Tumori* 2008;94(2):191-6.
22. Ringborg U, De Valeriola D, van Harten W, Bosch AL, Lombardo C, Nilsson K, Philip T, Pierotti MA, Riegman P, Saghachian M, Storme G., Tursz T, Verellen D. Improving translational research in oncology: the role of the network of comprehensive cancer centres *Tumori* 2008;94(2):143-6.
23. Tavola rotonda. Per la ricerca vige la parola d'ordine "traslazione": ecco come trasferire i risultati al letto del paziente. III Forum Risk Management in Sanità, Arezzo 2008. *Sole 24 Ore Sanità* n.18 del 12/05/2009. p. 64-70.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, gennaio-marzo 2010 (n. 1)