

MODULISTICA

MODULO 1 - Dati generali

TITOLO DEL PROGETTO (max 100 caratteri)

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

COSTO COMPLESSIVO DEL PROGETTO	/ 1 / 7 / 0 / 9 / 8 / 0 / 0 /
FINANZIAMENTO RICHIESTO AD ACC/ISS	1 / 2 / 0 / 0 / 0 / 0 / 0 /
RISORSE PROPRIE	/ / 4 / 3 / 2 / 0 / 0 / 0 /
COFINANZIAMENTI :	/ / / 7 / 7 / 8 / 0 / 0 /

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

FONDO ATENEO TORINO (GASCO) _____	/ 1 / 3 / 0 / 4 / 0 / 7 /	/ / / 9 / 0 / 0 / 0 /
ENTE EROGATORE	GG MM AA	IMPORTO
AIRC (VECCHIO) _____	/ 0 / 1 / 0 / 1 / 0 / 6 /	/ / / 1 / 5 / 0 / 0 / 0 /
ENTE EROGATORE	GG MM AA	IMPORTO
SIGMA-TAU, ROMA (BATTISTINI) _____	/ 0 / 1 / 0 / 5 / 0 / 7 /	/ / / 1 / 2 / 5 / 0 / 0 /
ENTE EROGATORE	GG MM AA	IMPORTO
AIRC (BRONTE) _____	/ 2 / 2 / 0 / 8 / 0 / 6 /	/ / / 2 / 6 / 3 / 0 / 0 /
ENTE EROGATORE	GG MM AA	IMPORTO
COMPAGNIA DI SAN PAOLO (PARODI) _____	/ 0 / 1 / 0 / 9 / 0 / 7 /	/ / / 1 / 5 / 0 / 0 / 0 /
ENTE EROGATORE	GG MM AA	IMPORTO

DURATA (in mesi, massimo 36) : /-3-/-6-/

COORDINATORE DEL PROGETTO:

nominativo: **VINCENZO BRONTE**

struttura di appartenenza : **ISTITUTO ONCOLOGICO VENETO (IRCCS), U.O.C. IMMUNOLOGIA E
DIAGNOSTICA MOLECOLARE ONCOLOGICA** funzione: **DIRIGENTE MEDICO**

indirizzo : **VIA GATTAMELATA 64 - 35128 PADOVA**

N. tel: **049 821 5897 / 8215805** N. fax: **049 8072854**

indirizzo E-mail : enzo.bronte@unipd.it

DESTINATARIO ISTITUZIONALE PROPONENTE

Destinatario Istituzionale **ISTITUTO ONCOLOGICO VENETO (IRCCS), PADOVA**

Rappresentante legale **PROF. PIER CARLO MUZZIO (COMMISSARIO STRAORDINARIO)**

Responsabile Scientifico UO 1 **DR. VINCENZO BRONTE**

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

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

- **DIPARTIMENTO DI SCIENZA E TECNOLOGIA DEL FARMACO, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO**
- **RESP. SCIENTIFICO PROF. ALBERTO GASCO - RAPPRESENTANTE LEGALE PROF. MICHELE TROTTA**
- **ISTITUTO SUPERIORE DI ONCOLOGIA (ISO) - RESP. SCIENTIFICO PROF. GIANCARLO VECCHIO -**
RAPPRESENTANTE LEGALE PROF. GIANCARLO VECCHIO
- **ISTITUTO SUPERIORE DI ONCOLOGIA (ISO) - DIP. DI ONCOLOGIA, BIOLOGIA E GENETICA (DOBIG),**
UNIV. DEGLI STUDI DI GENOVA - RESP. SCIENTIFICO PROF. SILVIO PARODI - RAPPRESENTANTE
LEGALE PROF. GIANCARLO VECCHIO

DESTINATARI ISTITUZIONALI PARTECIPANTI

Destinatario Istituzionale **FONDAZIONE SANTA LUCIA, IRCCS**

Rappresentante legale **PROF. MARIA ADRIANA AMADIO**

Responsabile Scientifico UO 2 **PROF. LUCA BATTISTINI**

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

- **UNITÀ DI NEUROIMMUNOLOGIA - RESP. SCIENTIFICO PROF. LUCA BATTISTINI**
- **UNITÀ DI CITOFLUORIMETRIA - RESP. SCIENTIFICO PROF. SSA GIOVANNA BORSELLINO**

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

NESSUNO

Destinatario Istituzionale **ISTITUTO CLINICO HUMANITAS, IRCCS**

Rappresentante legale **IVAN MICHELE COLOMBO**

Responsabile Scientifico UO 3 **PROF.SSA ANTONELLA VIOLA**

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

ISTITUTO CLINICO HUMANITAS, IRCCS - RESP. SCIENTIFICO PROF. ANTONIO SICA
RAPPRESENTANTE LEGALE IVAN MICHELE COLOMBO

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

- **ISTITUTO FIRCA DI ONCOLOGIA MOLECOLARE (IFOM) DI MILANO - RESP. SCIENTIFICO PROF.SSA ELISABETTA DEJANA - RAPPRESENTANTE LEGALE PROF. GIUSEPPE DELLA PORTA**
- **ISTITUTO EUROPEO ONCOLOGICO, LABORATORIO DI EMATO-ONCOLOGIA, MILANO - RESP. SCIENTIFICO PROF. FRANCESCO BERTOLINI - RAPPRESENTANTE LEGALE CARLO CIANI**

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

BASE DI PARTENZA E RAZIONALE (max 4000 caratteri)

Da tempo è nota la stretta connessione fra infiammazione e cancro. Studi epidemiologici indicano che l'infiammazione cronica predispone verso diverse 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 complesso 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 (ad es. RET). 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 ed apre la strada a nuove strategie terapeutiche. Con questo obiettivo in mente, abbiamo 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). Abbiamo riscontrato che 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, ed 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, pertanto, 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 su cellule immunitarie murine, almeno due nuove molecole che hanno mostrato proprietà anti-immunosoppressive sono state testate in esperimenti con colture d'organo prostatiche umane. E' 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 (max 4000 caratteri)

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. Questi composti posseggono un gruppo furossano legato tramite un ponte estere al gruppo carbossilico dell'aspirina o dell'acido salicilico. I derivati del furossano (1,2,5-oxadiazole 2-oxide (furan N-oxide) sono capaci di rilasciare NO quando vengono incubati in soluzione fisiologica con i tioli. Nelle cellule e nei tessuti questo potrebbe avvenire grazie all'azione di alcuni enzimi. L'ammontare del rilascio di NO può essere modulato in relazione alla natura dei sostituenti presenti sull'anello furossanico. L'obiettivo traslazionale nell'ambito del programma "Alleanza contro il cancro" 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.

Le molecole suddette sono state sviluppate grazie ad una collaborazione stretta tra IOV, Istituto Humanitas e Dipartimento di scienza e tecnologia del farmaco dell'Università di Torino. Le molecole saranno tutelate da brevetto entro pochi mesi e, pertanto, rappresenteranno un prodotto unico nel panorama farmacologico internazionale. 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 ed 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* ed *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* ed in modelli tumorali sperimentali.

METODOLOGIA (max 8000 caratteri)

Nei mesi passati abbiamo eseguito uno screening di 30 diversi composti donatori di NO/inibitori di COX per la loro capacità di recuperare la responsività dei linfociti T *in vitro* ed abbiamo identificato alcune molecole con una ED₅₀ 100-1000 volte superiore a quella ottenuta in passato con la NO-aspirina. Grazie a questi esperimenti preliminari abbiamo definito due piccole molecole attive (leading compounds) che serviranno come prototipi per studi di relazione tra struttura e attività. Ciò permetterà di delineare le proprietà chimiche di base delle molecole efficaci. La seconda generazione di molecole, ottimizzate in termini di farmaco-cinetica, sarà utilizzata in studi su colture d'organo (tumori umani), in modelli murini (carcinoma spontaneo della prostata o tumore trapiantabile del colon). Fin dall'inizio del finanziamento, prevediamo di poter utilizzare *in vivo* i primi farmaci risultati efficaci *in vitro*, al fine di valutarne l'azione e l'eventuale tossicità. Studieremo in dettaglio i meccanismi molecolari alla base della loro efficacia sul sistema immune e la loro eventuale azione antitumorale, da soli o in combinazione con trattamenti di immunoterapia attiva o passiva. Inoltre, valuteremo l'azione di altre molecole che possono avere effetti sull'infiltrato infiammatorio indotto dal tumore, con l'obiettivo finale di ottenere azioni sinergiche tra composti che hanno come bersaglio vie molecolari diverse. Molti studi suggeriscono un ruolo centrale di NF-kB nella cancerogenesi associata a fenomeni infiammatori cronici. NF-kB induce segnali di crescita e di sopravvivenza legati all'attivazione di "signaling-proteins" che favoriscono la transizione G0-G1 come Cyclin-D1 e c-Myc. Uno dei gruppi di ricerca afferenti al presente progetto sta sviluppando inibitori dei due oncogeni c-Myc e Bcl-XL. Inoltre, gruppi afferenti all'ISO hanno dimostrato di recente che alcuni specifici recettori per chemochine (CXCR1 e CXCR4) sono iperespressi in cellule tumorali della tiroide. La secrezione dei corrispondenti ligandi da parte delle cellule tumorali stesse (Gro) oppure dello stroma (SDF) innesca dei circuiti paracrini o autocrini che sostengono la motilità e la proliferazione delle cellule tumorali, oltre che influenzare la formazione dell'infiltrato infiammatorio. L'espressione di queste molecole è, inoltre, sotto il diretto controllo di oncoproteine chinasiche espresse nei tumori della tiroide quali RET e BRAF. Inibitori di basso peso molecolare competitivi verso queste due oncoproteine chinasiche sono in corso di sviluppo.

La presente ricerca si propone di studiare in dettaglio: 1) fenotipo e funzione di cellule mielomonocitarie con azione immunosoppressiva presenti in circolo ed infiltranti il tumore; 2) efficacia dei composti sull'inibizione da perossinitriti cui spetta un ruolo fondamentale nell'impedire il reclutamento di linfociti T tumore-specifici ed alterare la funzionalità dei pochi linfociti che migrano in sede tumorale; 3) effetto dei composti sulla linfo-angiogenesi tumorale attraverso la quantificazione dei vasi e l'espressione di marcatori specifici per vasi ematici e linfatici; 4) azione sulla permeabilità dei vasi tumorali; 5) ripristino della responsività all'antigene dei linfociti T antitumorali.

La metodologia dettagliata è riportata nelle sezioni successive del progetto. Vorremmo qui evidenziare alcuni aspetti importanti del sinergismo che intendiamo stabilire tra le diverse Unità afferenti al progetto. Una tappa cruciale per il trasferimento clinico di questi studi sarà costituita dalla possibilità di valutare efficacemente, in modelli preclinici, l'impatto di terapie combinate che prevedano la vaccinazione con antigeni tumore-associati o il trasferimento adottivo di linfociti T tumore-specifici in animali portatori di tumore trattati con farmaci che riducono le azioni negative del microambiente infiammatorio tumorale. Questi esperimenti sono estremamente complessi a causa delle numerose variabili sperimentali e richiederebbero un numero elevato di animali, qualora ciascun gruppo dovesse operare indipendentemente. La collaborazione stretta tra le diverse Unità, invece, consentirà di ottimizzare la sperimentazione evitando ripetizioni e focalizzandosi solo sui composti che hanno superato le fasi iniziali del processo di validazione condiviso fra i partecipanti al progetto. In questo contesto, l'alto livello di competenza e la reputazione scientifica nazionale ed internazionale delle unità partecipanti è un fattore chiave del successo del progetto. Il gruppo di Ricerca che collaborerà nell'attuazione del presente progetto è composto da ricercatori altamente qualificati con diverse “expertise”. Il gruppo ha messo appunto numerosi modelli cellulari e animali di modulazione della risposta immunitaria antitumorale, ampiamente usati nella comunità scientifica internazionale. I laboratori possiedono i necessari strumenti e le competenze rilevanti per una completa analisi biomolecolare e immunologica dei sistemi proposti nel progetto.

Di seguito, sono riportate le partecipazioni dei diversi enti agli obiettivi descritti in precedenza. Ciascun obiettivo ed azione specifica richiederanno l'integrazione fattiva tra diverse Unità.

Obiettivo 1.

Azione 1a. IOV- Istituto Humanitas - Università di Torino - Fondazione Santa Lucia

Azione 1b. Istituto Humanitas - Università di Torino - IFOM - Fondazione Santa Lucia

Azione 1c. Università di Torino - IRCCS Fondazione Santa Lucia

Azione 1d. IOV- Istituto Humanitas - IFOM - IEO - Università di Torino

Obiettivo 2.

Azione 2a. Istituto Humanitas - ISO- IRCCS Fondazione Santa Lucia

Azione 2b. Istituto Humanitas - ISO- IRCCS Fondazione Santa Lucia - Università di Torino

RISULTATI ATTESI (max 4000 caratteri)

I nostri studi serviranno a definire l'azione, gli effetti collaterali e le modalità di somministrazione di nuovi composti che alterano, nel loro complesso, l'ambiente pro-infiammatorio ed immunosoppressivo indotto dal tumore, agendo su vie metaboliche od oncogeni che rivestono un ruolo determinante in questo processo. Nel corso degli studi, inoltre, saranno definiti aspetti non secondari come la valutazione degli effetti dei farmaci su popolazioni cellulari circolanti nel sangue, sulle cellule endoteliali, sulle cellule che compongono lo stroma tumorale, sulla risposta linfocitaria anti-tumorale e su diversi bersagli molecolari. Questi dati serviranno, da una parte, a comprendere i meccanismi d'azione ed i reali bersagli dell'azione farmacologica *in vivo* e, dall'altra, porteranno a comprendere meglio quali categorie di pazienti potrebbero beneficiare del trattamento con i nuovi composti.

Quando si considera l'immunoterapia dei tumori, il problema dell'immunosoppressione indotta dal tumore deve essere tenuto nella dovuta considerazione. Diverse strategie sono esplorate al momento per sovvertire o mitigare l'anergia e la tolleranza indotta dalla crescita neoplastica e le industrie stanno attivamente investendo in questo settore della ricerca. Inoltre, molti ricercatori percepiscono questo aspetto come fondamentale per l'ulteriore sviluppo di strategie efficaci di immunoterapia attiva e passiva. Aduvanti convenzionali attualmente usati per favorire la fase di "priming" della risposta immune verso antigeni diversi, compresi quelli tumorali, non sono selettivi ed il loro uso nella terapia potrebbe avere conseguenze inattese nel paziente. Il nostro approccio, invece, tende a potenziare la risposta immune antitumorale specifica, pre-esistente o innescata nel paziente mediante la vaccinazione o il trasferimento cellulare adottivo.

La qualità dei risultati finali raggiunti potrà essere valutata sulla base della coerenza dei risultati stessi e la correttezza sperimentale utilizzata nel loro raggiungimento. Per risultati attinenti alla ricerca di base e traslazionale, quali quelli del presente progetto, lo strumento principale e comunemente accettato per la verifica della qualità dei risultati sperimentali è dato dal giudizio di revisori internazionali, a seguito di pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali ed internazionali, oltre che da resoconti avuti a seguito di partecipazioni a congressi.

Quando possibile, i risultati originati da questa ricerca saranno trasferiti al sistema sanitario nazionale. Si prevede di poter brevettare diversi composti attivi e promuovere anche la creazione di Aziende Start up che possano sviluppare ulteriormente queste ricerche e perseguire la loro traslazione clinica. Un altro obiettivo raggiungibile, che sarà fattivamente perseguito dalle Unità operative al termine della sperimentazione, è la messa a punto di uno studio clinico di fase I/II. Gli aspetti socio-economici di questo progetto sono evidenti e si presume rilevanti, traducendosi nella definizione di nuove terapie per il cancro basate su "small molecules" ma anche nella selezione di pazienti che meglio possono rispondere a questi trattamenti.

I sistemi modello allestiti nel presente progetto, inoltre, saranno disponibili per la comunità scientifica per test pre-clinici di farmaci dopo la pubblicazione dei risultati. Allo stesso modo, i marcatori recettoriali, postrecettoriali, sinaptici, molecolari e immunologici, messi in luce alla fine del progetto saranno disponibili per testare ipotesi e per la messa a punto di trattamenti terapeutici razionali per la cura delle malattie neoplastiche.

COMPOSIZIONE DEL COSTO COMPLESSIVO DEL PROGETTO

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	222500	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	407000	281000
3. Missioni	59500	45500
4. Attrezzature	20000	20000
5. Materiale di Consumo	826100	717500
6. Pubblicazioni/ organizzazione convegni, ecc.	20000	18000
7. Elaborazione dati (specificare)	10000	10000
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)	144700	108000
TOTALE	1709800	1200000

Curriculum Vitae del Coordinatore del progetto

(max 2 pagine)

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

A. GENERALITÀ

- Nome: Vincenzo Bronte
- Data e luogo di nascita: Gela (CL), 24-08-1963.
- Residenza: P.zza del Sole e della Pace n° 16, Abano Terme, Padova, tel. 049-8601981
- Cittadinanza: Italiana
- Servizio Militare: svolto in qualità di Ufficiale Medico presso la Caserma Bussolin, XV^a Officina di Riparazione dell'Esercito, Via Palazzi 2, Padova.
- Impiego attuale dal 13 Aprile 1992: dirigente medico presso il Servizio di Immunologia e Diagnostica Molecolare Oncologica, Istituto Oncologico Veneto, Via Gattamelata 64, 35128, Padova. Telefono: 049-8215897, fax: 049-8072854, e-mail: enzo.bronte@unipd.it

B. CURRICULUM DEGLI STUDI

- 18-07-1988: Laurea in Medicina e Chirurgia (voti 110/110 e lode) con discussione di una tesi sperimentale dal titolo "Proprietà biologiche e caratteristiche fenotipiche delle cellule citotossiche attivate da linfocine (LAK)" relatore Prof. Dino Collavo, Cattedra d'Immunologia, Istituto di Oncologia, Università di Padova.
- Dicembre 1988: Esame di Stato presso l'Università degli Studi di Padova.
- 21-12-92: Diploma di specializzazione in Allergologia ed Immunologia Clinica (70/70) con discussione di una tesi sperimentale dal titolo: "Meccanismi molecolari di attivazione operanti in seguito all'interazione tra linfociti citotossici e cellule bersaglio" relatore Prof. Dino Collavo, Cattedra di Immunologia, Istituto di Oncologia, Università di Padova.

C. BORSE DI STUDIO E RICONOSCIMENTI SCIENTIFICI

- 1988-1989: borsa di studio della ditta Fidia Pharmaceuticals con progetto di ricerca svolto presso l'Istituto di Oncologia dell'Università di Padova;
- 1989-1992: borse di studio dell'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC) con progetto di ricerca svolto presso l'Istituto di Oncologia dell'Università di Padova;
- 1994-1995: borsa di studio per l'estero assegnata dall'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC) con progetto di ricerca svolto presso la Surgery Branch del National Cancer Institute del National Institutes of Health di Bethesda, USA.
- 1995-1996: borsa di studio "Exchange Scientists" nell'ambito del programma "Courtesy Associate" presso il National Cancer Institute del National Institutes of Health di Bethesda.
- Premio PBI International per la migliore comunicazione scientifica al XXV Convegno Nazionale del GCI, Ancona 5-7 Giugno, 1997.
- Premio Internazionale "Francesco De Luca" assegnato nel 2007 dall'Accademia Nazionale dei Lincei e destinato a medici impegnati nella ricerca sui tumori

D. ATTIVITÀ EDITORIALE

Editore associato della rivista internazionale *Current Gene Therapy*.

Editore associato della rivista *Journal of Translational Medicine*.

E. COLLABORAZIONI NAZIONALI ED INTERNAZIONALI

1. Nicholas P. Restifo, M.D., Senior Investigator, Surgery Branch, National Cancer Institute
10 Center Drive, Bldg. 10, Room 2B42, NIH, Bethesda, MD20892-1502, USA

Progetto: studio di correlati immunologici nella sperimentazione di vaccini antitumorali innovativi.

2. Dr. Ivan Borrello, Assistant Professor of Oncology, The Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, at Johns Hopkins,
1650 Orleans St. Rm 453, Baltimore, MD 21231, USA

Progetto: identificazione di nuove molecole per l'inibizione degli effetti soppressori dei tumori sul sistema immune

3. Dr. Jonathan Schneck, Professor of Pathology and Medicine, 720 Rutland Ave., Ross 664G, Baltimore, MD, 21205-2196, USA.

Progetto: uso di APC sintetiche per aumentare *in vivo* la risposta di linfociti antitumorali con TCR a bassa avidità.

4. Prof Riccardo Dalla Favera, Uris Professor of Pathology and Genetics Director, Institute for Cancer Genetics Columbia University, 1150 St. Nicholas Avenue, New York NY 10032.

Progetto: Identificazione ed analisi di nuovi microRNA umani.

F. CRONOLOGIA DELL'ATTIVITÀ SCIENTIFICA

Il Dott. Bronte ha svolto continuamente attività scientifica di ricerca dal 1986. E' autore di 66 pubblicazioni per estenso; di queste 24 sono pubblicate come primo o ultimo autore.

G. PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

1. DePalma, R., Marigo, I., Del Galdo, F., De Santo, C., Serafini, P., Cingarlini, S., Tüting, T., Lenz, J., Basso, G., Zanollo, P., and **V. Bronte**. Therapeutic effectiveness of recombinant cancer vaccines is associated with a prevalent TCR- α usage by melanoma-specific CD8⁺ T lymphocytes. *Cancer Res.*, 64: 8068-8076, 2004. I.F. 7.690
2. Mocellin, S., Mandruzzato, S., **Bronte, V.**, Lise, M., and D. Nitti. Part I: Vaccines for solid tumours. *Lancet Oncology*, 5: 681-89, 2004. I.F. 7.470
3. Mocellin, S., Mandruzzato, M., **Bronte, V.**, and F. Marincola. Correspondence. Cancer vaccines: pessimism in check. *Nat. Med.*, 10:1278-9, 2004. I.F. 31.223
4. De Santo, C., Serafini, P., Marigo, I., Dolcetti, L., Bolla, M., Del Soldato, P., Melani, C., Guiducci, C., Colombo, M.P., Iezzi, M., Musiani, P., Zanollo, P., and **V. Bronte**. Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 4185-4190, 2005. I.F. 10.452
5. **Bronte, V.**, Kasic, T., Gri, G., Gallana, K., Borsellino, G., Marigo, I., Battistini, L., Iafrate, M., Prayer-Galetti, T., Pagano, F., and A. Viola. Boosting anti-tumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J. Exp. Med.*, 201: 1257-1268, 2005. I.F. 14.588
6. **V. Bronte** and P. Zanollo. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.*, 5:641-54, 2005. I.F. 32.695
7. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, Bottazzi B, Doni A, **Bronte V**, Pasqualini F, Vago L, Nebuloni M, Mantovani A, Sica A. A distinct and unique transcriptional programme expressed by tumor-associated macrophages: defective NF- κ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation. *Blood*, 107:2112-22, 2006. I.F. 9.782
8. Gallina, G., Dolcetti, L., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Colombo, M.P., Basso, G., Brombacher, F., Borrello, I., Zanollo, P., Biccato, S., and **Bronte, V.** Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8⁺ T cells. *J. Clin. Invest.*, 116:2777-2790, 2006. I.F. 15.053.
9. Serafini, P., Meckel, K., Kelso, M., Noonan, K.A., Califano, J., Koch, W., Dolcetti, L., **Bronte, V.**, and Borrello, I. Chronic phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous anti-tumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J. Exp. Med.*, 203:2691-702, 2006. I.F. 14.588.
10. Sica, A. and **Bronte, V.** Altered macrophage differentiation and immune dysfunctions during tumor development. *J. Clin. Invest.*, 117:1155-66, 2007. I.F. 15.053.

MODULO 3: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUNA UNITÀ OPERATIVA

(Compilare un modulo per ciascuna UO)

UNITÀ OPERATIVA: Istituto Oncologico Veneto, IRCCS

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **_VINCENZO BRONTE**

struttura di appartenenza : **ISTITUTO ONCOLOGICO VENETO (IRCCS), U.O.C. IMMUNOLOGIA E**

DIAGNOSTICA MOLECOLARE ONCOLOGICA Funzione: **DIRIGENTE MEDICO**

indirizzo : **VIA GATTAMELATA 64, 35128 PADOVA**

N. tel: **049-8215897** N. fax: **049-8071854**

indirizzo E-mail: enzo.bronte@unipd.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **PROF. PIER CARLO MUZZIO**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO (max 2000 caratteri)

Questa Unità operativa avrà il compito di sintetizzare e sperimentare nuovi composti farmacologicamente attivi in modelli sperimentali murini. Alla progettazione, sintesi, modulazione strutturale e caratterizzazione chimico-fisica di nuovi farmaci NO-donatori seguirà una fase di valutazione della loro attività funzionale mediante saggi funzionali "high throughput" che permetteranno di isolare i composti più attivi nel ripristinare la funzione immune *in vitro*. I composti più attivi saranno avviati alla sperimentazione *in vivo*. L'Unità coordinata dal Prof. A. Gasco dell'Università di Torino si occuperà della sintesi e delle modifiche chimiche alle diverse famiglie di molecole NO-donatrici. Lo IOV supervisionerà il lavoro delle diverse Unità coordinando anche gli esperimenti tesi a valutare i possibili effetti sinergici con i farmaci studiati dai gruppi afferenti all'ISO. L'ISO è un Consorzio Interuniversitario Nazionale del Ministero dell'Università e della Ricerca al quale afferiscono 15 Atenei italiani. Per quanto riguarda i gruppi di ricerca facenti capo ad ISO, il gruppo coordinato dal prof. S. Parodi di Genova ha in corso di brevettazione europea un potente inibitore di Bcl-XL che uccide le cellule bersaglio con un meccanismo pro-apoptotico. Questo gruppo di ricerca si è anche a lungo occupato del disegno sperimentale di farmaci innovativi capaci di inibire in maniera selettiva l'oncogene c-Myc, ed ha recentemente messo a punto alcuni inibitori peptidomimetici e mini-anticorpi internalizzanti capaci di inibire l'attività di questo potente oncogene; di recente, il gruppo sta mettendo a punto farmaci della stessa categoria ancora più efficaci e si avvia al trasferimento dei risultati su sistemi *in vivo* di piccoli roditori. Il gruppo di ricerca coordinato dal prof. G. Vecchio si occuperà dello studio di inibitori di oncoproteine con funzione chinasi come RET e BRAF e del ruolo di recettori per chemochine quali CXCR1 e CXCR4 nella proliferazione ed invasività tumorale.

METODOLOGIA (max 4000 caratteri)

Le varie molecole progettate saranno sintetizzate utilizzando classiche procedure di sintesi organica. La struttura dei prodotti sarà confermata attraverso tecniche analitiche (analisi elementare, cromatografia TLC e HPLC) e spettroscopiche (IR, UV, NMR, spettrometria di massa). Sulla base degli screening farmacologici *in vitro* i composti le cui proprietà risulteranno più promettenti verranno ri-sintetizzati su larga scala per eseguire le prove *in vivo*. A questo proposito i derivati di interesse saranno anche caratterizzati, attraverso tecniche opportune, per il loro profilo di solubilità in solventi acquosi o fisiologicamente compatibili, per il profilo di lipofilia e di permeazione in modelli di membrana, al fine di verificarne le caratteristiche adatte ad una somministrazione *in vivo*. Infine, si condurranno studi di modellistica molecolare per approfondire il meccanismo d'azione e le relazioni struttura attività connesse con le proprietà dei derivati sotto studio.

"Per lo screening di farmaci NO-donatori, una coltura leucocitaria mista (MLR) è allestita in assenza o in presenza di una quantità di cellule mieloidi soppressori (MSC) irradiate sufficiente a sopprimere completamente la proliferazione di linfociti T nella MLR, come rivelato dall'incorporazione del radionuclide ³H-TdR dopo tre giorni di incubazione. In un secondo test, le colture linfocitarie stimolate con anticorpi α CD3 e α CD28. Topi portatori di tumore trapiantabile o spontaneo riceveranno diverse concentrazioni dei farmaci da sviluppare, per gavage o mediante somministrazione intraperitoneale. Gli animali saranno analizzati per l'insorgenza di eventuali effetti collaterali (es. perdita di peso) e i tumori misurati ogni due giorni. In

alcuni esperimenti, linfonodi e milza saranno prelevati per analizzare i linfociti T antigene specifici e le cellule MSC. L'analisi immunohistologica e citofluorimetrica delle cellule del microambiente tumorale verrà condotta su tumori primari asportati chirurgicamente.

Per l'identificazione di geni coinvolti nell'azione di CXCL12, utilizzeremo la tecnologia dei microarrays di DNA. La linea cellulare TPC1, derivata da un carcinoma tiroideo, sarà stimolata con la chemochina CXCL12. Procederemo ad estrarre l'RNA totale, che sarà utilizzato per l'ibridazione con i microarray di DNA. Cercheremo di identificare inibitori di RET da utilizzare nei tumori della tiroide in cui RET è frequentemente attivato. Indagheremo il fenomeno della resistenza a questi inibitori al fine di poter identificare possibili residui critici a rischio di mutazione durante il trattamento. Sono stati sviluppati dei composti in grado di bloccare CXCR4 e CXCR2. Effettueremo degli esperimenti di tumorigenicità nel topo nudo utilizzando linee umane che esprimono CXCR4 o CXCR2. I topi saranno trattati con diversi inibitori e il diametro dei tumori sarà misurato. Alla fine dell'esperimento, la dimensione dei tumori, la morfologia e l'eventuale presenza di metastasi a distanza saranno valutate e questi parametri saranno paragonati a quelli di tumori non trattati.

Lo sviluppo di nuove molecole peptidomimetiche inibitrici di c-Myc sarà attuato attraverso "modelling" delle interazioni tra Myc stesso e INI1 o TIP49 attraverso i suoi domini carbossi- e amino-terminale. Tali molecole saranno sintetizzate per fase solida ed il loro screening sarà effettuato con l'ausilio di tests ELISA, Pull-Down Assays e Fluorescence Polarization Assays. I minianticorpi monoclonali (ScFV) anti-Myc dotati di sequenza internalizzante (INT), sviluppati in fagi filamentosi saranno prodotti sia in cellule procarioti, sia, eventualmente, in cellule eucarioti: i loro effetti saranno saggati sia in vitro sia in vivo in linee cellulari iper-esprimenti c-Myc e successivamente in modelli animali. La ricerca di inibitori di Bcl-XL sarà invece sviluppata attraverso lo studio degli effetti della nostra molecola dotata di attività inibitoria su tumori in piccoli roditori *in vivo*.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DELL'UNITÀ OPERATIVA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	90000	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	103000	103000
3. Missioni Missioni presso laboratori dei centri afferenti Partecipazioni a congressi Rapporti di collaborazione	22500	18500
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing): _____ _____ _____	NULLA	NULLA
5. Materiale di consumo Materiale per colture cellulari Reagenti per biologia molecolare Reagenti per biochimica Spese di mantenimento animali Materiale per la sintesi dei composti : solventi , reagenti, colonne cromatografiche , silice. Materiale per analisi: solventi deuterati per NMR, solventi per HPLC, elettrodo a idrogeno misure potenziometriche , elettrodo NO selettivo	410600	348500
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc. Pubblicazione su riviste internazionali con IF Organizzazione convegni scientifici Organizzazione attività seminariali	15000	13000
7. Elaborazione dati (specificare) Up-grade di Software esistenti per calcoli statistici ed acquisto software per stazione grafica	10000	10000
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) COSTI INDIRETTI Analisi elementari , spettri di massa ad alta risoluzione, NMR multinucleare	43700	42000
TOTALE	694800	535000

Curriculum Vitae del Responsabile Scientifico dell'Unità Operativa

A. GENERALITÀ

- Nome: Vincenzo Bronte
- Data e luogo di nascita: Gela (CL), 24-08-1963.
- Residenza: P.zza del Sole e della Pace n° 16, Abano Terme, Padova, tel. 049-8601981
- Cittadinanza: Italiana
- Servizio Militare: svolto in qualità di Ufficiale Medico presso la Caserma Bussolin, XV^a Officina di Riparazione dell'Esercito, Via Palazzi 2, Padova.
- Impiego attuale dal 13 Aprile 1992: dirigente medico presso il Servizio di Immunologia e Diagnostica Molecolare Oncologica, Istituto Oncologico Veneto, Via Gattamelata 64, 35128, Padova. Telefono: 049-8215897, fax: 049-8072854, e-mail: enzo.bronte@unipd.it

B. CURRICULUM DEGLI STUDI

- 18-07-1988: Laurea in Medicina e Chirurgia (voti 110/110 e lode) con discussione di una tesi sperimentale dal titolo "Proprietà biologiche e caratteristiche fenotipiche delle cellule citotossiche attivate da linfocchine (LAK)" relatore Prof. Dino Collavo, Cattedra d'Immunologia, Istituto di Oncologia, Università di Padova.
- Dicembre 1988: Esame di Stato presso l'Università degli Studi di Padova.
- 21-12-92: Diploma di specializzazione in Allergologia ed Immunologia Clinica (70/70) con discussione di una tesi sperimentale dal titolo: "Meccanismi molecolari di attivazione operanti in seguito all'interazione tra linfociti citotossici e cellule bersaglio" relatore Prof. Dino Collavo, Cattedra di Immunologia, Istituto di Oncologia, Università di Padova.

C. BORSE DI STUDIO E RICONOSCIMENTI SCIENTIFICI

- 1988-1989: borsa di studio della ditta Fidia Pharmaceuticals con progetto di ricerca svolto presso l'Istituto di Oncologia dell'Università di Padova;
- 1989-1992: borse di studio dell'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC) con progetto di ricerca svolto presso l'Istituto di Oncologia dell'Università di Padova;
- 1994-1995: borsa di studio per l'estero assegnata dall'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC) con progetto di ricerca svolto presso la Surgery Branch del National Cancer Institute del National Institutes of Health di Bethesda, USA.
- 1995-1996: borsa di studio "Exchange Scientists" nell'ambito del programma "Courtesy Associate" presso il National Cancer Institute del National Institutes of Health di Bethesda.
- Premio PBI International per la migliore comunicazione scientifica al XXV Convegno Nazionale del GCI, Ancona 5-7 Giugno, 1997.
- Premio Internazionale "Francesco De Luca" assegnato nel 2007 dall'Accademia Nazionale dei Lincei e destinato a medici impegnati nella ricerca sui tumori

D. ATTIVITÀ EDITORIALE

Editore associato della rivista internazionale *Current Gene Therapy*.

Editore associato della rivista *Journal of Translational Medicine*.

E. PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE (le più significative negli ultimi 5 anni)

1. Mocellin, S., Mandruzzato, S., **Bronte, V.**, Lise, M., and D. Nitti. Part I: Vaccines for solid tumours. *Lancet Oncology*, 5: 681-89, 2004. I.F. 7.470
2. Mocellin, S., Mandruzzato, M., **Bronte, V.**, and F. Marincola. Correspondence. Cancer vaccines: pessimism in check. *Nat. Med.*, 10:1278-9, 2004. I.F. 31.223
3. De Santo, C., Serafini, P., Marigo, I., Dolcetti, L., Bolla, M., Del Soldato, P., Melani, C., Guiducci, C., Colombo, M.P., Iezzi, M., Musiani, P., Zanovello, P., and **V. Bronte**. Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 4185-4190, 2005. I.F. 10.452
4. **Bronte, V.**, Kasic, T., Gri, G., Gallana, K., Borsellino, G., Marigo, I., Battistini, L., Iafrate, M., Prayer-Galetti, T., Pagano, F., and A. Viola. Boosting anti-tumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J. Exp. Med.*, 201: 1257-1268, 2005. I.F. 14.588
5. **V. Bronte** and P. Zanovello. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.*, 5:641-54, 2005. I.F. 32.695
6. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, Bottazzi B, Doni A, **Bronte V**, Pasqualini F, Vago L, Nebuloni M, Mantovani A, Sica A. A distinct and unique transcriptional programme expressed by tumor-associated macrophages: defective NF- κ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation. *Blood*, 107:2112-22, 2006. I.F. 9.782
7. Gallina, G., Dolcetti, L., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Colombo, M.P., Basso, G., Brombacher, F., Borrello, I., Zanovello, P., Bucciato, S., and **Bronte, V.** Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8⁺ T cells. *J. Clin. Invest.*, 116:2777-2790, 2006. I.F. 15.053.
8. Serafini, P., Meckel, K., Kelso, M., Noonan, K.A., Califano, J., Koch, W., Dolcetti, L., **Bronte, V.**, and Borrello, I. Chronic phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous anti-tumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J. Exp. Med.*, 203:2691-702, 2006. I.F. 14.588.
9. Sica, A. and **Bronte, V.** Altered macrophage differentiation and immune dysfunctions during tumor development. *J. Clin. Invest.*, 117:1155-66, 2007. I.F. 15.053.

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

(Si devono presentare tanti moduli 3bis quanti sono i gruppi di ricerca coinvolti)

GRUPPO DI RICERCA: Unità di Immunologia e Diagnostica Molecolare Oncologica

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **_Vincenzo Bronte**

struttura di appartenenza : **ISTITUTO ONCOLOGICO VENETO (IRCCS), U.O.C. IMMUNOLOGIA E**

DIAGNOSTICA MOLECOLARE ONCOLOGICA Funzione: **DIRIGENTE MEDICO**

indirizzo : **VIA GATTAMELATA 64, 35128 PADOVA**

N. tel: **049-8215897** N. FAX: **049-8071854**

indirizzo E-mail: enzo.bronte@unipd.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **PROF. PIER CARLO MUZZIO**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO (max 500 caratteri)

L'Unità di Immunologia si occuperà dello screening iniziale dei composti NO-donatori in colture *in vitro* di linfociti T e porterà a termine gli esperimenti *in vivo* impiegando modelli murini di tumori spontanei (TRAMP o Her2/neu) o trapiantabili (colon carcinoma e carcinoma mammario). Studierà l'effetto dei composti sulla progressione tumorale, sulla concomitante alterazione della mielopoiesi, sui bersagli enzimatici NOS e ARG presenti nel microambiente tumorale e sulla risposta immune specifica verso gli antigeni tumore-associati.

METODOLOGIA (MAX 1000 CARATTERI)

"High throughput" screening di farmaci NO-donatori: una coltura leucocitaria mista (MLR) è allestita in assenza o in presenza di una quantità di cellule mieloidi soppressori (MSC) gamma-irradiate sufficiente a sopprimere completamente la proliferazione di linfociti T nella MLR, come rivelato dall'incorporazione del radionuclide ³H-TdR dopo tre giorni di incubazione. In un secondo test, le colture linfocitarie stimolate con anticorpi α CD3 e α CD28.

Studi *in vivo*. Topi portatori di tumore trapiantabile o spontaneo riceveranno diverse concentrazioni dei farmaci da sviluppare, per gavage o mediante somministrazione intraperitoneale. Gli animali saranno analizzati per l'insorgenza di eventuali effetti collaterali (es. perdita di peso) e i tumori misurati ogni due giorni. In alcuni esperimenti, linfonodi e milza saranno prelevati per analizzare i linfociti T antigene specifici e le cellule MSC. L'analisi immunoistologica e citofluorimetrica delle cellule del microambiente tumorale verrà condotta su tumori primari asportati chirurgicamente.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	42000	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio Borsa di studio triennale	45000	45000
3. Missioni Missioni presso laboratori dei centri afferenti	14000	10000
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing): _____ _____ _____	NULLA	NULLA
5. Materiale di consumo Materiale per colture cellulari Reagenti per biologia molecolare Reagenti per biochimica Spese di mantenimento animali	284600	260000
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc. Partecipazioni a congressi	10000	8000
7. Elaborazione dati (specificare)	NULLA	NULLA
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) 5% COSTI INDIRETTI	17200	17000
TOTALE	412800	340000

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

(Si devono presentare tanti moduli 3bis quanti sono i gruppi di ricerca coinvolti)

GRUPPO DI RICERCA: Gruppo di Chimica Farmaceutica presso il Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco (DSTF)

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Alberto Gasco**

struttura di appartenenza : **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO** funzione: **PROF. ORDINARIO DI CHIMICA FARMACEUTICA**

indirizzo : **DIPARTIMENTO DI SCIENZA E TECNOLOGIA DEL FARMACO**

N. tel: **011-6707670 / 7669** N. fax: **011-6707670 / 7286**

indirizzo E-mail: alberto.gasco@unito.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **PROF. MICHELE TROTTA**
DIRETTORE DEL DIPARTIMENTO DI SCIENZA E
TECNOLOGIA DEL FARMACO
VIA GIURIA 9, 10125 TORINO, ITALIA

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO (max 500 caratteri)

Progettazione, sintesi, modulazione strutturale e caratterizzazione chimico-fisica di nuovi farmaci NO-donatori (Obiettivo 1 del programma). Preliminari studi condotti su alcuni farmaci *leads* in collaborazione tra i gruppi di ricerca, hanno dimostrato elevato interesse su aspirine NO-donatrici realizzate presso il DSTF. Pertanto il contributo specifico di tale gruppo consiste nel progettare, a partire da detti *leads*, nuovi modelli, al fine di ottimizzarne e potenziarne le proprietà.

METODOLOGIA (max 1000 caratteri)

Le varie molecole progettate verranno sintetizzate utilizzando classiche procedure di sintesi organica. La struttura dei prodotti verrà confermata attraverso tecniche analitiche (analisi elementare, cromatografia TLC e HPLC) e spettroscopiche (IR, UV, NMR, spettrometria di massa). Sulla base degli screening farmacologici *in vitro* i composti le cui proprietà risulteranno più promettenti verranno ri-sintetizzati su larga scala per eseguire le prove *in vivo*. A questo proposito i derivati di interesse saranno anche caratterizzati, attraverso tecniche opportune, per il loro profilo di solubilità in solventi acquosi o fisiologicamente compatibili, per il profilo di lipofilia e di permeazione in modelli di membrana, al fine di verificarne le caratteristiche adatte ad una somministrazione *in vivo*. Infine, si condurranno studi di modellistica molecolare per approfondire il meccanismo d'azione e le relazioni struttura attività connesse con le proprietà dei derivati sotto studio.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	18000	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	NULLA	NULLA
3. Missioni	NULLA	NULLA
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):	NULLA	NULLA
5. Materiale di consumo	34000	25000
Materiale per la sintesi dei composti : solventi , reagenti, colonne cromatografiche , silice. Materiale per analisi: solventi deuterati per NMR, solventi per HPLC, elettrodo a idrogeno misure potenziometriche , elettrodo NO selettivo		
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.	NULLA	NULLA
7. Elaborazione dati (specificare)	10000	10000
Up-grade di software esistenti per calcoli statistici ed acquisto software per stazione grafica. _____		
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)	10000	10000
Analisi elementari , spettri di massa ad alta risoluzione, NMR multinucleare		
TOTALE	72000	45000

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

(Si devono presentare tanti moduli 3bis quanti sono i gruppi di ricerca coinvolti)

GRUPPO DI RICERCA: ISTITUTO SUPERIORE DI ONCOLOGIA (ISO)

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **VECCHIO GIANCARLO**

struttura di appartenenza : **ISTITUTO SUPERIORE DI ONCOLOGIA** funzione: **DIRETTORE**

INDIRIZZO: DBPCM, VIA S. PANSINI, 5 80121, NAPOLI

N. tel: **081 7463324** N. fax: **081 7463241**

indirizzo E-mail: vecchio@unina.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **VECCHIO GIANCARLO**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO (max 500 caratteri)

Alcune chemochine e recettori per chemochine sono overespressi nelle cellule tiroidee trasformate dall'oncogene RET, in particolare CXCR2 , CXCR3 e CXCR4. La stimolazione di tali recettori con i rispettivi ligandi induce proliferazione, chemiotassi e protezione da apoptosi. RET, CXCR4 e CXCR2 sono potenziali bersagli di terapie antineoplastiche. Proponiamo quindi di: 1) Identificare i meccanismi con cui le chemochine inducono gli effetti biologici descritti. 2) Identificare nuovi farmaci inibitori di RET. 3) Sondare l'uso antitumorale di inibitori di CXCR2 e CXCR4.

METODOLOGIA (max 1000 caratteri)

- 1) Per l'identificazione di geni coinvolti nell'azione di CXCL12, utilizzeremo la tecnologia dei microarrays di DNA. A questo scopo utilizzeremo la linea cellulare TPC1, derivata da un carcinoma tiroideo, che verrà stimolata o meno con la chemochina CXCL12. Procederemo quindi ad estrarre l'RNA totale, che sarà utilizzato per l'ibridazione con i microarray di DNA.
- 2) Cercheremo di identificare inibitori di RET da utilizzare nei tumori della tiroide in cui RET è frequentemente attivato. Indagheremo inoltre il fenomeno della resistenza a questi inibitori al fine di poter identificare possibili residui critici a rischio di mutazione durante il trattamento.
- 3) Sono stati sviluppati dei composti in grado di bloccare CXCR4 e CXCR2 . Effettueremo degli esperimenti di tumorigenicità nel topo nudo utilizzando linee umane che esprimono CXCR4 o CXCR2. I topi saranno trattati con diversi inibitori e il diametro dei tumori sarà misurato. Alla fine dell'esperimento, la dimensione dei tumori, la morfologia e la eventuale presenza di metastasi a distanza saranno valutate e questi parametri saranno paragonati a quelli di tumori non trattati.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DELL'UNITÀ OPERATIVA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	15000	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio (borsista/assegnista, 12 mesi uomo a carico del Ministero)	20.000	20.000
3. Missioni Partecipazione a congressi Rapporti di collaborazione	5.000	5.000
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):	NULLA	NULLA
5. Materiale di consumo Materiale per colture cellulari Reagenti per biologia molecolare Reagenti per biochimica Spese di mantenimento animali	53.000	39.500
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc. Pubblicazione su riviste internazionali con IF Organizzazione convegni scientifici Organizzazione attività seminariali	3.000	3.000
7. Elaborazione dati (specificare)	NULLA	NULLA
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) calcolate come 10%	9.000	7.500
TOTALE	105.000	75.000

Gruppo di ricerca: ISTITUTO SUPERIORE DI ONCOLOGIA

responsabile scientifico: nominativo: **PARODI SILVIO**
struttura di appartenenza : **ISTITUTO SUPERIORE DI ONCOLOGIA** funzione: **MEMBRO**
indirizzo: **LAB. ONCOLOGIA SPERIMENTALE – UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA (DOBIG), VIA PASTORE, 3 - 16132, GENOVA**

N. tel: 010-35338271 N. fax: 010-35338272
indirizzo E-mail: silvio.parodi@unige.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **VECCHIO GIANCARLO**

Contributo specifico fornito al progetto (max 500 caratteri)

Scopo della nostra ricerca è trovare inibitori di due proteine-segnale importanti nel contribuire alla malignità cellulare, la cui forte cooperazione è stata riportata recentemente in topi transgenici: c-Myc e Bcl-XL. Perseguiamo quindi sia l'inibizione di c-Myc, attraverso lo sviluppo di nuove molecole peptidomimetiche e per mezzo di minianticorpi (ScFv) internalizzanti, sia la ricerca di nuovi inibitori di Bcl-XL, studiando gli effetti di un nostro potente inibitore su tumori in vivo.

metodologia (max 1000 caratteri)

Lo sviluppo di nuove molecole peptidomimetiche inibitrici di c-Myc sarà attuato attraverso considerazioni di modelling derivate dalle interazioni che intercorrono tra Myc stesso e INI1 o TIP49 rispettivamente attraverso i suoi domini carbossi- e amino-terminale. Tali molecole verranno sintetizzate per fase solida e il loro screening sarà effettuato con l'ausilio di tests ELISA, Pull-Down Assays e Fluorescence Polarization Assays.

I minianticorpi monoclonali (ScFV) anti-Myc dotati di sequenza internalizzante (INT), sviluppati in fagi filamentosi saranno prodotti sia in cellule procarioti, sia, eventualmente, in cellule eucarioti: i loro effetti saranno saggiati sia in vitro sia in vivo in linee cellulari iper-esprimenti c-Myc e successivamente in modelli animali.

La ricerca di inibitori di Bcl-XL sarà invece sviluppata attraverso lo studio degli effetti della nostra molecola dotata di attività fortemente inibitoria, già sottoposta a brevetto europeo, su tumori in piccoli roditori in vivo.

Composizione del costo dell'unità operativa

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	15000	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	38000	38000
3. Missioni Partecipazione a congressi Rapporti di collaborazione	3500	3500
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):	NULLA	NULLA
5. Materiale di consumo Materiale per colture cellulari Reagenti per biologia molecolare Reagenti per biochimica Spese di mantenimento animali	39000	24000
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc Pubblicazione su riviste internazionali con IF Organizzazione convegni scientifici Organizzazione attività seminari	2000	2000
7. Elaborazione dati (specificare)	NULLA	NULLA
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) COSTI INDIRETTI	7500	7500
TOTALE	105000	75000

MODULO 3: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUNA UNITÀ OPERATIVA

(Compilare un modulo per ciascuna UO)

UNITÀ OPERATIVA: **IRCCS FONDAZIONE SANTA LUCIA**

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **LUCA BATTISTINI**

struttura di appartenenza: **FONDAZIONE SANTA LUCIA** funzione: **MEDICO DIRIGENTE DI RICERCA**

indirizzo : **VIA DEL FOSSO DI FIORANO 63-65, 00143 ROMA**

N. tel: **06 50170 3088** N. fax: **06 50170 3326**

indirizzo E-mail: l.battistini@hsantalucia.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **MARIA ADRIANA AMADIO**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO (max 2000 caratteri)

Alla Fondazione Santa Lucia siamo equipaggiati con i più moderni citofluorimetri in grado di misurare fino a 13 parametri su ogni singola cellula, consentendo quindi lo studio dettagliato delle diverse popolazioni cellulari anche nel caso di numeri esigui di cellule isolate da tessuti. La nostra area di expertise riguarda lo studio della risposta linfocitaria e la sua regolazione in soggetti sani e in pazienti affetti da patologie autoimmuni e neoplastiche.

In questo progetto la nostra tecnologia verrà utilizzata per analizzare le caratteristiche fenotipiche e funzionali delle cellule infiltranti i tumori prostatici nell'uomo e nel topo, parallelamente allo studio dei leucociti circolanti. Inoltre sarà valutata l'azione di nuove molecole antinfiammatorie (farmaci NO-donatori) sul fenotipo e la funzione dei leucociti.

1. Studio del fenotipo:

- Markers del differenziamento linfocitario: l'infiltrato tumorale linfocitario verrà caratterizzato per valutare il potenziale citotossico dei linfociti e per misurare il livello di differenziamento raggiunto.
- Capacità migratorie: verrà analizzato il pannello delle integrine e dei recettori per le chemochine espresse dalle cellule infiltranti il tumore.
- Espressione di recettori NK: studi preliminari hanno mostrato che nei linfociti tumore-specifici è aumentata l'espressione di recettori inibitori NK.

2. Studi funzionali: l'efficacia delle nuove molecole antinfiammatorie verrà valutata misurandone l'abilità di recuperare la funzionalità dei linfociti tumore-specifici *in vitro*.

- Stato di attivazione: verrà studiata l'induzione dell'espressione di markers di attivazione linfocitaria
- Produzione di citochine: il pannello di citochine indotte dall'attivazione linfocitaria verrà valutata mediante marcatura intracellulare.
- Potenziale citotossico: verrà misurata la citotossicità nei confronti di linee tumorali umane e murine.
- Proliferazione cellulare in seguito ad attivazione policlonale.

METODOLOGIA (max 4000 caratteri)

Campioni biologici: i campioni biologici umani e murini saranno ottenuti dalle altre Unità Operative (Milano e Padova). I campioni di sangue verranno prelevati da pazienti affetti da tumore della prostata e da un gruppo di soggetti sani di controllo, previa somministrazione del modulo di consenso informato. Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) verranno isolate mediante centrifugazione su gradiente discontinuo di densità (Ficoll-hypaque). Il sangue eparinizzato prelevato dai pazienti verrà diluito con 1 volume di terreno di coltura RPMI e stratificato lentamente su Ficoll-hypaque; dopo centrifugazione per 30 minuti a 660xg, le cellule mononucleate verranno raccolte dall'interfaccia del gradiente e lavate tre volte in RPMI centrifugando nuovamente a 430g per 10 minuti. Per ciascuna marcatura verranno utilizzate 0.5×10^6 PBL, in un volume finale di 100 µl.

Preparazione e marcatura delle cellule: Gli anticorpi monoclonali, coniugati con i fluorocromi appropriati, verranno aggiunti alle concentrazioni ottimali predeterminate, e le cellule saranno incubate a 4 °C per 20-30 minuti. Le cellule verranno quindi lavate due volte, risospese in PBS, e passate al citofluorimetro per l'analisi.

Analisi citofluorimetrica: L'analisi dei campioni verrà effettuata su citofluorimetri FACSCanto (Becton Dickinson), Cyan e su Sorter MoFlo (Dako), utilizzando il software Summit e FlowJo (TreeStar) per la compensazione multiparametrica. Per ogni campione verranno selezionati da 10.000 a 100.000 linfociti in base a criteri di dimensione (FSC) e di granulosità (SSC).

Anticorpi: Verranno utilizzati i seguenti anticorpi:

- a) Markers del differenziamento linfocitario: CD45RO, CD45RA, CD62L, CD27, CD11a, CCR7, CD7, perforina (uomo); CD44, CD27, CD62L, CD11a, Ly-6C/G, perforina (topo)
- b) Capacità migratorie: integrine: α 1-6, β 1, β 7, CD103, CD104, CD11b, CD11c, CD11d, PSGL-1; recettori per le chemochine: CCR1-9, CXCR1-6 (uomo); α 4, β 1, β 7, CD103, CD11b, CD11c, CCR5, CXCR4, CCR2 (topo).
- c) Espressione di recettori NK: p50.3, p58.1, p58.2, p70, NKG2a, NGK2C, CD16, NKG2D, NKAT, NKp30, NKp44, ILT2 (uomo); NK1.1, CD16, LY49 (topo).
- d) Stato di attivazione: CD25, CD69, CD137, CD39, FoxP3 (uomo e topo);
- e) Produzione di citochine: IFN γ , TNF- α (uomo e topo)
- f) Potenziale citotossico: perforina, CD107a (uomo e topo).

Questi anticorpi sono coniugati con i seguenti fluorocromi: fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-TxRed, PE-Cy7, Allophycocyanin (APC), APC-Cy5.5, APC-Cy7, Pacific Blue, Pacific Orange.

Attivazione cellulare: Verrà misurata l'induzione dell'espressione di CD25, CD69, CD137 e CD39 in seguito ad attivazione policlonale con α CD3 e α CD28 solubile.

Produzione di citochine: le cellule verranno stimulate per 6 ore con PMA e ionomicina o con α CD3 e α CD28, aggiungendo brefeldina nelle ultime 4 ore di incubazione. Verranno poi eseguite le marcature di superficie, e le cellule verranno fissate con 2% paraformaldeide. In seguito ad incubazione con gli anticorpi anti-citochina diluiti in saponina 0,5%, le cellule verranno analizzate al FACS.

Proliferazione cellulare: Questi saggi verranno condotti in due modi: a) mediante uno standard “proliferation assay”, in cui viene misurata l'incorporazione di timidina da parte cellule proliferanti, e b) mediante colorazione delle cellule proliferanti con CFDA, un colorante che si fissa sulle membrane cellulari, e che permette di seguire il numero di divisioni cellulari in quanto dopo la mitosi le cellule contengono la metà del colorante iniziale e quindi la loro fluorescenza è la metà di quella di partenza

Studio citotossicità: Le cellule target (CT26, MBL-2, e P815 murine) vengono colorate con CFSE e incubate con le cellule effettrici per 4 h a 37°C. I campioni vengono poi marcati con 7-AAD. La lisi specifica è calcolata applicando la seguente formula:

$$\% \text{ of Specific Lysis} = \frac{100 \times (\% \text{ Sample Lysis} - \% \text{ Basal Lysis})}{100 - \% \text{ Basal Lysis}}$$

COMPOSIZIONE DEL COSTO DELL'UNITÀ OPERATIVA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	27500	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio CONTRATTISTA	40000	40000
3. Missioni	4000	4000
CONGRESSI E MISSIONI		
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):	NULLA	NULLA

5. Materiale di consumo	130000	117500
REAGENTI PER BIOLOGIA CELLULARE + ANTICORPI PURIFICATI E CONIUGATI + REAGENTI PER CITOFLUORIMETRIA		
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.	NULLA	NULLA

7. Elaborazione dati (specificare)	NULLA	NULLA

8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) 5% COSTI INDIRETTI	8500	8500
TOTALE	210000	170000

Curriculum Vitae del Responsabile Scientifico dell'Unità Operativa

(max 1 pagina)

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

Luca Battistini

EDUCAZIONE

1989 Laureato in Medicina e Chirurgia (110/110 e lode), Università di Siena
 1994 Specializzato in Neurologia Università La Sapienza di Roma
 1998 Dottorato in Fisiopatologia delle Funzioni Nervose, Università di Firenze

ESPERIENZE PROFESSIONALI DI RICERCA

1990-1992 Borsista, Istituto di Neurobiologia, Consiglio Nazionale delle Ricerche (C.N.R.), Roma.
 1993-1995 Research Associate, Dept. of Neuropathology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, N.Y., USA.
 1995-1997 Instructor (Faculty level), Department of Neurology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.
 1997-1999 Medico Ricercatore, Direttore del Laboratorio di Neuroimmunologia, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) Fondazione Santa Lucia, Roma.
 2000-oggi Dirigente Medico I livello, Direttore dell'Unità di Neuroimmunologia, Centro Europeo di Ricerca sul Cervello, Fondazione Santa Lucia, Roma.

ATTIVITÀ DIDATTICA

1995-1996-1997 Instructor of Neurology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.
 Dal 1999 Prof. Immunologia a Contratto, Università di Tor Vergata, Roma.
 Dal 2001 Prof. Neuroimmunologia a Contratto, Università di Tor Vergata, Roma.

PREMI E RICONOSCIMENTI PROFESSIONALI

- Revisore scientifico per la Società americana Sclerosi Multipla (NMSS)
- Revisore scientifico per il MIUR (PRIN e CIVR)
- Revisore scientifico per il Human Frontier Science Program (HFSP)
- Revisore scientifico per la Wellcome Trust, UK.
- Premio Rita Levi Montalcini FISM 2002

PUBBLICAZIONI SELEZIONATE (negli ultimi 5 anni)

- 1: Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Hopner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Rotzschke O, Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. **Blood**. 2007 Apr 20; [Epub ahead of print] (IF 2006:10,37)
- 2: Somma P, Ristori G, Battistini L, Cannoni S, Borsellino G, Diamantini A, Salvetti M, Sorrentino R, Fiorillo MT. Characterization of CD8+ T cell repertoire in identical twins discordant and concordant for multiple sclerosis. **J Leukoc Biol**. 2007 Mar;81(3):696-710. Epub 2006 Nov 16. (IF 2006:4,572)
- 3: Caccamo N, Battistini L, Bonneville M, Poccia F, Fournie JJ, Meraviglia S, Borsellino G, Kroczeck RA, La Mendola C, Scotet E, Dieli F, Salerno A. CXCR5 identifies a subset of Vgamma9Vdelta2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production. **J Immunol**. 2006 Oct 15;177(8):5290-5. (IF 2006: 6,293)
- 4: Lolli F, Mulinacci B, Carotenuto A, Bonetti B, Sabatino G, Mazzanti B, D'Ursi AM, Novellino E, Pazzagli M, Lovato L, Alcaro MC, Peroni E, Pozo-Carrero MC, Nuti F, Battistini L, Borsellino G, Chelli M, Rovero P, Papini AM. An N-glycosylated peptide detecting disease-specific autoantibodies, biomarkers of multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2005 Jul 19;102(29):10273-8. Epub 2005 Jul 12. (IF 2006: 9,643)
- 5: Chen L, Cencioni MT, Angelini DF, Borsellino G, Battistini L, Brosnan CF. Transcriptional profiling of gamma delta T cells identifies a role for vitD in the immunoregulation of the Vγ9Vδ2 response to phosphate-containing ligands. **J Immunol**. 2005 May 15;174(10):6144-52. (IF 2006: 6,293)
- 6: Bronte V, Kasic T, Gri G, Gallana K, Borsellino G, Marigo I, Battistini L, Iafrate M, Prayer-Galetti T, Pagano F, Viola A. **J Exp Med**. 2005 Apr 18;201(8):1257-68. Epub 2005 Apr 11. (IF 2006:14,484)
- 7: Kleinewietfeld M, Puentes F, Borsellino G, Battistini L, Rotzschke O, Falk K. CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset. **Blood**. 2005 Apr 1;105(7):2877-86. Epub 2004 Dec 21. (IF 2006:10,37)
- 8: Angelini DF, Borsellino G, Poupot M, Diamantini A, Poupot R, Bernardi G, Poccia F, Fournie JJ, Battistini L. FcγRIII discriminates between 2 subsets of Vγ9Vδ2 effector cells with different responses and activation pathways. **Blood**. 2004 Sep 15;104(6):1801-7. Epub 2004 Jun 3. (IF 2006:10,37)
- 9: Battistini L, Piccio L, Rossi B, Bach S, Galgani S, Gasperini C, Ottoboni L, Ciabini D, Caramia MD, Bernardi G, Laudanna C, Scarpini E, McEver RP, Butcher EC, Borsellino G, Constantin G. CD8+ T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: a critical role for PSGL-1. **Blood**. 2003 Jun 15;101(12):4775-82. Epub 2003 Feb 20. (IF 2006:10,37)
- 10: Giunti D, Borsellino G, Benelli R, Marchese M, Capello E, Valle MT, Pedemonte E, Noonan D, Albini A, Bernardi G, Mancardi GL, Battistini L, Uccelli A. Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. **J Leukoc Biol**. 2003 May;73(5):584-90. (IF 2006:4,572)

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

(Si devono presentare tanti moduli 3bis quanti sono i gruppi di ricerca coinvolti)

GRUPPO DI RICERCA: **UNITÀ DI NEUROIMMUNOLOGIA**

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **LUCA BATTISTINI**

struttura di appartenenza : **FONDAZIONE SANTA LUCIA** funzione: **MEDICO DIRIGENTE DI RICERCA**

indirizzo : **Via del Fosso di Fiorano 63-65, 00143 ROMA**

N. tel: **06 50170 3088** N. fax: **06 50170 3326**

indirizzo E-mail: l.battistini@hsantalucia.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **MARIA ADRIANA AMADIO**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO (max 500 caratteri)

L'Unità di neuroimmunologia effettuerà gli studi funzionali sui campioni ottenuti dalle altre Unità Operative. In particolare, verranno effettuati saggi di proliferazione cellulare in seguito ad attivazione policlonale, saggi di citotossicità contro linee tumorali, e verrà determinato il profilo citochinico dei linfociti tumore-specifici.

METODOLOGIA (max 1000 caratteri)

Produzione di citochine: le cellule verranno stimulate per 6 ore con PMA e ionomicina o con α CD3 e α CD28, aggiungendo brefeldina nelle ultime 4 ore di incubazione. Verranno poi eseguite le marcature di superficie, e le cellule verranno fissate con 2% paraformaldeide. In seguito ad incubazione con gli anticorpi anti-citochina diluiti in saponina 0,5%, le cellule verranno analizzate al FACS.

Proliferazione cellulare: Questi saggi verranno condotti in due modi: a) mediante uno standard “proliferation assay”, in cui viene misurata l'incorporazione di timidina da parte cellule proliferanti, e b) mediante colorazione delle cellule proliferanti con CFDA, un colorante che si fissa sulle membrane cellulari, e che permette di seguire il numero di divisioni cellulari in quanto dopo la mitosi le cellule contengono la metà del colorante iniziale e quindi la loro fluorescenza è la metà di quella di partenza

Studio citotossicità: Le cellule target (CT26, MBL-2, e P815 murine) vengono colorate con CFSE e incubate con le cellule effettrici per 4 h a 37°C. I campioni vengono poi marcati con 7-AAD.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	12500	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio CONTRATTISTA	40000	40000
3. Missioni	2000	2000
CONGRESSI E MISSIONI		
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):	NULLA	NULLA

5. Materiale di consumo	56000	43500
REAGENTI PER BIOLOGIA CELLULARE + ANTICORPI PURIFICATI E CONIUGATI + REAGENTI PER CITOFUORIMETRIA		
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.	NULLA	NULLA

7. Elaborazione dati (specificare)	NULLA	NULLA

8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)	4500	4500
5% COSTI INDIRETTI		
TOTALE	115000	90000

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

(Si devono presentare tanti moduli 3bis quanti sono i gruppi di ricerca coinvolti)

GRUPPO DI RICERCA: **UNITA' DI CITOFUORIMETRIA**

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **GIOVANNA BORSELLINO**

struttura di appartenenza : **FONDAZIONE SANTA LUCIA** funzione: **MEDICO DIRIGENTE DI RICERCA**

indirizzo : **Via del Fosso di Fiorano 63-65, 00143 ROMA**

N. tel: **06 50170 3073** N. fax: **06 50170 3326**

indirizzo E-mail: G.BORSELLINO@hsantalucia.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **MARIA ADRIANA AMADIO**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO (max 500 caratteri)

L'unità di Citofluorimetria effettuerà le analisi di citofluorimetria multiparametrica sui campioni di cellule infiltranti i tumori prostatici umani e murini ottenuti dalle altre Unità Operative. Saranno utilizzati anticorpi diretti contro oltre 200 antigeni di superficie ed intracellulari coniugati con 11 diversi fluorocromi. Sarà quindi possibile caratterizzare nel dettaglio il fenotipo e le caratteristiche funzionali dei linfociti tumore-specifici.

METODOLOGIA (max 1000 caratteri)

Analisi citofluorimetrica: L'analisi dei campioni verrà effettuata su 3 diversi citofluorimetri: MoFlo (Dako) :13 parametri su singola cellula; Cyan (11 parametri) e FACSCanto (8 parametri). I dati verranno analizzati con FlowJo.

Anticorpi:

- a) Markers del differenziamento linfocitario: CD45RO, CD45RA, CD62L, CD27, CD11a, CCR7, CD7, perforina (uomo); CD44, CD27, CD62L, CD11a, Ly-6C/G, perforina (topo)
- b) Capacità migratorie: integrine: α 1-6, β 1, β 7, CD103, CD104, CD11b, CD11c, CD11d, PSGL-1; recettori per le chemochine: CCR1-9, CXCR1-6 (uomo); α 4, β 1, β 7, CD103, CD11b, CD11c, CCR5, CXCR4, CCR2 (topo).
- c) Espressione di recettori NK: p50.3, p58.1, p58.2, p70, NKG2a, NGK2C, CD16, NKG2D, NKAT, NKp30, NKp44, ILT2 (uomo); NK1.1, CD16, LY49 (topo).
- d) Stato di attivazione: CD25, CD69, CD137, CD39, FoxP3 (uomo e topo);
- e) Produzione di citochine: IFN γ , TNF- α (uomo e topo)
- f) Potenziale citotossico: perforina, CD107a (uomo e topo).

Questi anticorpi sono coniugati con i seguenti fluorocromi: FITC PE, PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-TxRed, PE-Cy7, APC, APC-Cy5.5, APC-Cy7, Pacific Blue, Pacific Orange.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	15000	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	NULLA	NULLA
3. Missioni	2000	2000
CONGRESSI E MISSIONI		
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):	NULLA	NULLA
5. Materiale di consumo	74000	74000
REAGENTI PER BIOLOGIA CELLULARE + ANTICORPI PURIFICATI E CONIUGATI + REAGENTI PER CITOFUORIMETRIA		
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.	NULLA	NULLA
7. Elaborazione dati (specificare)	NULLA	NULLA
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)	4000	4000
5% COSTI INDIRETTI		
TOTALE	95000	80000

MODULO 3: DESCRIZIONE DEL CONTRIBUTO DI CIASCUNA UNITÀ OPERATIVA

(Compilare un modulo per ciascuna UO)

UNITÀ OPERATIVA: IRCCS Istituto Clinico Humanitas – Humanitas Mirasole SpA

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: Antonella Viola

struttura di appartenenza : IRCCS Istituto Clinico Humanitas – Humanitas Mirasole SpA

funzione: Ricercatore, Capo Laboratorio

indirizzo : via Manzoni 56, 20089 Rozzano, Milano

N. tel: 02.82245118 N. fax: 02.82245101

indirizzo E-mail: antonella.viola@humanitas.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: Ivan Michele Colombo

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO (max 2000 caratteri)

Compito di questa Unità sarà quello di valutare l'effetto dei farmaci NO-donatori sul microambiente tumorale. Il gruppo di ricerca della Dr. Viola ha infatti identificato per la prima volta il meccanismo di immunosoppressione basato su NOS e ARG in pazienti affetti da carcinoma della prostata, mentre il gruppo del Dr. Sica studia da anni la stretta connessione tra meccanismi di soppressione infiammatori e la carcinogenesi. I gruppi dell'Humanitas valuteranno quindi l'effetto dei farmaci sulle componenti cellulari e molecolari dell'immunità innata (gruppo Sica) e adattativa (gruppo Viola). Inoltre, i due gruppi collaboreranno nell'identificazione di nuovi meccanismi di regolazione negativa del sistema immunitario attivi nell'ambiente infiammatorio e tumorale. Sempre nel microambiente tumorale, i gruppi dell'IFOM e dell'IEO studieranno l'effetto degli NO-dona donatori sulla proliferazione dei vasi ematici e linfatici attraverso un largo repertorio di anticorpi contro marcatori specifici; inoltre, il gruppo della Dr. Dejana valuterà l'effetto di questi composti sul controllo della permeabilità vascolare dei vasi intratumorali e della infiltrazione delle cellule infiammatorie. Inoltre, verranno studiate nuove molecole coinvolte nell'angiogenesi come strumenti di classificazione diagnostica e target di intervento terapeutico (gruppo Bertolini).

METODOLOGIA (max 4000 caratteri)

Valutazione dell'infiltrato infiammatorio/soppressorio

Lo studio si avvarrà di recenti evidenze che identificano i pathway di p50 NF-κB e IRF-3/STAT1 come centrali nel controllo del fenotipo pro-tumorale di popolazioni soppressive mieloidi, macrofagi-associati a tumore (TAM) e cellule mieloidi soppressive (MDSC). In particolare, verrà analizzato il ruolo di p50 NF-κB e IRF-3/STAT1 nella modulazione di pathway soppressori mediati da arginasi (ARG) e ossido nitrico sintetasi (NOS). Topi p50 -/- e IRF-3 -/- verranno utilizzati per indagare la suscettibilità a sviluppare tumori del tratto gastro-intestinali mediante la somministrazione di destrano (DSS) e azossimetano (AOM), al fine di promuovere circuiti infiammatori associati a cancerogenesi del tratto gastrointestinale.. La crescita e progressione tumorale verrà monitorata periodicamente. Popolazioni mieloidi TAM e MDSC verranno purificate da organi linfoidi e dal tumore e analizzate per l'espressione di mediatori dell'infiammazione, mediante approccio genomico (piattaforma Affimetrix) e proteomico. La validazione dei risultati verrà eseguita su popolazioni mieloidi purificate mediante RealTime PCR, ELISA, e in sito mediante immunistoichimica.

Valutazione dell'infiltrato linfocitario

Lo studio su tessuti umani sarà effettuato grazie ad una tecnica di coltura tridimensionale di tessuti prostatici, prelevati da pazienti sottoposti a prostatectomia radicale, che permette di studiare le interazioni sistema immunitario-tumore e l'attivazione linfocitaria nel microambiente tumorale. Sarà analizzato l'effetto dei farmaci sui linfociti T infiltranti il tumore, valutando su queste cellule l'espressione di marcatori di attivazione e il rilascio di granuli citotossici. La capacità dei farmaci di ridurre la presenza di perossinitriti nell'ambiente tumorale sarà valutata mediante tecniche di immunistoichimica e citofluorimetria, utilizzando anticorpi anti-nitrotirosine. L'effetto dei perossinitriti su citochine e chemochine sarà studiato esponendo queste proteine a donatori di perossinitriti e andando a valutare la loro funzionalità in esperimenti di proliferazione e migrazione cellulare. L'eventuale modifica in vitro ed in vivo delle proteine sarà studiata mediante tecniche di proteomica.

Valutazione dell'angio e linfangiogenesi tumorale

Questo studio sarà effettuato grazie ad un ampio set di anticorpi monoclonali che sono stati sviluppati e caratterizzati in precedenza. Gli anticorpi sono diretti contro : VE-caderina, PECAM, CD34, CD146/S-Endo-1, VEGF-R1 and VEGFR-2, JAM-A, claudin-5, integrin α 5 β 3 che riconoscono tutti i tipi di vasi; ICAM-2 che riconosce preferenzialmente i vasi sanguigni e Lyve, podoplanin, VEGFR3, Prox-1 che riconoscono i vasi linfatici. Questi anticorpi verranno testati in immunistochimica su sezioni di tessuto tumorale e non.

Inoltre, si utilizzeranno una serie di marcatori surrogati che si sono rivelati efficaci nel identificare a livello preclinici e clinico la dose biologica ottimale (DBO) di una serie di farmaci molecolari ad attività anti-angiogenica (vedi Bertolini et al, Nat Rev cancer 2006). Questo pannello comprende la determinazione in citofluorimetria delle cellule endoteliali circolanti (CEC), dei progenitori endoteliali circolanti (CEP) e di alcuni trascritti codificanti geni endotelio-specifici come CD144 (VE-Caderina), e pericito-specifici come RGS-5. Nel corso del presente progetto questo pannello sarà ampliato con l'introduzione di nuovi marcatori surrogati come i monociti esprimenti Tie2 (TEM), i progenitori VEGFR3+ del sistema linfangiogenico (PL) ed alcuni trascritti linfangio-specifici. Il nuovo pannello sarà validato in ambito preclinico e clinico in termini di potere diagnostico, predittivo e di stratificazione dei pazienti oncologici trattati con farmaci in grado di controllare ARG e/o NOS.

Valutazione della permeabilità dei vasi tumorali

La permeabilità verrà valutata sia con Blue di Evans che con un ampio set di destrani a diverso peso molecolare. La fuoriuscita di questi marcatori dai vasi del tumore verrà quindi valutata sia sull'estratto totale del tumore che con metodi istochimici su sezioni di tessuto.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DELL'UNITÀ OPERATIVA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	<u>€ 105.000,00</u>	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	<u>€ 264.000,00</u>	<u>€ 138.000,00</u>
3. Missioni	<u>€ 33.000,00</u>	<u>€ 23.000,00</u>
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):	<u>€ 20.000,00</u>	<u>€ 20.000,00</u>
5. Materiale di consumo	<u>€ 285.500,00</u>	<u>€ 251.500,00</u>
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.	<u>€ 5.000,00</u>	<u>€ 5.000,00</u>
7. Elaborazione dati (specificare)		
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)	<u>€ 92.500,00</u>	<u>€ 57.500,00</u>
TOTALE	<u>€ 805.000,00</u>	<u>€ 495.000,00</u>

Curriculum Vitae del Responsabile Scientifico dell'Unità Operativa

Luogo e data di nascita: Taranto, 3 Maggio 1969

Formazione:

1991: Laurea in Scienze Biologiche presso l'Università di Padova (voti: 110/110 e lode).

1995: Dottorato di ricerca in Biologia Evoluzionistica, Università di Padova

Esperienze di lavoro:

1991-1995: Dottorato di ricerca presso il Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova

1995-1999: Membro Scientifico del “Basel Institute for Immunology”, Basilea, Svizzera.

1999-2000: Membro scientifico dell'EMBL di Monteotondo, Roma, Italia.

Dal 2001: Group Leader presso l'Istituto Veneto di Medicina Molecolare, Padova, Italia.

2002-2007: Ricercatore presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Padova.

Dal 2003: Membro del Comitato Editoriale di Immunology Letters.

Dal 2006: Membro del Comitato Editoriale di Cell Adhesion and Migration.

Dal 2006: Group Leader presso l'Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (MI), Italia.

Dal 2007: Ricercatore presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Milano.

Premi:

2005: Cancer Research Institute Investigator Award (New York, USA).

2006: EMBO Young Investigator

Pubblicazioni (maggiormente rappresentative su un totale di 37):

- **Viola & A. Lanzavecchia.** 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*, 273: 104 (IF: 30.927).
- **A. Viola, M. Salio, L. Tuosto, S. Linkert, O. Acuto & A. Lanzavecchia.** 1997. Quantitative contribution of CD4 and CD8 to T cell antigen receptor serial triggering. *The Journal of Experimental Medicine*, 186: 1775. (IF: 13,965)
- **A. Lanzavecchia, G. Iezzi & A. Viola.** 1999. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behaviour. *Cell*, 96:1. (IF: 29,431)
- **A. Viola, S. Schroeder, Y. Sakakibara & A. Lanzavecchia.** 1999. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science*, 283: 680. (IF: 30.927).
- **M. F. Bachmann, A. Gallimore, S. Linkert, V. Cerundolo, A. Lanzavecchia, M. Kopf & A. Viola.** 1999. Developmental regulation of Lck-targeting to the CD8 coreceptor controls signaling in naive and memory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 189: 1521-9. (IF: 13,965)
- **P. Pizzo and A. Viola.** 2003 Lymphocyte lipid rafts: structure and functions. *Current Opinion in Immunology*, 15:255-60. (IF: 9,103)
- **R. Zambello, A. Cabrelle, L. Trentin, C. Agostini, G. Semenzato and A. Viola.** 2004. The raft marker GM1 distinguishes functional subsets of Granular Lymphocytes in patients with CD3⁺ Lymphoproliferative Disease of Granular Lymphocytes. *Leukemia*, 18:771-6. (IF: 6,612)
- **P. Pizzo and A. Viola.** 2004. Lipid rafts in lymphocyte activation. *Microbes and Infection*, 6:682-92. (IF: 3,154)
- **R. Tavano, G. Gri, B. Molon, B. Marinari, C.E. Rudd, L. Tuosto and A. Viola.** 2004. CD28 and lipid rafts coordinate recruitment of Lck to the immunological synapse of human T lymphocytes”. *The Journal of Immunology*, 173:5392-5397. (IF: 6,387)
- **V. Bronte, T. Kasic, G. Gri, K. Gallana, G. Borsellino, I. Marigo, L. Battistini, M. Iafrate, T. Prayer-Galetti, F. Pagano and A. Viola.** 2005. Boosting anti-tumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *The Journal of Experimental Medicine*, 201:1257-68. (IF: 13,965)
- **B. Molon, G. Gri, M. Bettella, C. Goumez-Mouton, A. Lanzavecchia, C. Martinez-A, S. Manes and A. Viola.** 2005. T cell costimulation by chemokine receptors. *Nature Immunology*, 6:465-71. (IF: 27,011)
- **Viola, R. Contento and B. Molon.** 2006. T cells and their partners: the chemokine dating agency. *Trends in Immunology*, 27:421-427. (IF: 10,174)
- **R. Tavano, S.J. Baranda, M. Soligo, L. Tuosto, S. Manes and A. Viola.** 2006. CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T cell immunological synapse *Nature Cell Biology*, 8:1270-1276. (IF: 19,717)
- **S. Mayor, A. Viola, R.V. Stan and M.A. del Pozo.** 2006. Flying kites on slippery slopes at Keystone. *EMBO Reports*, 7:1089-1093. (IF: 7,663)
- **S. Campello, R.A. Lacalle, M. Bettella, S. Manes, L. Scorrano and A. Viola.** 2006. Orchestration of leukocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics. *The Journal of Experimental Medicine*, 203: 2879-2886. (IF: 13,965)
- **V. Bronte and A. Viola.** 2007. Metabolic mechanisms of cancer-induced inhibition of immune responses. *Seminars in Cancer Biology*, in press. (IF: 7.990)
- **A.D. Luster and A. Viola.** 2008. Chemokines and Their Receptors: Drug Targets in
- **Immunity and Inflammation. Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, in pres. (IF: 19.833).
- **N. Gupta and A. Viola.** 2007. Tether and Trap: Regulation of membrane microdomains by actin-binding proteins. *Nature Reviews Immunology*, in press. (IF: 30.458).

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

(Si devono presentare tanti moduli 3bis quanti sono i gruppi di ricerca coinvolti)

GRUPPO DI RICERCA: _____ **Immunità Adattativa, Istituto Clinico Humanitas IRCCS** _____

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: _____ **Antonella Viola** _____

struttura di appartenenza : _____ **IRCCS Istituto Clinico Humanitas – Humanitas Mirasole SpA** _____

funzione: _____ **Ricercatore, Capo Laboratorio** _____

indirizzo : _____ **via Manzoni 56, 20089 Rozzano, Milano** _____

N. tel: _____ **02.82245118** _____ N. fax: _____ **02.82245101** _____

indirizzo E-mail: _____ **antonella.viola@humanitas.it** _____

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: _____ **Ivan Michele Colombo** _____

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO (max 500 caratteri)

Il gruppo di ricerca ha identificato per la prima volta il meccanismo di immunosoppressione basato su NOS e ARG in pazienti affetti da carcinoma della prostata. La validazione dei farmaci dovrà quindi avvenire prima di tutto su tessuti umani e il gruppo di ricerca si occuperà di studiare l'effetto dei farmaci sulle colture d'organo di prostata umana. Inoltre, il gruppo si occuperà di caratterizzare le alterazioni causate dalle specie reattive di ossigeno e azoto nel microambiente tumorale in tessuti umani e in modelli murini.

METODOLOGIA (max 1000 caratteri)

Negli ultimi anni abbiamo perfezionato una tecnica di coltura tridimensionale di tessuti prostatici, prelevati da pazienti sottoposti a prostatectomia radicale, che ci permette di studiare le interazioni sistema immunitario-tumore e l'attivazione linfocitaria nel microambiente tumorale. Ci occuperemo di studiare l'effetto dei farmaci sui linfociti T infiltranti il tumore, valutando su queste cellule l'espressione di marcatori di attivazione e il rilascio di granuli citotossici. Valuteremo la capacità dei farmaci di ridurre la presenza di perossinitriti nell'ambiente tumorale mediante tecniche di immunoistochimica e citofluorimetria, utilizzando anticorpi anti-nitrotirosine. L'effetto dei perossinitriti su citochine e chemochine sarà studiato esponendo queste proteine a donatori di perossinitriti e andando a valutare la loro funzionalità in esperimenti di proliferazione e migrazione cellulare. L'eventuale modifica in vitro ed in vivo delle proteine sarà studiata mediante tecniche di proteomica.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente _____ _____ _____	_____	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio _____ _____ _____	<u>€ 165.000,00</u>	<u>€ 90.000,00</u>
3. Missioni _____ _____ _____	<u>€ 30.000,00</u>	<u>€ 20.000,00</u>
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing): _____ _____ _____	<u>€ 20.000,00</u>	<u>€ 20.000,00</u>
5. Materiale di consumo _____ _____ _____	<u>€ 87.500,00</u>	<u>€ 87.500,00</u>
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc. _____ _____ _____	<u>€ 5.000,00</u>	<u>€ 5.000,00</u>
7. Elaborazione dati (specificare) _____ _____ _____	_____	_____
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare) _____ _____ _____	<u>€ 25.000,00</u>	<u>€ 25.000,00</u>
TOTALE	<u>€ 332.500,00</u>	<u>€ 247.500,00</u>

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

(Si devono presentare tanti moduli 3bis quanti sono i gruppi di ricerca coinvolti)

GRUPPO DI RICERCA: Laboratorio di Immunologia Molecolare, Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (MI)

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: Antonio Sica

struttura di appartenenza : IRCCS Istituto Clinico Humanitas – Humanitas Mirasole SpA

funzione: Ricercatore, Capo laboratorio

indirizzo : via Manzoni 56, 20089 Rozzano, Milano

N. tel: 02 8224 5111 N. fax: 02 8224 5101

indirizzo E-mail: antonio.sica@humanitas.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: Ivan Michele Colombo

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO (max 500 caratteri)

Evidenze sperimentali e cliniche attribuiscono ai circuiti immuno-soppressori espressi dai leucociti associati a tumore un ruolo primario nella progressione tumorale. Obiettivo principale dell'unità è l'identificazione di nuovi circuiti e molecole che promuovono l'attivazione dei pathway soppressori di arginasi (ARG) e ossido nitrico sintetasi (NOS) nelle cellule mieloidi, durante la crescita tumorale. Il potenziale terapeutico dei nuovi target identificati nello studio verrà valutato in modelli preclinici di neoplasia e in associazione con composti NO-donatori, in grado di controllare le attività ARG e/o NOS.

METODOLOGIA (max 1000 caratteri)

Lo studio si avvarrà di nostre recenti evidenze che identificano i pathway di p50 NF- κ B e IRF-3/STAT1 come centrali nel controllo del fenotipo pro-tumorale di popolazioni soppressive mieloidi, macrofagi-associati a tumore (TAM) e cellule mieloidi soppressive (MDSC). In particolare, verrà analizzato il ruolo di p50 NF- κ B e IRF-3/STAT1 nella modulazione di pathway soppressori mediati da arginasi (ARG) e ossido nitrico sintetasi (NOS). Topi p50 -/- e IRF-3 -/- verranno utilizzati per indagare la suscettibilità a sviluppare tumori del tratto gastro-intestinali mediante la somministrazione di destrano (DSS) e azossimetano (AOM), al fine di promuovere circuiti infiammatori associati a cancerogenesi del tratto gastrointestinale. Composti NO donatori verranno utilizzati in vitro ed in vivo, in questi modelli murini, al fine di valutarne l'efficacia terapeutica in condizioni di blocco selettivo di pathway soppressori. La crescita e progressione tumorale verrà monitorata periodicamente. Popolazioni mieloidi TAM e MDSC verranno purificate da organi linfoidi e dal tumore e analizzate per l'espressione di mediatori dell'infiammazione, mediante approccio genomico (piattaforma Affimetrix) e proteomico. La validazione dei risultati verrà eseguita su popolazioni mieloidi purificate mediante RealTime PCR, ELISA, e in sito mediante immunoistochimica.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	<u>€ 40.000,00</u>	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	<u>€ 30.000,00</u>	<u>€ 30.000,00</u>
3. Missioni	<u>€ 3.000,00</u>	<u>€ 3.000,00</u>
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):		
5. Materiale di consumo	<u>€ 82.000,00</u>	<u>€ 82.000,00</u>
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.		
7. Elaborazione dati (specificare)		
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)	<u>€ 12.500,00</u>	<u>€ 12.500,00</u>
TOTALE	<u>€ 167.500,00</u>	<u>€ 127.500,00</u>

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

(Si devono presentare tanti moduli 3bis quanti sono i gruppi di ricerca coinvolti)

GRUPPO DI RICERCA: Laboratorio di Emato-Oncologia, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: Dott. Francesco Bertolini

struttura di appartenenza : Istituto Europeo di Oncologia funzione: Direttore di Unità

indirizzo : Via Ripamonti, 435 - 20141 Milano

N. tel: 02/57489535 N. fax: 02/57489537

indirizzo E-mail: francesco.bertolini@ieo.it

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: Dr. Carlo Ciani

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO (max 500 caratteri)

La terapia molecolare del cancro inizia a offrire risultati clinicamente significativi. Tuttavia, i meccanismi che governano la risposta a questi nuovi farmaci sono estremamente complessi e – con ogni probabilità – finemente regolati con importanti differenze tra paziente e paziente. Per questo motivo – e per la necessità di ottimizzare la spesa sanitaria - appare sempre più necessario individuare il farmaco più appropriato per ogni singolo paziente.

Il contributo al progetto di questo gruppo di ricerca consisterà quindi nell’identificare e validare nuovi marcatori predittivi di risposta alla terapia con farmaci in grado di controllare ARG e/o NOS.

METODOLOGIA (max 1000 caratteri)

Questo gruppo di ricerca ha sviluppato nel corso dell’ultimo quinquennio una serie di marcatori surrogati che si sono rivelati efficaci nel identificare a livello preclinici e clinico la dose biologica ottimale (DBO) di una serie di farmaci molecolari ad attività anti-angiogenica (vedi Bertolini et al, Nat Rev cancer 2006). Questo pannello comprende la determinazione in citofluorimetria delle cellule endoteliali circolanti (CEC), dei progenitori endoteliali circolanti (CEP) e di alcuni trascritti codificanti geni endotelio-specifici come CD144 (VE-Caderina), e pericito-specifici come RGS-5. Nel corso del presente progetto questo pannello sarà ampliato con l’introduzione di nuovi marcatori surrogati come i monociti esprimenti Tie2 (TEM), i progenitori VEGFR3+ del sistema linfangiogenico (PL) ed alcuni trascritti linfangio-specifici. Il nuovo pannello sarà validato in ambito preclinico e clinico in termini di potere diagnostico, predittivo e di stratificazione dei pazienti oncologici trattati con farmaci in grado di controllare ARG e/o NOS.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	<u>€ 40.000,00</u>	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	<u>€ 18.000,00</u>	<u>€ 18.000,00</u>
3. Missioni		
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):		
5. Materiale di consumo	<u>€ 50.000,00</u>	<u>€ 32.000,00</u>
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.		
7. Elaborazione dati (specificare)		
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)	<u>€ 21.600,00</u>	<u>€ 10.000,00</u>
TOTALE	<u>€ 129.600,00</u>	<u>€ 60.000,00</u>

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

(Si devono presentare tanti moduli 3bis quanti sono i gruppi di ricerca coinvolti)

GRUPPO DI RICERCA: **IFOM Fondazione Istituto FIRC di Oncologia Molecolare**

RESPONSABILE SCIENTIFICO: nominativo: **Prof.ssa Elisabetta Dejana**

struttura di appartenenza : **IFOM Fondazione Istituto FIRC di Oncologia Molecolare** funzione: **Group Leader**

indirizzo : **Via Adamello, 16 – 20139 Milano**

N. tel: **02/574303234** N. fax: **02/574303231**

indirizzo E-mail: **elisabetta.dejana@ifom-ieo-campus.it**

RAPPRESENTANTE LEGALE: nominativo: **Prof. Giuseppe Della Porta**

CONTRIBUTO SPECIFICO FORNITO AL PROGETTO (max 500 caratteri)

Questa Unità lavorerà sull'effetto dei composti NO-donatori:

- 1) sulla angio e linfangiogenesi tumorale

A questo scopo nei tumori murini sperimentali selezionati in questo studio si valuterà la densità di vascolarizzazione con l'uso di anticorpi specifici contro endotelio linfatico e ematico.

- 2) sulla permeabilità dei vasi tumorali

Questo verrà valutato in vivo con l'uso di marcatori a diverso peso molecolare e la misura della loro fuoriuscita dal circolo.

METODOLOGIA (max 1000 caratteri)

Valutazione dell'angio e linfangiogenesi tumorale

Questa Unità ha a disposizione un ampio set di anticorpi monoclonali che sono stati sviluppati e caratterizzati in precedenza. Gli anticorpi sono diretti contro : VE-caderina, PECAM, CD34, CD146/S-Endo-1, VEGF-R1 and VEGFR-2, JAM-A, claudin-5, integrin α v β 3 che riconoscono tutti i tipi di vasi; ICAM-2 che riconosce preferenzialmente i vasi sanguigni e Lyve, podoplanin, VEGFR3, Prox-1 che riconoscono i vasi linfatici.

Questi anticorpi verranno testati in immunoistochimica su sezioni di tessuto tumorale e non.

Permeabilità dei vasi tumorali

Come dalla esperienza raccolta in precedenza, la permeabilità verrà valutata sia con Blue di Evans che con un ampio set di destrani a diverso peso molecolare. La fuoriuscita di questi marcatori dai vasi del tumore verrà quindi valutata sia sull'estratto totale del tumore che con metodi istochimici su sezioni di tessuto.

COMPOSIZIONE DEL COSTO DEL GRUPPO DI RICERCA

<u>Voci di costo e breve descrizione</u>	<u>Totale</u>	<u>di cui a carico dei fondi ministeriali</u>
1. Personale dipendente	<u>€ 25.000,00</u>	NULLA
2. Personale a contratto/consulenza/borsa di studio	<u>€ 51.000,00</u>	
3. Missioni		
4. Attrezzature (solo a noleggio o leasing):		
5. Materiale di consumo	<u>€ 66.000,00</u>	<u>€ 50.000,00</u>
6. Pubblicazioni / organizzazione convegni, ecc.		
7. Elaborazione dati (specificare)		
8. Spese generali delle strutture coinvolte (specificare)	<u>€ 28.400,00</u>	<u>€ 10.000,00</u>
TOTALE	<u>€ 170.400,00</u>	<u>€ 60.000,00</u>