

Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca
Direzione Generale per il coordinamento e lo sviluppo e della ricerca
Ufficio III

Rendiconto di spesa Fondi 5 per mille **ANNO 2018**
Enti della Ricerca Scientifica

Ente¹: Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori "Dino Amadori", IRST IRCCS
Codice fiscale: **03154520401**
Indirizzo sede legale: **Via Maroncelli 40, 47014 Meldola (FC)**
Referenti (nominativo, telefono, e.mail) **ANNALISA VOLPI, tel. 0543 739267, mail**
annalisa.volpi@irst.emr.it / ufficio.ricerca@irst.emr.it

Attività: Studio dei meccanismi radiobiologici finalizzato all'ottimizzazione della terapia radiante

La radioterapia, assieme alla chirurgia, e alla chemioterapia rappresenta uno dei trattamenti più efficaci per la cura dei pazienti affetti da tumore. Si stima infatti che circa la metà di tutti i pazienti oncologici riceverà cure radioterapiche durante il loro percorso clinico. Mentre la chirurgia rappresenta la forma primaria di trattamento per molti tipi di tumore in fase precoce, la radioterapia fornisce buoni risultati nel lungo periodo, nel controllo di neoplasie quali i tumori della testa e del collo, del polmone, della cervice, della prostata, della vescica e della pelle. Inoltre in aggiunta al suo ruolo terapeutico/curativo, molti pazienti oncologici, in stadio avanzato, traggono vantaggio dalla palliazione indotta dalla radioterapia, ad esempio, contro il dolore da metastasi ossee.

Data l'importanza assunta dalla radioterapia nella lotta ai tumori, considerevoli sforzi si stanno facendo per migliorarne i risultati tramite l'innalzamento degli standard delle dosi prescritte e rilasciate, il miglioramento nella distribuzione delle dosi irradiate, l'integrazione delle immagini-guida durante i trattamenti di rilascio giornaliero, lo sfruttamento delle nuove scoperte in radiobiologia. In particolare la radiobiomica è un'area multidisciplinare della scienza, che si propone di studiare, utilizzando le più avanzate tecniche di tipo biomolecolare, le modalità di interazione e gli effetti sugli organismi viventi, delle radiazioni ionizzanti. Questa particolare area della ricerca coinvolge differenti figure professionali quali il biologo, il fisico e il medico clinico. L'approccio multidisciplinare alla materia, risponde all'esigenza di dare un razionale scientifico ai dati di osservazione raccolti nella pratica clinica e per fornire elementi di congiunzione e integrazione tra le diverse metodologie conoscitive impegnate in quest'ambito della ricerca. Ricerca che, come da *mission* istituzionale dell' IRST di Meldola, sarà volta a trovare una trasposizione immediata dei risultati nel campo della sperimentazione clinica.

Il progetto si articola in 7 workpackages (WPs) di seguito descritti.

WP1. Progetto Glioblastoma

Il Glioblastoma umano (hGBM) rappresenta il tumore cerebrale primitivo più comune e temibile. Misure preventive come cambiamenti dello stile di vita, sono inefficaci nel prevenire questa forma di neoplasia. La diagnosi precoce e il tipo di trattamento non impattano sulla sopravvivenza, precludendo l'utilità dei programmi di screening per il

¹ Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

glioblastoma. L'attuale trattamento standard è rappresentato da un approccio multimodale che combina la neurochirurgia, la radioterapia in regime di frazionamento convenzionale (60 Gy erogati in 30 frazioni) e la chemioterapia a base di temozolomide. Sfortunatamente, praticamente tutti i pazienti vanno incontro a recidiva entro 7-10 mesi dal termine del trattamento di prima linea. Inoltre, nessuno dei trattamenti alternativi ad oggi disponibili (quali un secondo ciclo di terapia a base di temozolomide, bevacizumab, carmustine, lomustina o carboplatino) ha dimostrato di migliorare il tempo di sopravvivenza o di apportare un qualche beneficio ai pazienti. La mancanza di un trattamento realmente efficace giustifica pertanto la ricerca di nuovi approcci terapeutici e di trattamenti personalizzati sulle caratteristiche biomolecolari dei pazienti. Questo WP in particolare si occuperà di:

- a. *Disegno di schemi di trattamento che prevedono l'uso del trattamento radiante in associazione con la chemioterapia convenzionale e/o con nuove molecole radio-sensibilizzanti*

I meccanismi di interazione tra radio e chemioterapia possono comportare danni al DNA concomitanti, ridotta capacità di riparazione nelle cellule tumorali e la sincronizzazione in fasi radiosensibili del ciclo cellulare nelle cellule tumorali colpite. I ricercatori del laboratorio di Radiobiomics & Drug Discovery saranno pertanto impegnati nella caratterizzazione di nuovi approcci terapeutici volti a potenziare l'effetto citotossico della radioterapia sulle cellule tumorali testando chemioterapici convenzionali e/o nuove molecole radiosensibilizzanti su colture primarie ottenute da pazienti affetti da hGBM. Si cercherà inoltre di attivare collaborazioni con differenti case farmaceutiche internazionali per selezionare potenziali nuovi farmaci radio-sensibilizzanti per il trattamento del glioblastoma.

- b. *Valutazione preclinica del ruolo radiosensibilizzante della medicina iperbarica*

Questa fase dello studio condotto in collaborazione con il Centro Iperbarico di Ravenna prevede di studiare a livello preclinico come differenti condizioni di ossigenazione (ipossia, normossia e iperossia) possano influire sull'efficacia dei trattamenti radianti in modelli sperimentali di glioblastoma umano.

La condizione di ipossia si riscontra molto frequentemente nei tumori solidi ed è dovuta alla rapida proliferazione delle cellule tumorali e/o a un insufficiente apporto di ossigeno. In tale condizione le cellule localizzate alla periferia del tumore in prossimità dei vasi sanguigni continuano a ricevere un adeguato rifornimento di ossigeno e nutrienti, mentre le cellule tumorali situate negli strati più profondi della massa neoplastica risultano essere troppo distanti dai vasi sanguigni per poter sopravvivere e spesso vanno in necrosi o apoptosi. Tuttavia una porzione di cellule localizzate tra la periferia e la parte più profonda del tumore trovandosi in uno stato di moderata ipossia, riesce a sopravvivere e entrare in una fase dormiente tramite adattamento al microambiente ipossico. Queste cellule diventano più maligne e resistenti ai trattamenti chemio- e/o radio-terapici, entrambi maggiormente efficaci sulle cellule in attiva proliferazione. Queste cellule tumorali "dormienti" rivestiranno un ruolo molto importante nella progressione e ripresa di malattia. Per questo motivo cercare di ridurre le aree ipossiche del tumore in concomitanza dei trattamenti radio- chemioterapici potrebbe costituire una valida approccio per ridurre il rischio di ripresa e/o progressione della malattia. HBO è in grado di aumentare la concentrazione e la pressione di ossigeno oltre che di aumentarne la percentuale di diffusione nei

tessuti tumorali. In teoria quindi un simile trattamento impedirebbe alle cellule tumorali di entrare nella fase di "dormienza", di rimanere attivamente proliferanti e quindi sensibili ai trattamenti radio- chemioterapici. Scopo della collaborazione tra Centro Iperbarico e la unit di Radiobiomics & Drug Discovery sarà quello di fornire un razionale scientifico per futuri trials clinici su paziente che prevedano l'utilizzo del trattamento con ossigeno iperbarico in combinazione con radioterapia.

c. Isolamento e caratterizzazione di cellule staminali tumorali di glioblastoma umano a partire da prelievi tissutali tumorali da paziente

Questa fase dello studio condotta in collaborazione con i reparti di Neurochirurgia e dell'Anatomia Patologica dell'Ospedale "M. Bufalini" di Cesena, prevede la possibilità di crescere colture primarie di cellule tumorali di GBM e di isolare cellule tumorali staminali di GBM a partire da campioni tissutali prelevati durante l'intervento di rimozione chirurgica. Tali cellule verranno caratterizzate punto di vista biomolecolare per confermarne il fenotipo staminale e fatte crescere in 3 dimensioni (3D) allo scopo di ottenere dei microtessuti rappresentativi dell'architettura tissutale dei tumori clinici. La disponibilità di cellule staminali tumorali di GBM, attualmente considerate dalla comunità scientifica essere le responsabili dell'insorgenza di GBM, di resistenza alla terapia e di ripresa di malattia, e la possibilità di farle crescere in 3D rappresenta un approccio mai utilizzato fino ad ora e potrebbe contribuire alla realizzazione di un modello predittivo di risposta dei pazienti al trattamento.

d. Caratterizzazione biomolecolare mediante tecniche NGS whole genome-seq e RNAseq del tessuto tumorale e dei linfociti periferici dal sangue di pazienti affetti da glioblastoma.

Saranno studiati il profilo di mutazione e di espressione genica dei tessuti delle colture primarie e dal sangue prelevati da pazienti affetti da GBM. In particolare sarà ricercata la presenza di geni di fusione, considerati fattori "driver" che determinano l'inizio del tumore e la cui identificazione può fornire informazioni utili per la diagnosi, la prognosi e la pianificazione della terapia. Sempre mediante le stesse tecniche sarà inoltre valutata la presenza di RNA/DNA virale.

I dati di genomica ottenuti verranno inoltre correlati a dati ottenuti sugli stessi pazienti in studi di radiomica volti ad individuare mediante l'analisi quantitativa delle immagini caratteristiche morfologiche che sottendono alla fisiopatologia del tumore. Tali informazioni integrate in modelli predittivi mediante anche l'utilizzo di machine learning e di intelligenza artificiale potrebbero aiutare il clinico nella gestione del paziente e nella pianificazione delle terapie.

WP2. Messa a punto di nuovi modelli sperimentali in vitro per il loro utilizzo nella valutazione dell'attività citotossica indotta dal trattamento radiante su tessuto tumorale e sano

Il cancro è una malattia complessa nella quale fattori genetici e ambientali giocano un ruolo fondamentale per lo sviluppo della malattia, la progressione, la risposta alla terapia e la diffusione metastatica. Le colture cellulari tridimensionali (3D) e in particolare gli sferoidi tumorali multicellulari rappresentano un modello preclinico estremamente versatile che può consentire lo studio in vitro delle interazioni dinamiche che intercorrono tra le cellule tumorali e/o tra cellule tumorali e stromali quando sottoposte a condizioni di stress (trattamenti chemio-radioterapeutici, ipossia, stress ossidativo, deprivazione metabolica etc). Negli ultimi anni il potenziale del modello 3D

sferoide (omotipico o eterotipico) per lo sviluppo di nuove strategie antitumorali è stato ampiamente esplorato e sfruttato (Yamada & Cukierman, Cell 2007; Hirschhaeuser et al. J. Biotechnol 2010). Tuttavia l'uso di questo modello composto da cellule in differenti condizioni proliferative e metaboliche ha sollevato numerose criticità relativamente al read-out e alla riproducibilità dei dati prodotti.

In questo ambito gli obiettivi del Laboratorio di Radiobiomics & Drug Discovery dell'IRST di Meldola saranno:

- messa a punto di metodiche di colture cellulare tridimensionali (3D)
- ottenimento di colture di sferoidi originate da differenti istotipi cellulari tumorali, da lesioni metastatiche cerebrali, da tessuti normali/macrosopicamente sani incluse
- messa a punto di metodiche di test di citotossicità ideati per valutare il danno indotto su colture di sferoidi tumorali da terapia radiante e/o da trattamento chemioterapico

WP3. Studio degli effetti molecolari di nuovi schemi di frazionamento

Le ultime innovazioni tecnologiche utilizzate per il trattamento radioterapico delle neoplasie consentono cure efficaci sempre più mirate e meno invasive con conseguente riduzione del rischio di effetti collaterali. Tali innovazioni stanno gradualmente consentendo l'introduzione di metodiche che prevedono un progressivo abbandono dei principi di frazionamento classico, indispensabile per permettere la riparazione del danno radio-indotto sui tessuti sani che invece risultano largamente esposti con le tecniche convenzionali. In alcuni contesti clinici è possibile somministrare dosi efficaci per la cura del tumore in poche frazioni (ipofrazionamento) o, addirittura, in un'unica sessione di terapia.

I meccanismi biologici della radioterapia a dosi ultra-elevate sono distinti da quelli che operano con la radioterapia frazionata e sono oggetto di grande interesse scientifico. La unit di Radiobiomics & Drug Discovery dell'IRST di Meldola, sta conducendo un programma di ricerca di base teso a chiarire i meccanismi biomolecolari innescati dalle dosi ultra elevate.

In particolare il laboratorio sarà impegnato nel prossimo futuro nella ricerca volta alla comprensione dei meccanismi radiobiologici dell'ipofrazionamento accelerato su modelli sperimentali tumorali in vitro ed in vivo.

WP4. Disegno di schemi di trattamento che prevedono l'uso del trattamento radiante in associazione con la chemioterapia convenzionale e/o con nuove molecole radio sensibilizzanti

I meccanismi di interazione tra radio e chemioterapia possono comportare danni al DNA concomitanti, ridotta capacità di riparazione nelle cellule tumorali e la sincronizzazione in fasi radiosensibili del ciclo cellulare nelle cellule tumorali colpite. I ricercatori della unit di Radiobiomics & Drug Discovery saranno pertanto impegnati nella caratterizzazione di nuovi approcci terapeutici volti a potenziare l'effetto citotossico della radioterapia sulle cellule tumorali mediante l'utilizzo di chemioterapici convenzionali e/o nuove molecole radiosensibilizzanti.

Si cercherà inoltre di attivare la collaborazione con differenti case farmaceutiche internazionali per selezionare potenziali nuovi farmaci radio-sensibilizzanti per il trattamento di alcune particolari classi di neoplasie.

WP5. Studio della radioresistenza delle cellule tumorali

La unit di Radiobiomics & Drug Discovery dell'IRST di Meldola sarà impegnato nello studio dei meccanismi molecolari che sottendono e governano i fenomeni di radioresistenza delle cellule tumorali. Varie evidenze scientifiche suggeriscono come la radioresistenza sia un fenomeno estremamente complesso governato da molteplici meccanismi che se identificati potrebbero rappresentare futuri target terapeutici. Data

l'importanza assunta dalla radioterapia nella lotta ai tumori, risulta di elevato interesse scientifico conoscere i fini meccanismi molecolari che regolano tale fenomeno. Infatti, solo così sarà possibile costruire terapie capaci di rendere l'intera popolazione cellulare neoplastica responsiva al trattamento radioterapico e personalizzare il trattamento radioterapico. Lo studio prevede tra i vari obiettivi di ottenere colture primarie da lesioni metastatiche cerebrali derivate da differenti istotipi tumorali allo scopo di ottenere modelli in vitro e in vivo per lo studio dei meccanismi di chemio e radioresistenza che ne hanno determinato la sopravvivenza ai trattamenti, la capacità di disseminazione e la proprietà di colonizzare il microambiente cerebrale. Inoltre uno degli scopi di questo programma di ricerca sarà quello di ricercare specifici biomarcatori per migliorare l'efficacia del trattamento radiante e ridurre le tossicità collaterali.

WP6. Studio sull'effetto immunogenico della terapia radiante nel NSCLC

- a. *Effetto Abscopal.* In letteratura sono riportati casi clinici, sebbene rari, in cui è stato osservato un effetto immunostimolante dovuto a trattamenti con radiazioni ionizzanti. Il fenomeno, noto come effetto abscopal o effetto bystander a distanza, è stato descritto per la prima volta da Mole nel 1953 e fa riferimento alla regressione tumorale osservata sia nella massa del tumore irradiato che nelle lesioni metastatiche poste a distanza dall'area irradiata. L'effetto abscopal o effetto bystander a distanza si distingue dall'effetto bystander in quanto quest'ultimo si osserva nelle cellule poste nelle immediate vicinanze dell'area irradiata mediato dalle giunzioni intercellulari tipo gap junctions e da fattori solubili (TGF- β , NO). L'effetto abscopal è stato osservato in clinica per differenti tipi di tumore tra cui, il carcinoma epatocellulare, la leucemia linfatica cronica, il carcinoma renale cellulare, nei linfomi maligni, nei melanomi e nel polmone. Un lavoro recente condotto in vivo dimostra il coinvolgimento del sistema immunitario nell'induzione dell'effetto abscopal e come sia possibile rafforzare questo genere di risposta utilizzando, assieme alla radioterapia, farmaci target volti a interrompere la tolleranza immunologica indotta dal tumore. Nello stesso lavoro inoltre si riporta come solo determinati regimi di irradiazione frazionato siano in grado di indurre nel topo l'effetto abscopal o di sinergizzare con l'inibizione di CTLA-4 indotta tramite utilizzo di anticorpo specifico (ipilimumab). Questi dati assieme ad altri, suggeriscono inoltre l'esistenza di una specifica finestra terapeutica per l'uso ottimale dei trattamenti radianti. A tutt'oggi rimangono tuttavia non chiariti i meccanismi molecolari innescati dalle cellule tumorali irradiate e responsabili dell'induzione dell'effetto abscopal. Scopo dello studio è indagare su modelli in vitro e in vivo di NSCLC p53 wild type e p53 knockdown se specifici trattamenti radianti siano in grado di innescare meccanismi mediati dalla secrezione di esosomi in grado di veicolare a distanza un messaggio abscopale alle cellule tumorale metastatiche inducendone la morte. Questo allo scopo di identificare un nuovo meccanismo di interazione del tumore con le cellule del sistema immunitario e/o del microambiente tumorale modulato dalla terapia radiante mai descritto prima e che potrebbe essere alla base di uno specifico effetto abscopal p53 mediato.
- b. *Riattivazione della risposta immunitaria di tipo innato esercitata dalla terapia radiante.* Nonostante gli importanti progressi ottenuti nell'ultimo ventennio per il trattamento del tumore del polmone non a piccole cellule (NSCLC) il controllo della malattia in fase avanzata in assenza di una mutazione driver che possa essere oggetto di un trattamento farmacologico mirato, è diventata una criticità clinica. Per questo sub set di pazienti attualmente il trattamento di riferimento è a base di

platino in combinazione con inibitori delle molecole “di blocco” della risposta immunitaria (immune checkpoint inhibitors) e con la radioterapia. Dati di letteratura recenti riportano che la radioterapia e la chemioterapia possono agire come agenti immunostimolanti in grado di riattivare la risposta immune antitumorale. In particolare sembrerebbero essere particolarmente promettenti le strategie terapeutiche in grado di modulare le cellule del sistema immunitario di tipo innato. Studi preliminari indicano che farmaci specifici, esposizioni a dosi di radiazione ad alto dosaggio o schemi di combinazione di chemio-radioterapia, oltre alla capacità di mantenere sotto controllo localmente la malattia, tramite danno diretto o indiretto al DNA delle cellule tumorali, potrebbero anche modificare la risposta immunitaria antitumorale attraverso l'induzione di morte cellulare immunogenica e riprogrammazione delle cellule immunitarie presenti nel microambiente tumorale.

Lo studio ipotizza che l'esposizione a specifici schemi di terapia radiante in regime di frazionamento accelerato e l'uso di farmaci appartenenti alla classe degli antimetaboliti in associazione o meno con specifici schemi di frazionamento radioterapico possa “accendere” la risposta immunitaria nei confronti del tumore andando a modificare la composizione e lo stato di attivazione delle cellule immunitarie presenti nel microambiente tumorale. Lo studio inoltre ipotizza la presenza nello stroma tumorale di una immunosoppressive signature già nelle stadi precoci della malattia.

WP7. Studio degli effetti molecolari delle radiazioni sui tessuti sani

Lo studio delle relazioni tra radiazioni ionizzanti e biologia molecolare delle cellule sane e tumorali può migliorare l'ottimizzazione e la personalizzazione del trattamento radiante. In particolare, nonostante l'evidenza dell'efficacia antitumorale, l'utilizzo di radionuclidi terapeutici è associato a un certo grado di rischio di tossicità difficili da prevedere e la cui entità può variare a seconda delle caratteristiche del paziente, i trattamenti ricevuti ed il radiofarmaco utilizzato. Tra questi di particolare rilevanza sono l'induzione di tossicità ematologiche anche di grado severo. Questi eventi possono essere fortemente influenzati dal tempo in cui la dose è rilasciata e dalle differenze in età tra individui. Inoltre, gli effetti sui tessuti sani dei radionuclidi α e β emittenti, in grado di rilasciare nel tempo basse dosi decrescenti di radiazione, sono di piccola entità e difficili da misurare direttamente. A questo scopo sarà indagato il danno al DNA causato da radioligandi α e β emittenti e la sua correlazione con il danno sulle cellule del sangue circolanti, quali i linfociti, allo scopo di aiutare il clinico nell'ottimizzazione e personalizzazione dei trattamenti e nel controllo del rischio di insorgenza di effetti collaterali protratti e tardivi.

In quest'ambito saranno inoltre indagati gli effetti delle radiazioni ionizzanti sulla risposta immunitaria e infiammatoria nei pazienti sottoposti a regimi radioterapici in associazione o meno con tecniche non convenzionali di medicina integrativa allo scopo di individuare una *signature* in grado di prevedere e/o monitorare la risposta al trattamento e prevenire l'insorgenza di eventuali tossicità. Inoltre sarà valutata l'efficacia di agenti radioprotettivi su modelli sperimentali in vitro ed in vivo sottoposti a schemi di trattamento radiante convenzionali o innovativi.

Data di inizio progetto:

01/01/2021

Data di fine progetto:

01/12/2025

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE anno 2021 (primo anno di 5 anni di progetto)
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	0	0
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	0	0
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, ecc.)	1.000.000	87.237,05
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi, missioni ecc.)	0	0
Elaborazione dati	0	0
Spese amministrative	0	0
Altro (indicare quali)	0	0
	0	0
TOTALE	1.000.000	87.237,05

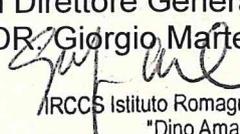
Data
29/01/2021

Il Direttore Generale
Dr. Giorgio Martelli

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

IRCCS Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori
"Dino Amadori" - IRST S.r.l.
Direttore Generale
Dott. Giorgio Martelli

Il Direttore Generale
DR. Giorgio Martelli


IRCCS Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori
"Dino Amadori" - IRST S.r.l.
Direttore Generale
Dott. Giorgio Martelli

Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca
Direzione Generale per il coordinamento e lo sviluppo e della ricerca
Ufficio III

Previsione di spesa Fondi 5 per mille **ANNO 2019**
Enti della Ricerca Scientifica

Ente¹: Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori "Dino Amadori", IRST IRCCS
Codice fiscale: **03154520401**
Indirizzo sede legale: **Via Maroncelli 40, 47014 Meldola (FC)**
Referenti (nominativo, telefono, e.mail) **ANNALISA VOLPI, tel. 0543 739267, mail**
annalisa.volpi@irst.emr.it / ufficio.ricerca@irst.emr.it

Attività: Studio dei meccanismi radiobiologici finalizzato all'ottimizzazione della terapia radiante

La radioterapia, assieme alla chirurgia, e alla chemioterapia rappresenta uno dei trattamenti più efficaci per la cura dei pazienti affetti da tumore. Si stima infatti che circa la metà di tutti i pazienti oncologici riceverà cure radioterapiche durante il loro percorso clinico. Mentre la chirurgia rappresenta la forma primaria di trattamento per molti tipi di tumore in fase precoce, la radioterapia fornisce buoni risultati nel lungo periodo, nel controllo di neoplasie quali i tumori della testa e del collo, del polmone, della cervice, della prostata, della vescica e della pelle. Inoltre in aggiunta al suo ruolo terapeutico/curativo, molti pazienti oncologici, in stadio avanzato, traggono vantaggio dalla palliazione indotta dalla radioterapia, ad esempio, contro il dolore da metastasi ossee.

Data l'importanza assunta dalla radioterapia nella lotta ai tumori, considerevoli sforzi si stanno facendo per migliorarne i risultati tramite l'innalzamento degli standard delle dosi prescritte e rilasciate, il miglioramento nella distribuzione delle dosi irradiate, l'integrazione delle immagini-guida durante i trattamenti di rilascio giornaliero, lo sfruttamento delle nuove scoperte in radiobiologia. In particolare la radiobiomica è un'area multidisciplinare della scienza, che si propone di studiare, utilizzando le più avanzate tecniche di tipo biomolecolare, le modalità di interazione e gli effetti sugli organismi viventi, delle radiazioni ionizzanti. Questa particolare area della ricerca coinvolge differenti figure professionali quali il biologo, il fisico e il medico clinico. L'approccio multidisciplinare alla materia, risponde all'esigenza di dare un razionale scientifico ai dati di osservazione raccolti nella pratica clinica e per fornire elementi di congiunzione e integrazione tra le diverse metodologie conoscitive impegnate in quest'ambito della ricerca. Ricerca che, come da *mission* istituzionale dell'IRST di Meldola, sarà volta a trovare una trasposizione immediata dei risultati nel campo della sperimentazione clinica.

Il progetto si articola in 7 workpackages (WPs) di seguito descritti.

WP1. Progetto Glioblastoma

Il Glioblastoma umano (hGBM) rappresenta il tumore cerebrale primitivo più comune e temibile. Misure preventive come cambiamenti dello stile di vita, sono inefficaci nel prevenire questa forma di neoplasia. La diagnosi precoce e il tipo di trattamento non impattano sulla sopravvivenza, precludendo l'utilità dei programmi di screening per il

¹ Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

glioblastoma. L'attuale trattamento standard è rappresentato da un approccio multimodale che combina la neurochirurgia, la radioterapia in regime di frazionamento convenzionale (60 Gy erogati in 30 frazioni) e la chemioterapia a base di temozolomide. Sfortunatamente, praticamente tutti i pazienti vanno incontro a recidiva entro 7-10 mesi dal termine del trattamento di prima linea. Inoltre, nessuno dei trattamenti alternativi ad oggi disponibili (quali un secondo ciclo di terapia a base di temozolomide, bevacizumab, carmustine, lomustina o carboplatino) ha dimostrato di migliorare il tempo di sopravvivenza o di apportare un qualche beneficio ai pazienti. La mancanza di un trattamento realmente efficace giustifica pertanto la ricerca di nuovi approcci terapeutici e di trattamenti personalizzati sulle caratteristiche biomolecolari dei pazienti. Questo WP in particolare si occuperà di:

- a. *Disegno di schemi di trattamento che prevedono l'uso del trattamento radiante in associazione con la chemioterapia convenzionale e/o con nuove molecole radio-sensibilizzanti*

I meccanismi di interazione tra radio e chemioterapia possono comportare danni al DNA concomitanti, ridotta capacità di riparazione nelle cellule tumorali e la sincronizzazione in fasi radiosensibili del ciclo cellulare nelle cellule tumorali colpite. I ricercatori del laboratorio di Radiobiomics & Drug Discovery saranno pertanto impegnati nella caratterizzazione di nuovi approcci terapeutici volti a potenziare l'effetto citotossico della radioterapia sulle cellule tumorali testando chemioterapici convenzionali e/o nuove molecole radiosensibilizzanti su colture primarie ottenute da pazienti affetti da hGBM. Si cercherà inoltre di attivare collaborazioni con differenti case farmaceutiche internazionali per selezionare potenziali nuovi farmaci radio-sensibilizzanti per il trattamento del glioblastoma.

- b. *Valutazione preclinica del ruolo radiosensibilizzante della medicina iperbarica*

Questa fase dello studio condotto in collaborazione con il Centro Iperbarico di Ravenna prevede di studiare a livello preclinico come differenti condizioni di ossigenazione (ipossia, normossia e iperossia) possano influire sull'efficacia dei trattamenti radianti in modelli sperimentali di glioblastoma umano.

La condizione di ipossia si riscontra molto frequentemente nei tumori solidi ed è dovuta alla rapida proliferazione delle cellule tumorali e/o a un insufficiente apporto di ossigeno. In tale condizione le cellule localizzate alla periferia del tumore in prossimità dei vasi sanguigni continuano a ricevere un adeguato rifornimento di ossigeno e nutrienti, mentre le cellule tumorali situate negli strati più profondi della massa neoplastica risultano essere troppo distanti dai vasi sanguigni per poter sopravvivere e spesso vanno in necrosi o apoptosi. Tuttavia una porzione di cellule localizzate tra la periferia e la parte più profonda del tumore trovandosi in uno stato di moderata ipossia, riesce a sopravvivere e entrare in una fase dormiente tramite adattamento al microambiente ipossico. Queste cellule diventano più maligne e resistenti ai trattamenti chemio- e/o radio-terapici, entrambi maggiormente efficaci sulle cellule in attiva proliferazione. Queste cellule tumorali "dormienti" rivestiranno un ruolo molto importante nella progressione e ripresa di malattia. Per questo motivo cercare di ridurre le aree ipossiche del tumore in concomitanza dei trattamenti radio- chemioterapici potrebbe costituire una valida approccio per ridurre il rischio di ripresa e/o progressione della malattia. HBO è in grado di aumentare la concentrazione e la pressione di ossigeno oltre che di aumentarne la percentuale di diffusione nei

tessuti tumorali. In teoria quindi un simile trattamento impedirebbe alle cellule tumorali di entrare nella fase di "dormienza", di rimanere attivamente proliferanti e quindi sensibili ai trattamenti radio-chemioterapici. Scopo della collaborazione tra Centro Iperbarico e la unit di Radiobiomics & Drug Discovery sarà quello di fornire un razionale scientifico per futuri trials clinici su paziente che prevedano l'utilizzo del trattamento con ossigeno iperbarico in combinazione con radioterapia.

c. Isolamento e caratterizzazione di cellule staminali tumorali di glioblastoma umano a partire da prelievi tissutali tumorali da paziente

Questa fase dello studio condotta in collaborazione con i reparti di Neurochirurgia e dell'Anatomia Patologica dell'Ospedale "M. Bufalini" di Cesena, prevede la possibilità di crescere colture primarie di cellule tumorali di GBM e di isolare cellule tumorali staminali di GBM a partire da campioni tissutali prelevati durante l'intervento di rimozione chirurgica. Tali cellule verranno caratterizzate punto di vista biomolecolare per confermarne il fenotipo staminale e fatte crescere in 3 dimensioni (3D) allo scopo di ottenere dei microtessuti rappresentativi dell'architettura tissutale dei tumori clinici. La disponibilità di cellule staminali tumorali di GBM, attualmente considerate dalla comunità scientifica essere le responsabili dell'insorgenza di GBM, di resistenza alla terapia e di ripresa di malattia, e la possibilità di farle crescere in 3D rappresenta un approccio mai utilizzato fino ad ora e potrebbe contribuire alla realizzazione di un modello predittivo di risposta dei pazienti al trattamento.

d. Caratterizzazione biomolecolare mediante tecniche NGS whole genome-seq e RNAseq del tessuto tumorale e dei linfociti periferici dal sangue di pazienti affetti da glioblastoma.

Saranno studiati il profilo di mutazione e di espressione genica dei tessuti delle colture primarie e dal sangue prelevati da pazienti affetti da GBM. In particolare sarà ricercata la presenza di geni di fusione, considerati fattori "driver" che determinano l'inizio del tumore e la cui identificazione può fornire informazioni utili per la diagnosi, la prognosi e la pianificazione della terapia. Sempre mediante le stesse tecniche sarà inoltre valutata la presenza di RNA/DNA virale.

I dati di genomica ottenuti verranno inoltre correlati a dati ottenuti sugli stessi pazienti in studi di radiomica volti ad individuare mediante l'analisi quantitativa delle immagini caratteristiche morfologiche che sottendono alla fisiopatologia del tumore. Tali informazioni integrate in modelli predittivi mediante anche l'utilizzo di machine learning e di intelligenza artificiale potrebbero aiutare il clinico nella gestione del paziente e nella pianificazione delle terapie.

WP2. Messa a punto di nuovi modelli sperimentali in vitro per il loro utilizzo nella valutazione dell'attività citotossica indotta dal trattamento radiante su tessuto tumorale e sano

Il cancro è una malattia complessa nella quale fattori genetici e ambientali giocano un ruolo fondamentale per lo sviluppo della malattia, la progressione, la risposta alla terapia e la diffusione metastatica. Le colture cellulari tridimensionali (3D) e in particolare gli sferoidi tumorali multicellulari rappresentano un modello preclinico estremamente versatile che può consentire lo studio in vitro delle interazioni dinamiche che intercorrono tra le cellule tumorali e/o tra cellule tumorali e stromali quando sottoposte a condizioni di stress (trattamenti chemio-radioterapeutici, ipossia, stress ossidativo, deprivazione metabolica etc). Negli ultimi anni il potenziale del modello 3D

sferoide (omotipico o eterotipico) per lo sviluppo di nuove strategie antitumorali è stato ampiamente esplorato e sfruttato (Yamada & Cukierman, Cell 2007; Hirschhaeuser et al. J. Biotechnol 2010). Tuttavia l'uso di questo modello composto da cellule in differenti condizioni proliferative e metaboliche ha sollevato numerose criticità relativamente al read-out e alla riproducibilità dei dati prodotti.

In questo ambito gli obiettivi del Laboratorio di Radiobiomics & Drug Discovery dell'IRST di Meldola saranno:

- messa a punto di metodiche di colture cellulare tridimensionali (3D)
- ottenimento di colture di sferoidi originate da differenti istotipi cellulari tumorali, da lesioni metastatiche cerebrali, da tessuti normali/macrosopicamente sani incluse
- messa a punto di metodiche di test di citotossicità ideati per valutare il danno indotto su colture di sferoidi tumorali da terapia radiante e/o da trattamento chemioterapico

WP3. Studio degli effetti molecolari di nuovi schemi di frazionamento

Le ultime innovazioni tecnologiche utilizzate per il trattamento radioterapico delle neoplasie consentono cure efficaci sempre più mirate e meno invasive con conseguente riduzione del rischio di effetti collaterali. Tali innovazioni stanno gradualmente consentendo l'introduzione di metodiche che prevedono un progressivo abbandono dei principi di frazionamento classico, indispensabile per permettere la riparazione del danno radio-indotto sui tessuti sani che invece risultano largamente esposti con le tecniche convenzionali. In alcuni contesti clinici è possibile somministrare dosi efficaci per la cura del tumore in poche frazioni (ipofrazionamento) o, addirittura, in un'unica sessione di terapia.

I meccanismi biologici della radioterapia a dosi ultra-elevate sono distinti da quelli che operano con la radioterapia frazionata e sono oggetto di grande interesse scientifico. La unit di Radiobiomics & Drug Discovery dell'IRST di Meldola, sta conducendo un programma di ricerca di base teso a chiarire i meccanismi biomolecolari innescati dalle dosi ultra elevate.

In particolare il laboratorio sarà impegnato nel prossimo futuro nella ricerca volta alla comprensione dei meccanismi radiobiologici dell'ipofrazionamento accelerato su modelli sperimentali tumorali in vitro ed in vivo.

WP4. Disegno di schemi di trattamento che prevedono l'uso del trattamento radiante in associazione con la chemioterapia convenzionale e/o con nuove molecole radio sensibilizzanti

I meccanismi di interazione tra radio e chemioterapia possono comportare danni al DNA concomitanti, ridotta capacità di riparazione nelle cellule tumorali e la sincronizzazione in fasi radiosensibili del ciclo cellulare nelle cellule tumorali colpite. I ricercatori della unit di Radiobiomics & Drug Discovery saranno pertanto impegnati nella caratterizzazione di nuovi approcci terapeutici volti a potenziare l'effetto citotossico della radioterapia sulle cellule tumorali mediante l'utilizzo di chemioterapici convenzionali e/o nuove molecole radiosensibilizzanti.

Si cercherà inoltre di attivare la collaborazione con differenti case farmaceutiche internazionali per selezionare potenziali nuovi farmaci radio-sensibilizzanti per il trattamento di alcune particolari classi di neoplasie.

WP5. Studio della radioresistenza delle cellule tumorali

La unit di Radiobiomics & Drug Discovery dell'IRST di Meldola sarà impegnato nello studio dei meccanismi molecolari che sottendono e governano i fenomeni di radioresistenza delle cellule tumorali. Varie evidenze scientifiche suggeriscono come la radioresistenza sia un fenomeno estremamente complesso governato da molteplici meccanismi che se identificati potrebbero rappresentare futuri target terapeutici. Data

l'importanza assunta dalla radioterapia nella lotta ai tumori, risulta di elevato interesse scientifico conoscere i fini meccanismi molecolari che regolano tale fenomeno. Infatti, solo così sarà possibile costruire terapie capaci di rendere l'intera popolazione cellulare neoplastica responsiva al trattamento radioterapico e personalizzare il trattamento radioterapico. Lo studio prevede tra i vari obiettivi di ottenere colture primarie da lesioni metastatiche cerebrali derivate da differenti istotipi tumorali allo scopo di ottenere modelli in vitro e in vivo per lo studio dei meccanismi di chemio e radioresistenza che ne hanno determinato la sopravvivenza ai trattamenti, la capacità di disseminazione e la proprietà di colonizzare il microambiente cerebrale. Inoltre uno degli scopi di questo programma di ricerca sarà quello di ricercare specifici biomarcatori per migliorare l'efficacia del trattamento radiante e ridurre le tossicità collaterali.

WP6. Studio sull'effetto immunogenico della terapia radiante nel NSCLC

- a. *Effetto Abscopal.* In letteratura sono riportati casi clinici, sebbene rari, in cui è stato osservato un effetto immunostimolante dovuto a trattamenti con radiazioni ionizzanti. Il fenomeno, noto come effetto abscopal o effetto bystander a distanza, è stato descritto per la prima volta da Mole nel 1953 e fa riferimento alla regressione tumorale osservata sia nella massa del tumore irradiato che nelle lesioni metastatiche poste a distanza dall'area irradiata. L'effetto abscopal o effetto bystander a distanza si distingue dall'effetto bystander in quanto quest'ultimo si osserva nelle cellule poste nelle immediate vicinanze dell'area irradiata mediato dalle giunzioni intercellulari tipo gap junctions e da fattori solubili (TGF- β , NO). L'effetto abscopal è stato osservato in clinica per differenti tipi di tumore tra cui, il carcinoma epatocellulare, la leucemia linfatica cronica, il carcinoma renale cellulare, nei linfomi maligni, nei melanomi e nel polmone. Un lavoro recente condotto in vivo dimostra il coinvolgimento del sistema immunitario nell'induzione dell'effetto abscopal e come sia possibile rafforzare questo genere di risposta utilizzando, assieme alla radioterapia, farmaci target volti a interrompere la tolleranza immunologica indotta dal tumore. Nello stesso lavoro inoltre si riporta come solo determinati regimi di irradiazione frazionato siano in grado di indurre nel topo l'effetto abscopal o di sinergizzare con l'inibizione di CTLA-4 indotta tramite utilizzo di anticorpo specifico (ipilimumab). Questi dati assieme ad altri, suggeriscono inoltre l'esistenza di una specifica finestra terapeutica per l'uso ottimale dei trattamenti radianti. A tutt'oggi rimangono tuttavia non chiariti i meccanismi molecolari innescati dalle cellule tumorali irradiate e responsabili dell'induzione dell'effetto abscopal. Scopo dello studio è indagare su modelli in vitro e in vivo di NSCLC p53 wild type e p53 knockdown se specifici trattamenti radianti siano in grado di innescare meccanismi mediati dalla secrezione di esosomi in grado di veicolare a distanza un messaggio abscopale alle cellule tumorale metastatiche inducendone la morte. Questo allo scopo di identificare un nuovo meccanismo di interazione del tumore con le cellule del sistema immunitario e/o del microambiente tumorale modulato dalla terapia radiante mai descritto prima e che potrebbe essere alla base di uno specifico effetto abscopal p53 mediato.
- b. *Riattivazione della risposta immunitaria di tipo innato esercitata dalla terapia radiante.* Nonostante gli importanti progressi ottenuti nell'ultimo ventennio per il trattamento del tumore del polmone non a piccole cellule (NSCLC) il controllo della malattia in fase avanzata in assenza di una mutazione driver che possa essere oggetto di un trattamento farmacologico mirato, è diventata una criticità clinica. Per questo sub set di pazienti attualmente il trattamento di riferimento è a base di

platino in combinazione con inibitori delle molecole “di blocco” della risposta immunitaria (immune checkpoint inhibitors) e con la radioterapia. Dati di letteratura recenti riportano che la radioterapia e la chemioterapia possono agire come agenti immunostimolanti in grado di riattivare la risposta immune antitumorale. In particolare sembrerebbero essere particolarmente promettenti le strategie terapeutiche in grado di modulare le cellule del sistema immunitario di tipo innato. Studi preliminari indicano che farmaci specifici, esposizioni a dosi di radiazione ad alto dosaggio o schemi di combinazione di chemio-radioterapia, oltre alla capacità di mantenere sotto controllo localmente la malattia, tramite danno diretto o indiretto al DNA delle cellule tumorali, potrebbero anche modificare la risposta immunitaria antitumorale attraverso l'induzione di morte cellulare immunogenica e riprogrammazione delle cellule immunitarie presenti nel microambiente tumorale.

Lo studio ipotizza che l'esposizione a specifici schemi di terapia radiante in regime di frazionamento accelerato e l'uso di farmaci appartenenti alla classe degli antimetaboliti in associazione o meno con specifici schemi di frazionamento radioterapico possa “accendere” la risposta immunitaria nei confronti del tumore andando a modificare la composizione e lo stato di attivazione delle cellule immunitarie presenti nel microambiente tumorale. Lo studio inoltre ipotizza la presenza nello stroma tumorale di una immunosoppressiva signature già nelle stadi precoci della malattia.

WP7. Studio degli effetti molecolari delle radiazioni sui tessuti sani

Lo studio delle relazioni tra radiazioni ionizzanti e biologia molecolare delle cellule sane e tumorali può migliorare l'ottimizzazione e la personalizzazione del trattamento radiante. In particolare, nonostante l'evidenza dell'efficacia antitumorale, l'utilizzo di radionuclidi terapeutici è associato a un certo grado di rischio di tossicità difficili da prevedere e la cui entità può variare a seconda delle caratteristiche del paziente, i trattamenti ricevuti ed il radiofarmaco utilizzato. Tra questi di particolare rilevanza sono l'induzione di tossicità ematologiche anche di grado severo. Questi eventi possono essere fortemente influenzati dal tempo in cui la dose è rilasciata e dalle differenze in età tra individui. Inoltre, gli effetti sui tessuti sani dei radionuclidi α e β emittenti, in grado di rilasciare nel tempo basse dosi decrescenti di radiazione, sono di piccola entità e difficili da misurare direttamente. A questo scopo sarà indagato il danno al DNA causato da radioligandi α e β emittenti e la sua correlazione con il danno sulle cellule del sangue circolanti, quali i linfociti, allo scopo di aiutare il clinico nell'ottimizzazione e personalizzazione dei trattamenti e nel controllo del rischio di insorgenza di effetti collaterali protratti e tardivi.

In quest'ambito saranno inoltre indagati gli effetti delle radiazioni ionizzanti sulla risposta immunitaria e infiammatoria nei pazienti sottoposti a regimi radioterapici in associazione o meno con tecniche non convenzionali di medicina integrativa allo scopo di individuare una *signature* in grado di prevedere e/o monitorare la risposta al trattamento e prevenire l'insorgenza di eventuali tossicità. Inoltre sarà valutata l'efficacia di agenti radioprotettivi su modelli sperimentali in vitro ed in vivo sottoposti a schemi di trattamento radiante convenzionali o innovativi.

Data di inizio progetto:

01/01/2021

Data di fine progetto:

01/12/2025

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSI VO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE anno 2021 (primo anno di 5 anni di progetto)
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	0	0
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	0	0
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, ecc.)	1.000.000	101.921,70
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi, missioni ecc.)	0	0
Elaborazione dati	0	0
Spese amministrative	0	0
Altro (indicare quali)	0	0
	0	0
TOTALE	1.000.000	101.921,70

Data
29/01/2021

Il Direttore Generale
Dr. Giorgio Martelli



IRCCS Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori
"Dino Amadori" - IRST S.r.l.
Direttore Generale
Dott. Giorgio Martelli

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Direttore Generale
Dr. Giorgio Martelli



IRCCS Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori
"Dino Amadori" - IRST S.r.l.
Direttore Generale
Dott. Giorgio Martelli