

- Studiare l'incidenza dell'antibiotico-resistenza in ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da campioni alimentari e umani ed identificare i plasmidi di resistenza. Lo studio verrà effettuato dal Dipartimento di medicina sperimentale dell'Università degli Studi dell'Aquila.

In previsione di un monitoraggio per rilevare l'eventuale presenza della *Listeria monocytogenes* in alimenti pronti per il consumo e in campioni biologici provenienti da pazienti con sintomatologia riconducibile alla listeriosi, si è iniziato a mettere a punto un programma computerizzato per la raccolta di tutte le informazioni che le varie regioni partecipanti al progetto invieranno attraverso una scheda che accompagnerà i ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati sia da alimenti che da campioni biologici. Tale programma computerizzato verrà realizzato dal Servizio elaborazione dati dell'ISS.

In merito alle prospettive future, il progetto si propone di perseguire i seguenti obiettivi:

- stima della frequenza di isolamento della *Listeria monocytogenes* negli alimenti e nelle superfici e ambienti di lavoro di strutture deputate alla ristorazione collettiva;
- stima della carica contaminante nei vari tipi di alimenti;
- stima dell'incidenza della listeriosi umana nella popolazione italiana, in particolare in quella a rischio;
- stima dei casi di listeriosi correlati al consumo di alimenti contaminati;
- stima della prevalenza di stato di portatore sano, in particolare in alcune categorie professionali;
- stima dell'isolamento della *Listeria monocytogenes* nei prodotti abortivi umani;
- identificazione dei fattori tecnologici di controllo della sopravvivenza e/o moltiplicazione della *Listeria monocytogenes* negli alimenti;
- caratterizzazione sierologica e molecolare dei ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da campioni alimentari e umani;

Progetto
Studio multicentrico
nazionale per il monitoraggio
clinico-epidemiologico
della malattia
di Creutzfeldt-Jacob
e sindromi correlate
Responsabile scientifico:
Maurizio Pocchiari

- confronto di profili molecolari di ceppi isolati da diverse aree geografiche.

L'Istituto Superiore di Sanità ha istituito, con decorrenza 1° gennaio 1993, il Registro nazionale della malattia di Creutzfeldt-Jacob (CJD) e sindromi correlate al fine di creare un osservatorio epidemiologico nazionale. Tale iniziativa fa parte di una "concerted action" dell'Unione europea e si propone di raccogliere un patrimonio di dati, vasto ed omogeneo, per una corretta valutazione epidemiologica di questa patologia.

A tale scopo sono stati contattati 331 centri neurologici nazionali (cliniche universitarie, divisioni ospedaliere e case di cura convenzionate) cui sono state inviate schede di facile compilazione per la segnalazione dei casi di malattia di Creutzfeldt-Jacob osservati. Il compito della raccolta dei dati è stato affidato al Laboratorio di virologia dell'Istituto Superiore di Sanità, sia in quanto promotore dell'iniziativa in Italia, sia perché il suo gruppo di ricerca ha accumulato negli anni una competenza specifica sull'argomento riconosciuta a livello internazionale.

Oltre a questa iniziativa, molto importante dal punto di vista epidemiologico e di competenza istituzionale dell'Istituto, è stato attivato uno studio caso/controllo in collaborazione con 4 centri neurologici nazionali che svolgono il ruolo di centri di referenza territoriali.

Successivamente alla segnalazione di ogni nuovo caso, il Laboratorio di virologia provvede ad organizzare, tramite il centro clinico di referenza nazionale competente per il territorio della segnalazione, le interviste valide per lo studio caso/controllo, inviando un proprio medico presso il reparto dell'ospedale dal quale proviene la segnalazione.

Contemporaneamente si organizza il trasporto di un prelievo ematico del paziente presso il Laboratorio di virologia dell'Istituto Superiore di Sanità dove si effettua

l'indagine genetica, lo screening delle mutazioni note del gene della prion protein (PrP) mediante digestione del gene amplificato attraverso la reazione polimerasica a catena con enzimi di restrizione, necessaria per evidenziare eventuali mutazioni presenti nei casi di CJD di tipo familiare o di SGS. Inoltre, viene sequenziato il gene della PrP con il metodo Sanger per la ricerca di mutazioni non ancora conosciute.

In caso di decesso di un paziente con sospetto clinico di CJD si organizza il trasporto del materiale biologico, prelevato in corso di autopsia, presso il Laboratorio di virologia dell'Istituto Superiore di Sanità, dove si provvede ad organizzare le indagini diagnostiche indispensabili per una corretta classificazione diagnostica della malattia. Infatti, la diagnosi di CJD può essere definitiva solo se confermata da un'indagine biochimica (identificazione della PrP₂₇₋₃₀ mediante "western blot" su campione di tessuto cerebrale congelato) o istopatologica (presenza di spongiosi, gliosi, perdita neuronale all'esame di un campione di tessuto cerebrale fissato in formalina).

Per acquisire ulteriori informazioni utili per lo studio della caratteristica che queste patologie mostrano manifestandosi come patologie infettive o come patologie genetiche, in alcuni casi di particolare interesse e con diagnosi clinica confermata (specialmente nei casi familiari con presenza di mutazioni a carico del gene della PrP), si procede al tentativo di trasmissione sperimentale della malattia mediante l'inoculazione di materiale biologico infetto in animali da laboratorio. Per la trasmissione agli animali vengono utilizzati piccoli animali di laboratorio (topo, criceto). Il materiale biologico da testare viene preparato come omogenato in tampone fosfato sterile e inoculato sia per via intracerebrale (50 µl di inoculo), sia per via

intraperitoneale (100 ml di inoculo) negli animali di laboratorio.

Nel 1995, al Laboratorio di virologia sono arrivate dai vari centri neurologici nazionali 52 segnalazioni di casi con sospetto clinico di CJD. Di queste segnalazioni, 41 sono risultati compatibili con diagnosi di CJD, rilevando un'incidenza nazionale di 0,7 casi per milione di abitanti. L'indagine genetica effettuata sui casi dei quali ci è pervenuto un campione ematico ha evidenziato 6 casi legati ad alterazioni del gene della PrP ed ha attivato uno studio delle singole famiglie. Questi dati, che rispecchiano quelli di altri paesi europei, confermano l'ottimo lavoro fin qui svolto dal Laboratorio di virologia dell'Istituto, grazie alla preziosa ed indispensabile collaborazione di tutti i centri neurologici nazionali.

In seguito alla recente descrizione di una nuova variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob (V-CJD) in Inghilterra, per la quale si ipotizza una possibile correlazione con l'encefalopatia spongiforme del bovino (BSE), la sorveglianza epidemiologica di questa patologia sul territorio nazionale è diventata un importante argomento di sanità pubblica. Pertanto, oltre al potenziamento dell'esistente controllo epidemiologico della CJD in Italia, sono state attuate nuove strategie per consentire il pronto rilevamento di eventuali casi appartenenti alla nuova variante, attraverso il coinvolgimento di altre figure professionali (pediatri, neuropsichiatri infantili, anatomopatologi), e tramite una capillare informazione delle strutture sanitarie coinvolte sulle differenti caratteristiche cliniche, elettrofisiologiche ed anatomopatologiche della V-CJD.

Il Registro nazionale della CJD ha istituito inoltre, nel giugno 1996, un gruppo di lavoro formato da esperti nazionali della materia, a supporto della propria attività.

Progetto
Sviluppo dell'uso
di protoni in terapia
oncologica
Responsabile scientifico:
Martino Grandolfo

Il progetto, indicato brevemente con la sigla TOP (terapia oncologica con protoni), si inquadra negli obiettivi del Piano sanitario nazionale, il quale pone l'accento, fra l'altro, sulla prevenzione e la cura delle malattie oncologiche e ha come obiettivo lo studio e la realizzazione di una tecnica di terapia dei tumori basata sull'uso di fasci di protoni.

Scopo del progetto è la progettazione e realizzazione di un acceleratore di protoni aventi energie fino a circa 200 MeV e con caratteristiche di "compattezza" atte a renderne possibile l'installazione in solo qualche centinaia di metri quadrati. Acceleratori di questo tipo non sono stati ancora realizzati, potendo solo essere il risultato di una intensa attività di ricerca e sviluppo che, richiedendo forti investimenti, non aveva trovato finora modo di esprimersi nel nostro paese.

Sono state analizzate le varie proposte che si trovano in letteratura, che possono essere raggruppate in tre classi: a) ciclotroni isocroni superconduttori, ad alto campo magnetico; b) sincrotroni non superconduttori pulsati, ad alto campo magnetico; c) acceleratori lineari (LINAC) per protoni ad alto gradiente.

Dai primi studi effettuati è apparso, inoltre, importante scegliere di "iniettare" nell'acceleratore principale protoni già portati ad un'energia relativamente elevata, in modo da permettere anche la produzione di isotopi radioattivi utili per la PET (positron emission tomography), che diverrebbe un'importantissima ulteriore metodica (diagnostica) a disposizione.

La definizione del tipo di macchina acceleratrice è stato il momento cruciale per l'inizio dell'intero progetto, poiché questo ha come scopo finale proprio quello di effettuare le scelte tecnologiche più opportune, di progettare l'acceleratore in modo da ottenere il massimo grado di affidabilità, permettendo quindi il trasferimento all'industria nazionale di tutte le informazioni atte, prima, alla sua realizzazione e,

in un secondo tempo, alla sua eventuale commercializzazione sul mercato interno ed estero.

L'attenzione si è inizialmente focalizzata su due fra i tre possibili tipi di macchina acceleratrice, l'acceleratore lineare e il ciclotrone superconduttivo, mentre si è esclusa l'opzione sincrotrone.

Gli acceleratori lineari da protoni di 200 MeV sono stati sinora appannaggio solo di grandi strutture di ricerca e realizzati senza preoccuparsi della compattezza. Le loro caratteristiche, comunque, sono di alto livello di confidenza nella progettazione, nell'affidabilità nel funzionamento e nella modularità, cioè nella loro scomponibilità in moduli indipendenti tra loro. La proposta di LINAC a protoni da applicare alla terapia non è nuova, ma una macchina di questo tipo non è ancora mai stata realizzata. Lo studio di fattibilità deve ottimizzare i parametri principali della struttura e analizzare la dinamica longitudinale e trasversa del fascio di protoni per ottimizzare il sistema di focalizzazione radiale che, in questo tipo di acceleratore, è la parte più critica.

Un ciclotrone da 200 MeV, in versione non superconduttrice, è già in corso di sviluppo presso un'affermata ditta belga (IBA). Dal progetto si evince una macchina affidabile e dotata delle caratteristiche richieste dalla radioterapia, ma piuttosto pesante (200 t) e con necessità di bunker molto alti (circa 7 metri). La versione superconduttrice può affermarsi perché più compatta e leggera (<100 t), ma richiede un certo sviluppo.

L'analisi comparata dell'acceleratore lineare e del ciclotrone superconduttivo ha portato alla convinzione che entrambe le macchine siano caratterizzate da elevatissimi livelli nelle relative prestazioni e, quindi, da grande validità del loro potenziale uso in campo radioterapico. Ciò ha fatto sì che la scelta non sia stata effettuata sulla base delle diverse caratteristiche tecniche, che avrebbero in definitiva portato ad una situazione di parità, ma sulla base della reale possibilità di trovare, a livello nazionale, non solo le com-

petenze ma anche la disponibilità a collaborare con l'ISS per la realizzazione del prototipo. Essendosi queste caratteristiche trovate solo in ambito ENEA, la scelta è caduta di conseguenza sull'acceleratore lineare, di cui è l'ENEA a detenere il necessario e specifico "know-how" tecnologico.

E' stata definita la struttura del LINAC, che sarà composto dai seguenti sottosistemi:

1) Un iniettore da 7 MeV composto da una sorgente, un acceleratore lineare di tipo RFQ (radio frequency quadrupole) e da un acceleratore lineare tipo DTL (drift tube LINAC) a bassa frequenza (750 MHz), con la duplice funzione di iniettare il fascio nell'acceleratore successivo e di generare un fascio intenso per produzione di radioisotopi PET.

2) Un acceleratore lineare a 3 GHz, denominato SCDTL (side coupled drift tube LINAC, la cui struttura è brevetto ENEA), che accelera i protoni da 7 a 70 MeV, completo del sistema di alimentazione a RF.

3) Un acceleratore lineare a 3 GHz tipo SCL (side coupled LINAC), analogo a quelli in uso per elettroni, che accelera i protoni ad un'energia variabile tra 70 e 200-250 MeV, completo del sistema di alimentazione a RF.

4) Un sistema di rilascio di dose al paziente dotato di testata isocentrica rotante (gantry) e dei sistemi di rilascio della dose per il trattamento terapeutico.

Lo sviluppo dell'acceleratore è poi stato suddiviso in tre fasi comportanti utilizzi diversi dell'acceleratore. Le diverse fasi si succederanno in concomitanza con la disponibilità dei finanziamenti. In mancanza del finanziamento necessario a finire una fase, la stessa sarà realizzata parzialmente, con obiettivi intermedi che saranno definiti al momento. La prima fase prevede la costruzione dell'acceleratore fino all'energia di 70 MeV. A questo stadio sarà possibile l'uso dell'acceleratore per produzione di radioisotopi PET e terapia del melanoma oculare. Nella seconda fase verrà completato l'acceleratore sino all'energia di circa 200

MeV con un unico fascio fisso ad energia variabile, mentre nell'ultima fase verrà effettuato il completamento della struttura per protonterapia e la realizzazione del "gantry".

Per quanto riguarda il bunker di contenimento, le necessità dell'acceleratore determineranno alcuni parametri del progetto edile e, viceversa, eventuali vincoli sul progetto edile potranno condizionare alcune scelte tecniche.

L'Istituto "Regina Elena" si è dichiarato favorevole a mettere a disposizione gli spazi necessari alla realizzazione del bunker e fornirà le necessarie attrezzature diagnostiche e le competenze idonee ad una radioterapia di alto livello qualitativo.

Altro punto importante è stata la discussione sugli elementi essenziali per la progettazione dei sistemi di controllo. Questa, nel caso di un acceleratore compatto, pone problemi speciali, mai in pratica affrontati in altre situazioni. Quindi assume particolare rilevanza lo studio di tutto il sistema di controllo, che va progettato e realizzato parallelamente e congiuntamente alla macchina stessa, per consentire di avere la massima affidabilità dell'acceleratore stesso.

E' stato deciso che il sistema di controllo dovrà: agire sui parametri della macchina per avviarla e segnalare gli eventuali guasti agli impianti di raffreddamento, alimentazione, iniezione, schermaggio, onde impedire l'avviamento in condizioni non sicure; impostare le variabili di macchina per ottenere le volute caratteristiche (corrente, energia) del fascio di protoni; controllare che il funzionamento della macchina sia corretto e, in caso di guasto, interromperlo; impostare e controllare i parametri di radioterapia e di dosimetria.

Per quanto riguarda la testata isocentrica, essa è costituita da un supporto di acciaio che sostiene i magneti necessari per curvare il fascio e che gira intorno ad un asse, lungo il quale è situato il paziente. Essa deve garantire una precisione dell'indirizzamento di 1 mm e una distanza sorgente-focolaio tumorale di 2-3 metri. A causa di queste richieste nel passato si sono costruite testate molto pesanti (100 t) e

ingombranti (12 m di diametro) come a Loma Linda. Le tendenze più moderne prevedono un generale compattamento del dispositivo (5 m di diametro nella testata proposta dalle Ion Beam Applications). La testata è un apparato importante e la sua necessità e le sue specifiche di ordine clinico sono state oggetto di importanti analisi in termini dei suoi requisiti specifici nel caso di utilizzazione in un acceleratore compatto, quale quello in progetto.

Un progetto di queste dimensioni, che necessariamente avrà uno sviluppo pluriennale, richiede in parallelo l'approfondimento di temi di ricerca fondamentali nel campo della biofisica, della radiobiologia oncologica e della dosimetria e microdosimetria, nonché il confronto delle diverse tecniche di accelerazione, la realizzazione di prototipi e la valutazione approfondita dell'efficacia clinica e dei piani di trattamento.

A questi fini, il progetto è stato articolato nei seguenti sottoprogetti, caratterizzati dalle corrispondenti linee di ricerca:

1) *Prototipo di acceleratore compatto e di testata isocentrica*: a) Progettazione e realizzazione dell'acceleratore e della testata.

2) *Dosimetria e microdosimetria*: a) Sviluppo e costruzione di metodi dosimetrici per fasci terapeutici di protoni con particolare riguardo alla dosimetria di base, clinica e *in vivo*; b) sviluppo e costruzione di sistemi dosimetrici per il monitoraggio del fascio *t* terapeutico; c) sviluppo e costruzione di sistemi microdosimetrici per lo studio della deposizione locale di energia.

3) *Biofisica e radiobiologia dei protoni*: a) Caratteristiche biofisiche e radiobiologiche dei protoni; b) metodi di valutazione dell'efficacia biologica di protoni nelle condizioni di interesse terapeutico; c) sviluppo di modelli sui meccanismi d'azione; d) sviluppi di test predittivi della risposta tumorale alla radioterapia.

4) *Rete multimediale per terapia con protoni*: a) Richieste cliniche sulle immagini diagnostiche da usare per i pia-

ni di trattamento e metodologia della loro combinazione informatica; b) programmi di simulazione per piani di trattamento con radiazioni convenzionali e protoni; c) trasmissione a distanza di immagini diagnostiche e piani di trattamento; d) connessioni multimediali per definizione di piani di trattamento tra terapisti localizzati in sedi diverse.

5) *Efficacia clinica e piani di trattamento*: a) Studio degli effetti differenziali di trattamenti radioterapici convenzionali o con fasci di protoni su linee cellulari neoplastiche, derivate da tumori ematopoietici o da tumori solidi, con la valutazione della proliferazione e del ciclo cellulare, dell'apoptosi e del potenziale differenziativo dopo stimoli appropriati; b) studio degli effetti differenziali di trattamenti radioterapici convenzionali o con fasci di protoni su cellule ematopoietiche normali murine, in particolare cellule progenitrici e staminali, con saggio clonogenetico *in vitro* e ripopolante *in vivo*; c) studio condotto come in b) su cellule ematopoietiche normali umane; d) valutazione, simulazione dei piani di trattamento radioterapici, con particolare riguardo all'analisi comparata fra fasci di protoni e fasci convenzionali; e) valutazione dell'uso per ricerca e diagnosi di isotopi radioattivi prodotti dall'acceleratore; f) selezione dei pazienti suscettibili di ottenere il migliore risultato terapeutico e lo svolgimento del relativo "follow-up".

Il profondo grado di innovazione e di ricerca e sviluppo che caratterizza il progetto ha poi portato a ritenere impossibile il suo sviluppo integrale unicamente attraverso risorse umane e competenze presenti in Istituto e ciò spiega perché si ricercherà la collaborazione delle migliori competenze esistenti nella realtà nazionale nel settore, con il conseguente trasferimento di risorse finanziarie.

In particolare, sono in corso di svolgimento discussioni su possibili collaborazioni con l'ENEA, in relazione alla progettazione della macchina, con la Fondazione TERA per quanto riguarda il suo sistema di controllo, e con l'Istituto

"Regina Elena" per quanto riguarda l'analisi dei piani di trattamento. Una prima analisi della situazione nazionale nei riguardi delle ricerche in radiobiologia ha portato ad individuare possibili collaborazioni esterne con le Università di Firenze, Milano, Napoli e Pavia, con i Laboratori nazionali dell'INFN di Legnaro, con l'Istituto FRAE-CNR di Bologna e con l'ENEA. La stessa analisi, svolta nei riguardi delle ricerche di metrologia, ha portato ad individuare possibili collaborazioni esterne con gli Ospedali civili di Brescia, l'ENEA, l'Università di Ferrara, l'Università cattolica del "Sacro Cuore" e i Laboratori nazionali di Legnaro dell'INFN. Possibili collaborazioni esterne con l'Università di Genova e con l'INFN sono previste, infine, per l'attività relativa alla realizzazione della rete multimediale.

Progetto
Terapia genica
Responsabile scientifico:
Cesare Peschle

La terapia genica rappresenta una delle aree di ricerca a più rapida evoluzione, che attrae un interesse crescente nella comunità scientifica e in quella extra-scientifica.

Le metodologie di terapia genica di cellule somatiche mirano a trasdurre ed esprimere sequenze di DNA nelle cellule target, nell'intento di modificarne il fenotipo a fini terapeutici. Ovviamente, non vengono comprese nella terapia genica le manipolazioni genetiche della linea germinale, che sono universalmente considerate inaccettabili.

E' opportuno sottolineare che la terapia genica è un approccio di ricerca del tutto fisiologico: in effetti essa si avvale, in forma ancora relativamente grezza ma strettamente finalizzata a scopi terapeutici, di meccanismi di integrazione ed espressione di sequenze di DNA, che sono fisiologicamente operativi nelle cellule viventi, e costituiscono un aspetto fondamentale della loro vita biologica.

Le potenzialità applicative della terapia genica sono difficilmente sopravvalutabili. Nella comunità scientifica è largamente diffusa l'opinione che le terapie geniche saranno il settore di maggior rilievo terapeutico nel prossimo

decennio. E' quindi in atto, in tutte le nazioni scientificamente avanzate, un processo quanto mai incisivo di promozione scientifica, organizzativa e finanziaria dei programmi di ricerca focalizzati sulla terapia genica.

Nell'ultimo decennio la ricerca biotecnologica ha sviluppato le tecnologie alla base della terapia genica. Sono stati tentati diversi approcci sperimentali per l'introduzione di un gene in cellule somatiche (trasferimenti di DNA nudo o complessato in un sistema "carrier", trasduzione di DNA mediante virus difettivi per la replicazione o cellule somatiche geneticamente modificate), allo scopo di soddisfare i criteri di efficienza, stabilità e sicurezza indispensabili per l'applicazione clinica. Alla luce dei risultati sinora ottenuti soltanto l'utilizzo dei vettori virali (retrovirali o a DNA) sembra rispondere a tali requisiti.

All'inizio degli anni '90 è iniziata la terapia genica a livello clinico, in particolare nella sindrome ereditaria SCID da gene ADA difettivo, mediante trasduzione del gene ADA normale in cellule T linfoidi e/o staminali ematopoietiche. Altre sperimentazioni hanno successivamente riguardato altre patologie ereditarie o acquisite (ad es., la fibrosi cistica) e i trattamenti anti-neoplastici.

Il Programma sulla terapia genica promosso dall'Istituto nel 1995, e divenuto operativo nel 1996, è limitato a taluni aspetti emergenti di particolare interesse, coltivati da gruppi di ricerca intra- ed extramurali di livello scientifico internazionale. Esso si articola in due sottoprogetti: a) Terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche e b) Terapia genica nei tumori solidi e nelle malattie cardiovascolari. I sottoprogetti a loro volta si articolano rispettivamente in 4 e 7 linee di ricerca/unità operative.

a) Il sottoprogetto "Terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche" ha particolare rilevanza per le sue potenziali applicazioni nel campo preclinico e clinico. Gli obiettivi a medio termine mirano a sviluppare e migliorare le metodologie di trasduzione genica attualmente disponibili, sia per quanto riguarda i vettori utilizzati, sia per quanto riguarda l'espressio-

ne dei geni trasdotti, utilizzando come "target" cellule staminali ematopoietiche umane. Per quanto riguarda queste ultime, è necessario procedere alla loro purificazione/caratterizzazione e successivamente alla loro amplificazione, senza che esse perdano la loro caratteristica staminale di autoreplicazione. La capacità delle cellule staminali di ripopolare a lungo termine il midollo osseo e gli altri siti ematopoietici sarà valutata nel modello del topo SCID.

L'espressione di geni esogeni, trasdotti mediante un efficiente sistema retrovirale, sarà controllata sulla base di diversi parametri: inducibilità, espressione linea o stadio-specifica ed espressione a lungo termine.

Saranno effettuati studi per la terapia genica *in vitro* mediante oligonucleotidi "antisense" per la proteina di fusione bcr/abl, utilizzando cellule staminali ottenute da pazienti con leucemia mieloide cronica (LMC) oppure modelli animali, come il topo SCID ripopolato con cellule staminali provenienti da pazienti con LMC.

Secondo un altro approccio di ricerca, le cellule staminali purificate, caratterizzate ed espanse *in vitro*, saranno indotte a differenziare nelle varie linee ematopoietiche, per studiare l'espressione e il ruolo funzionale dei geni dei fattori di trascrizione "lineage"-specifici nel processo della proliferazione e differenziazione ematopoietica.

Lo studio sarà complementato dall'uso di un modello clinico, rappresentato dalle cellule leucemiche primarie umane, in cui il clone è "congelato" ad un particolare stadio di differenziazione per una o più linee ematopoietiche. Lo studio del "pattern" di espressione di geni di potenziale rilievo funzionale (ad es., recettori di fattori di crescita) potrà migliorare le conoscenze dei meccanismi che sono alla base del blocco del differenziamento e della proliferazione tumorale dei cloni neoplastici. Questi studi favoriranno le nuove strategie che tendono ad esplorare la possibilità di modificare lo stato proliferativo e differenziativo delle cellule leucemiche umane agendo su geni regolatori specifici.

b) Sottoprogetto "Terapia genica nei tumori solidi e nelle malattie cardiovascolari". Anche questo sottoprogetto presenta un'elevata potenzialità scientifico-clinica.

Per l'aspetto oncologico, vengono proposti:

1) Studi per ottimizzare il trasferimento genico mediante vettori retrovirali modificati con l'inserzione di una sequenza IRES. I geni HOX codificano fattori di trascrizione necessari allo sviluppo embrionale e sono implicati nel controllo della proliferazione cellulare e nel differenziamento. L'identificazione di un trascritto bicistonico per i geni HOXD4/HOXD3 ha messo in evidenza una sequenza IRES nella regione intercistonica. Lo scopo dello studio è caratterizzare le sequenze funzionali di questo elemento, analizzando l'attività di sequenze normali o mutagenizzate e comparandole ad elementi analoghi virali, con lo scopo finale di ottenere un'IRES umana da testare per la capacità di produrre proteine multiple nelle cellule "target".

2) Un secondo obiettivo è quello di ottenere cellule antigeniche modificate per terapia genica da utilizzare come vaccino per stimolare la risposta immune dell'ospite. Gli studi iniziali di tipo preclinico porteranno alla trasduzione dei geni della IL-2 e/o B7 in linee cellulari di melanoma, selezionate in modo che la maggioranza degli epitopi antigenici vengano riconosciuti dalle cellule T-citotossiche. Saranno poi testati il fenotipo e l'immunogenicità *in vitro*, per verificare se la contemporanea trascrizione di entrambi i geni fornisce un'attività stimolatoria maggiore a confronto delle cellule trasdotte con uno solo dei due geni. Infine, il progetto si propone di testare *in vivo* le linee cellulari come vaccino in pazienti con melanoma metastatico per valutare l'immunogenicità, la tossicità e la risposta clinica.

3) Un ulteriore studio per ottenere vaccini antitumorali sarà realizzato utilizzando cellule di adenocarcinoma mammario di topo (TSA) ingegnerizzate per liberare IL-2 o IL-4 o IL-10 nel sito tumorale. Questo studio, condotto in collaborazione da tre laboratori, mira a rispondere ad alcuni

quesiti: quale tipo di vaccino sia in grado di indurre una memoria immunologica efficace da proteggere contro le cellule tumorali, quale sia in grado di curare i tumori iniziali o le metastasi spontanee dopo chirurgia tumorale, se altri tumori murini possano essere trattati in questo modo, se sia possibile preimmunizzare i topi con il rischio di indurre invece tumori. Tale ricerca consentirà anche di apportare nuove conoscenze sulle basi cellulari dei meccanismi immunitari anti-tumorali.

4) Sempre nel campo dei tumori solidi, saranno effettuati studi preclinici per testare l'efficacia antitumorale di vaccini, utilizzando cellule tumorali di topo geneticamente modificate con i geni dell'interferone (IFN) α -2b, da solo o in associazione con il virus della timidinachinasi del virus *Herpes simplex* (HVS-TK). Gli studi richiederanno la preparazione e caratterizzazione di linee cellulari "packaging" che producono retrovirus ricombinanti contenenti il gene di IFN α -2b con associazione di TK: la trasduzione delle linee cellulari tumorali di carcinoma ovarico o linfoma B con la formazione di "master cell banks" e "working cell banks" e l'uso delle cellule geneticamente modificate nel modello chimerico rappresentato dal topo SCID ricostituito con linfociti di sangue periferico umano e trapiantato con le cellule tumorali.

Nel settore delle malattie cardiovascolari, sono stati presentati progetti di ricerca pioneristici di terapia genica della ristenosi coronarica e carotidea.

1) Un primo approccio di ricerca vuole accertare la fattibilità di una terapia genica atta a prevenire la ristenosi che si presenta frequentemente con la tecnica della angioplastica coronarica percutanea, il cui meccanismo cellulare è poco conosciuto. Il DNA plasmidico verrà trasferito nelle cellule muscolari lisce dei vasi per studiare l'effetto *in vivo* delle proteine mutanti transdominanti negative, coinvolte nella trasduzione del segnale (ad es., ras), sulla formazione della neointima dopo la lesione vascolare.

Gli esperimenti saranno effettuati *in vivo* nel ratto o nel coniglio.

2) Un secondo approccio alla prevenzione della ristenosi è basato sulla potenziale efficacia di una variante molecolare della apolipoproteina A-I (ApoA-I), componente delle HDL e responsabile dell'attività antiaterogena. L'obiettivo a breve termine è quello di sviluppare vettori di espressione per la variante Apo A-I Milano, che conferisce ai portatori un diminuito rischio coronarico, e valutarne il metodo di somministrazione più efficace nel modello animale del coniglio. L'effetto del trattamento sarà testato su sezioni dell'arteria carotidea. I costrutti di espressione, impiegati nella prima parte dello studio, saranno poi usati per sviluppare modelli transgenici per la ApoA-I Milano.

3) Un ulteriore approccio mira a verificare il possibile uso di iniezioni locali intramuscolari di DNA "nudo" contenente il cDNA della apolipoproteina E4 nella terapia della aterosclerosi sperimentale, dopo eliminazione del gene ApoE che rende gli animali ipercolesterolemici (modello del topo transgenico). L'effetto protettivo sarà valutato dalla diminuzione dei lipidi plasmatici e della riduzione delle lesioni arterosclerotiche. Verrà anche chiarito l'eventuale ruolo degli anticorpi verso la proteina nel determinarne l'effetto.

Progetto

Tubercolosi

Responsabile scientifico:

Antonio Cassone

Il progetto nazionale "Tubercolosi" è nato con la prospettiva di incoraggiare e se possibile, coordinare la ricerca nel settore in Italia, per renderla idonea ad intercettare il fabbisogno di sanità pubblica per una malattia pericolosamente riemergente. Si tratta di ricerche che complementano gli interventi istituzionali dell'Istituto Superiore di Sanità e ne forniscono solide basi razionali e scientifiche.

Il progetto ha ricevuto 136 proposte, le più numerose nel settore dell'epidemiologia e della patogenesi ed immunità. La