



Università degli Studi di Firenze

Dipartimento di Patologia e Oncologia Sperimentali

Scuola di Dottorato di Ricerca in Oncologia Sperimentale e Clinica

XXIV Ciclo

(MED/04 – Patologia Generale)

Tesi di Dottorato di Ricerca

“Peptidi dendrimerici per tumor targeting nel cancro del pancreas”

Candidato: Dr. Lapo Bencini

Coordinatore del Dottorato:
Prof. Persio Dello Sbarba

Tutor:
Prof. Persio Dello Sbarba

26 gennaio 2012

SOMMARIO

RIASSUNTO	2
Introduzione.....	2
Materiali e metodi.....	3
Risultati.....	4
Conclusioni.....	5
INTRODUZIONE	6
Il cancro del pancreas.....	6
Presentazione clinica, diagnosi e stadiazione.....	9
Opzioni terapeutiche.....	11
LA BIOLOGIA DEL CANCRO DEL PANCREAS E LE TERAPIE MIRATE.....	13
Meccanismi molecolari nel cancro del pancreas.....	13
Targeted therapy.....	16
I PEPTIDI COME POSSIBILE ARMA.....	28
Peptidi come sistema di drug-delivery.....	28
La Neurotensina (NT).....	29
MATERIALI E METODI.....	36
Obiettivi dello studio.....	36
Popolazione di studio.....	36
Disegno dello studio.....	38
Organizzazione dello studio.....	38
Metodologia di analisi e metodi statistici.....	43
RISULTATI.....	45
Caratteristiche della popolazione di studio.....	45
Selezione dei pazienti con adenocarcinoma pancreatico (PDAC).....	45
Risultati della fluorescenza.....	47
DISCUSSIONE.....	50
Prospettive future di applicazione.....	45
CONCLUSIONI	58
BIBLIOGRAFIA.....	59

RIASSUNTO

Introduzione

Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare la capacità da parte di un peptide ramificato (dendrimerico) - *Neurotensina D4* - di riconoscere in maniera specifica bersagli (target) tumorali molecolari. Il potenziale sviluppo di tali molecole in vivo potrebbe portare ad un importante passo avanti nella diagnostica e nella terapia di vari tumori, in particolare quello dell'adenocarcinoma pancreatico.

L'osservazione che recettori per peptidi regolatori endogeni sono over-espresi in alcuni tipi di tumore ha rappresentato la base di partenza per un possibile utilizzo di peptidi naturali diretti selettivamente contro le cellule tumorali.

Il Laboratorio di Biotecnologie Molecolari del Dipartimento di Biotecnologie dell'Università degli Studi di Siena ha dimostrato che la sintesi di peptidi dendrimerici, ovvero ramificati, oltre a mantenere l'attività biologica della sequenza lineare di partenza, ne aumenta la resistenza alla degradazione da parte di peptidasi e proteasi. In questo ambito sono stati ottenuti risultati soddisfacenti utilizzando peptidi dendrimerici rivolti contro recettori noti per essere over-espresi in alcuni tipi di tumore, sia su cellule che in animali da esperimento.

Il presente studio prevedeva di poter estendere tale indagine in vitro a campioni di tessuti umani provenienti da pazienti sottoposti a chirurgia oncologica programmata (adenocarcinoma del pancreas) ed operati dal Prof. Renato Moretti o dal suo staff afferente alla Struttura Operativa Dipartimentale (SOD) di Chirurgia Generale ed Oncologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze.

La parte principale dello studio è stata effettuata su frammenti di tessuto tumorale di circa 3 mm di diametro, prelevati su banco dall'intero tumore

precedentemente asportato a scopo curativo, secondo gli standard abituali della SOD di Chirurgia Generale ed Oncologica. I frammenti prelevati sono stati analizzati utilizzando come traccianti peptidi dendrimerici neosintetizzati, tramite immunofluorescenza e microscopia confocale.

Materiali e metodi

Nel corso di precedenti studi è stato dimostrato che sia Neurotensina (NT) che il suo frammento attivo NT (8-13), una volta sintetizzati in forma dendrimerica tetraramificata, mantengono completamente la loro attività biologica e diventano molto più resistenti alle proteasi plasmatiche. Il recettore per il peptide regolatore endogeno Neurotensina (NT) è noto per essere over-espresso su numerosi tumori solidi, tra cui gli adenocarcinomi di pancreas, colon, prostata e polmone. Gli analoghi sia di NT che di NT(8-13) marcati con opportune Unità Funzionali, possono essere seguiti per il loro legame e successiva internalizzazione su linee cellulari provenienti da tumori umani, note per over-esprimere il Recettore per Neurotensina.

Lo studio si proponeva di valutare la capacità di tali peptidi di riconoscere selettivamente in vitro antigeni tumorali provenienti da campioni di tessuti ottenuti da pazienti sottoposti a chirurgia oncologica programmata ed operati dal Prof. Renato Moretti e dal suo staff presso la Struttura Dipartimentale Ospedaliera di Chirurgia Generale ed Oncologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, di Firenze.

Trattandosi di uno studio sperimentale in vitro, i pazienti non sono stati sottoposti a nessuna manovra né trattamento aggiuntivo nelle fasi preoperatoria, operatoria e di degenza. Il prelievo dei campioni inoltre non ha pregiudicato la normale analisi istopatologica sui tessuti asportati.

I campioni prelevati dai tumori asportati sono stati analizzati tramite immunofluorescenza e microscopia confocale utilizzando come traccianti i peptidi dendrimerici preparati presso il Laboratorio di Biotecnologie Molecolari dell'Università degli Studi di Siena.

Lo studio è stato suddiviso in 3 fasi principali: la *Fase A* - Sintesi dei peptidi dendrimerici coniugati a varie Unità Funzionali e valutazione della loro bioattività (stabilità alle proteasi e capacità di legame al bersaglio); *Fase B* - Raccolta di frammenti microscopici di tessuto umano provenienti da pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia oncologica programmata, presso la Struttura Dipartimentale Ospedaliera di Chirurgia Generale ed Oncologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze; *Fase C* - Trattamento di ciascun campione con peptidi dendrimerici coniugati ad opportune unità fluorofore e successivamente analizzato tramite microscopia a fluorescenza e microscopia confocale.

E' stata analizzata e confrontata la risposta tra tessuto normale e tumorale di ciascun paziente con l'obiettivo di valutare la capacità discriminante di ciascun peptide per tipologia di tumore studiato. Il dato qualitativo ottenuto dall'analisi tramite microscopio è stato trasformato tramite un apposito software (ImageJ, NIH) in un numero continuo finito. Le variabili di natura continua sono state riassunte mediante appropriate statistiche descrittive (media, deviazione standard, mediana, minimo e massimo).

Risultati

Sono stati arruolati nel presente studio 33 pazienti per una durata complessiva dello studio di 3 anni. La variabile oggetto dello studio statistico è rappresentata dalla risposta dei campioni alle analisi condotte tramite immunofluorescenza e microscopia confocale.

La significatività statistica (posto $p < 0.05$) tra la risposta del tessuto sano e tumorale è stata valutata tramite un apposito software statistico. La fluorescenza media dei campioni di tessuto tumorale, calcolata come la media delle fluorescenze ottenute in sezioni di tessuto è risultata significativamente superiore alla corrispettiva dei tessuti sani, calcolata in maniera analoga e confrontata mediante test non parametrico per campioni appaiati.

Conclusioni

La dimostrazione della capacità da parte di un peptide ramificato (dendrimerico) - *Neurotensina D4* - di riconoscere in maniera specifica bersagli (target) tumorali molecolari su tessuti umani di adenocarcinoma pancreatico incoraggia verso il potenziale sviluppo di tali molecole in vivo.

In futuro, tali peptidi potrebbero portare ad un importante passo avanti nella diagnostica e nella terapia di tumori altamente letali e resistenti alle chemioterapie convenzionali.

INTRODUZIONE

Il cancro del pancreas

L'adenocarcinoma del pancreas è uno dei cancri più letali, rappresentando, negli Stati Uniti, la quarta causa di morte per cancro, con un'incidenza di oltre 43,000 nuovi casi per anno, di cui quasi 37,000 con esito letale (*Jemal2010*). L'incidenza resta comunque bassa, inferiore a 10 nuovi casi per 100,000 abitanti per anno nella maggior parte dei Paesi occidentali (*Massoneuve 2010, Jemal 2011*). Fra quelli dell'apparato gastroenterico è, invece, la seconda principale causa di morte, dopo il tumore del colon-retto. Il più frequente istotipo è l'adenocarcinoma duttale, spesso usato come sinonimo o paradigma di "cancro del pancreas", rappresentando il 90% circa delle neoplasie maligne del pancreas (Figura 1).

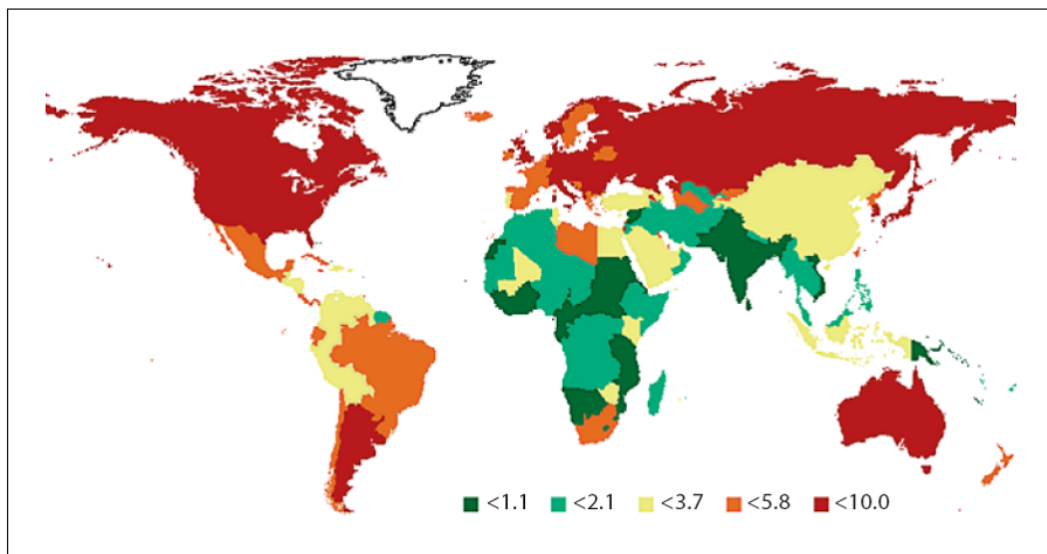


Figura 1. Incidenza del cancro del pancreas nel mondo (casi/anno/100,000 ab.) (Adattata e modificata da *Massoneuve 2010*).

Le altre varianti possono essere originate dalla componente esocrina (adenocarcinoma mucinoso, carcinoma a cellule acinari, adenocarcinoma squamoso, carcinoma anaplastico) o da quella endocrina (es. gastrinomi o insulinomi maligni). La biologia e la storia naturale delle varianti maligne di origine endocrina

sono completamente diverse, oltre che rarissime, ed esulano dalle considerazioni successive. Un capitolo a parte meriterebbe la trattazione delle neoplasie cistiche del pancreas che, tuttavia, rappresentano un dilemma diagnostico-terapeutico, includendo uno spettro di aggressività che va dal francamente benigno al francamente maligno passando per quadri di malignità intermedia (Figura 2).

La causa di insorgenza rimane sostanzialmente, sconosciuta, sebbene siano stati storicamente implicati fattori ambientali e genetici (Zavoral 2011). Fra i primi, solamente il fumo di sigaretta si è dimostrato incrementarne l'incidenza nei gruppi esposti rispetto ai non esposti. Indagati, ma non confermati in studi epidemiologici solidi, il consumo di alcol, caffeina, aspirina, la dieta ad alto tasso lipidico, la cirrosi, il diabete e la pancreatite (Hidalgo 2010, Massoneuve 2010, Vincent A 2011).

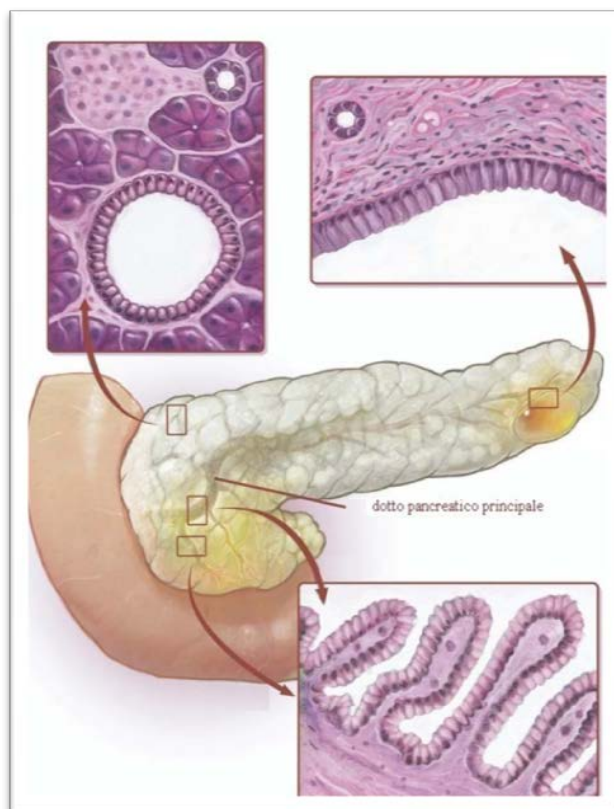


Figura 2. Potenziali siti di origine dei tumori del pancreas.

Tra il 5 ed il 10% dei pazienti affetti esiste una storia familiare di cancro del pancreas, mentre in alcuni sono presenti vere e proprie sindromi genetiche

(mutazioni delle cellule germinali). Implicati si sono rivelati i geni coinvolti nel meccanismo di riparazione del DNA, come ad esempio BRCA2 (*Jemal 2010, Vincent A 2011*).

La sopravvivenza complessiva a 5 anni è inferiore al 6%, in una recente ed aggiornata banca dati statunitense (*Horner 2009*), con una aspettativa di vita media di circa 18 mesi dalla diagnosi, in pazienti operati con finalità radicale e nessun apparente residuo di malattia. Casistiche simili, altrettanto insoddisfacenti, sono disponibili in studi epidemiologici europei (*Brenner 2009*) ed in Italia (*Artiom 2011*). La natura intrinsecamente maligna del cancro del pancreas è dovuta principalmente alla sua crescita estremamente aggressiva ed alla rapida capacità di metastatizzare a distanza, rendendone il trattamento estremamente difficoltoso. In

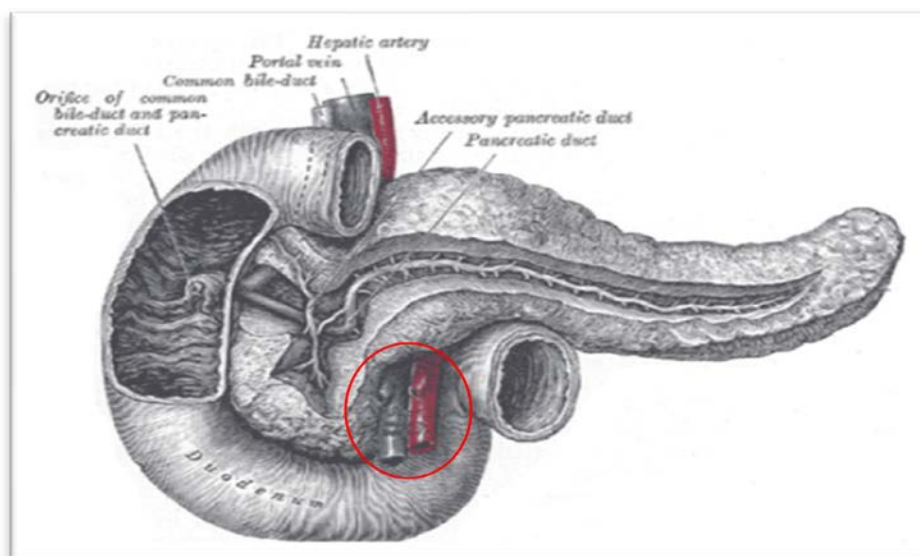


Figura 3. Vasi mesenterici superiori – rapporti anatomici con il pancreas.

aggiunta a queste caratteristiche, l'adenocarcinoma pancreatico è localmente invasivo, circondato da una reazione desmoplastica evidente, che coinvolge gli organi e le strutture adiacenti (es. vasi mesenterici superiori, asse portale), limitandone la possibilità di una resezione chirurgica macroscopicamente completa (R0) (Figura 3).

Infatti, soltanto meno del 20% dei malati sono candidati all'intervento chirurgico resettivo o, potenzialmente, curativo, al momento della diagnosi, mentre quasi la metà si presenta con già metastasi a distanza. Inoltre, la maggior parte di coloro sottoposti ad intervento chirurgico "radicale" svilupperà una recidiva di malattia entro 15 mesi.

Presentazione clinica, diagnosi e stadiazione

In linea generale, la sintomatologia del cancro del pancreas è quanto mai tardiva, da cui scaturisce la grande percentuale di malati giudicati "inoperabili" al momento della diagnosi stessa.

L'esordio, in genere, dipende principalmente da due fattori: dalla localizzazione nell'organo (testa o corpo-coda) e dallo stadio di malattia (localizzato o metastatico). Circa 2/3 dei cancri originano appunto dalla testa, ove comprimendo la via biliare terminale causano ittero colestatico ingravescente poco doloroso o con qualche vago sintomo dispeptico, mentre più tardivamente compaiono i sintomi dell'ostruzione duodenale (vomito) o del sanguinamento digestivo alto. Nei restanti casi a partenza dal corpo-coda pancreatico, i sintomi sono ancora più sfumati ed aspecifici, potendosi riscontrare vago dolore addominale, episodi pancreatitici, intolleranza ai glucidi. In tutti i casi vi si possono associare sintomi da cachessia come l'astenia, anoressia, il dimagrimento o da fenomeni paraneoplastici (es. tromboflebiti). L'esame obiettivo fisico, a parte l'ittero, può essere del tutto negativo ovvero rivelare ascite, masse addominali palpabili o metastasi a distanza (*Freelove 2006*).

Sebbene l'iter diagnostico, in molti casi, cominci con l'ecografia dell'addome e con degli esami ematici di routine, il cardine della diagnosi è rappresentato dalla

Tomografia Assiale Computerizzata (TAC) con mezzo di contrasto iodato in vena che, oltre a permettere la diagnosi ha un alto valore prognostico, definendo l'operabilità ed escludendo o confermando la presenza di invasione di organi adiacenti (Hidalgo 2010). Complementari sono l'Ecoendoscopia e la Colangiopancreatografia Retrograda Endoscopica (ERCP), quest'ultima in grado di fornire anche delle buone opzioni di trattamento palliativo (es. stent biliare per la remissione dell'ittero) e la Tomografia ad Emissione di positroni (PET). Il classico antigene tumorale glicoproteico CA 19.9 è poco sensibile e sufficientemente specifico, ma viene riservato per il monitoraggio terapeutico ed il follow-up.

Altre metodiche, come la Risonanza magnetica Nucleare (RMN), possono essere utili per la ricerca di eventuali metastasi a distanza (es. fegato nei casi dubbi) o per la diagnosi differenziale con neoplasie primitive della via biliare. La biopsia preoperatoria è di solito superflua, tecnicamente indaginosa (es. biopsia percutanea eco o TAC guidata, biopsia sotto guida eco-endoscopica) o non scevra da complicanze (es. disseminazione tumorale).

La stadiazione segue gli standard dell'American Joint Committee on Cancer (AJCC) basata sui parametri T (Tumor) N (Node) M (Metastasis) (Figura 4), sebbene altri fattori più strettamente chirurgici siano recentemente stati proposti come predittori prognostici (Hartwig 2011).

Stage	Tumor Grade	Nodal Status	Distant Metastases	Median Survival† mo	Characteristics
IA	T1	N0	M0	24.1	Tumor limited to the pancreas, ≤2 cm in longest dimension
IB	T2	N0	M0	20.6	Tumor limited to the pancreas, >2 cm in longest dimension
IIA	T3	N0	M0	15.4	Tumor extends beyond the pancreas but does not involve the celiac axis or superior mesenteric artery
IIB	T1, T2, or T3	N1	M0	12.7	Regional lymph-node metastasis
III	T4	N0 or N1	M0	10.6	Tumor involves the celiac axis or the superior mesenteric artery (unresectable disease)
IV	T1, T2, T3, or T4	N0 or N1	M1	4.5	Distant metastasis

* N denotes regional lymph nodes, M distant metastases, and T primary tumor.

† Data are from Bilimoria et al.⁴⁹

Figura 4. Stadiazione e prognosi stadio-correlata nel cancro del pancreas (Hidalgo 2010).

Opzioni Terapeutiche

La pessima sopravvivenza associata al cancro del pancreas è, nella maggioranza dei casi, strettamente correlata allo stadio avanzato di malattia al momento della diagnosi. L'unica possibilità di cura è, comunque la chirurgia, sebbene pochi siano i pazienti operabili, al prezzo di una non trascurabile morbilità e mortalità perioperatoria (*Alberts 2007, Bown 2009*). Inoltre anche i pazienti con malattia apparentemente localizzata e suscettibile di resezione, presentano già micrometastasi. E' quindi ovvio che, sebbene la chirurgia rimanga il cardine del piano terapeutico, sia necessario implementare la ricerca circa le modalità adiuvanti di trattamento (*Yang 2005*). Queste ultime sono principalmente rappresentate, con risultati contrastanti, dalla chemioterapia, a base di antimetaboliti della sintesi degli acidi nucleici (5-fluorouracile e gemcitabina) in Europa e dalla radio-chemioterapia, negli Stati Uniti (*Vincent A 2011*). Entrambi gli approcci sono impiegati sia come aggiunta alla chirurgia che come unica via percorribile nei pazienti inoperabili con malattia avanzata (*Hochster 2006, Zuckerman 2008, Brown 2009*).

La conclusione è, ovviamente, che la miglior speranza di fare qualche progresso nella terapia del cancro del pancreas resti, a tutt'oggi, lo sviluppo di una qualche terapia sistemica (*Brown 2009*). Tuttavia, il sostanziale fallimento degli approcci terapeutici sopradescritti, combinati e non, ha portato la ricerca verso la direzione di studio della biologia molecolare (*Ranganathan 2009*) e delle terapie mirate a bersaglio molecolare “*Targeted Therapy*” (*Boria-Cacho 2009*), allo scopo di trattare i pazienti con un metodo multimodale integrato (*Rivera 2009, Vincent A 2011*).

Recentemente sono state prese in seria considerazione l'efficacia di alcune molecole a bersaglio molecolare quali gli anticorpi contro l'IGF-1, i CTLA-4 ed i recettori per i fattori di crescita epiteliale (HER family), mentre nuovi chemioterapici

come la famiglia degli epotiloni (taxani) presenti in studi clinici controllati (*Dimou 2011*). Tutte queste molecole si sono dimostrate estremamente promettenti nel futuro della terapia sistemica del cancro del pancreas (*Merika 2010*).

LA BIOLOGIA DEL CANCRO DEL PANCREAS E LE TERAPIE MIRATE

Meccanismi molecolari nel cancro del pancreas

In analogia a quanto più solidamente dimostrato in altre neoplasie (es. cancro del colon - sequenza adenoma-carcinoma), il cancro del pancreas sembra originare dall'epitelio duttale attraverso lo sviluppo di lesioni precancerose, mediante un meccanismo a tappe (o *step*). Ciascun *step* verso la progressione neoplastica sarebbe guidato dall'accumularsi di una o più mutazioni genetiche.

I precursori cancerosi vengono detti Neoplasie Intraepiteliali Pancreatiche (PanIN), a loro volta suddivise in gradi più o meno gravi di atipie cellulari (da IA e B fino a III), fino a divenire veri e propri carcinomi invasivi (*Hidalgo 2010, Mihaljevic 2010, Vincent A 2011*). Gli altri possibili precursori del carcinoma invasivo sono rappresentati dall'IPMN (Neoplasia Mucinoso Papillare Intraduttale) e dai tumori cistici mucinosi, progredendo con meccanismi simili, ma di più difficile dimostrazione.

Numerose sono le anomalie genetiche riscontrate nel cancro del pancreas "sporadico" ed in quello di tipo "ereditario" o "familiare", ma in generale sono coinvolte anche le modificazioni epigenetiche e quelle dei miRNA (*Hong SM, Ranganathan 2009*). Sintetizzando, però, le mutazioni di più frequente riscontro e di più provata azione cancerogena alla base della sequenza di eventi che parte da una cellula sana ad una neoplastica sono rappresentate dall'attivazione di alcuni oncogeni (es. KRAS) e dall'inattivazione di geni oncosoppressori (es. CDKN2, TP53, SMAD4) (Figura 5). Altri pathway neoplastici coinvolti nella cancerogenesi pancreatico includono l'Hedgehog, il Notch e inibizione dell'apoptosi mediante la via recettoriale (TRAIL) e mitocondriale (BCL) (*Mihaljevic 2010*).

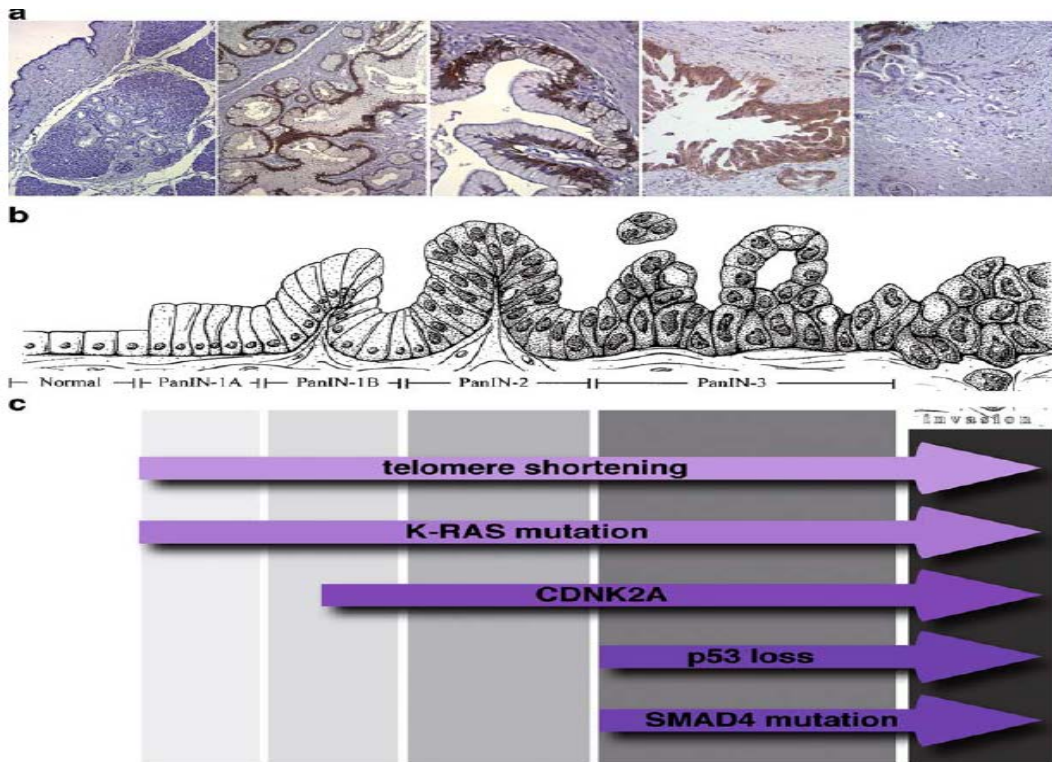


Figura 5. Schema della progressione neoplastica dall'epitelio normale al carcinoma invasivo (Mijalevic 2010).

Tuttavia, il genotipo delle neoplasie pancreatiche risulta altamente incostante ed eterogeneo, facendo ipotizzare percorsi molecolari dissimili da paziente a paziente. Tale eterogeneità genotipica e fenotipica è stata riscontrata anche nelle linee cellulari neoplastiche usate a scopo di ricerca per testare i nuovi farmaci spiegando, di conseguenza, anche i fallimenti di riproducibilità scientifica (Deer 2010).

Inoltre, per quanto concerne l'origine diretta dalle cellule duttali non è esclusa, a prescindere, la transizione epiteliale da un progenitore acinare, attraverso un fenomeno metaplastico che potrebbe, addirittura, partire anche da cellule endocrine (Mihaljevic 2010, Vincent A 2011).

Più recentemente viene studiata l'ipotesi di un progenitore cellulare pluripotente posto fisicamente alla base degli acini ed in grado di evolversi in tutte le

direzioni cellulari. Tale cellule progenitrici, meglio definite come “*cellule tumorali staminali*” sono state identificate, in percentuale inferiore all’1%, negli adenocarcinomi pancreatici, esprimendo gli antigeni CD44 e CD24 (*Li C 2009*).

Tale compartimento staminale riveste grandissima importanza clinica e terapeutica, poiché essendo resistenti alla chemio ed alla radioterapia, ovvero autorinnovabili, possono rappresentare una delle cause dei fallimenti terapeutici. Secondo altre teorie, più che un vero compartimento staminale tumorale, si tratterebbe di un sottogruppo cellulare con capacità di divenire “staminali” in particolari circostanze.

In ogni caso, l’eventuale passaggio da cellula differenziata o progenitore multipotente verso la cellula tumorale, a parte il succedersi di mutazioni, potrebbe essere regolato o perlomeno modulato anche da fattori cosiddetti “ambientali” mediante meccanismi di interazione cellula-cellula e cellula-stroma.

Una caratteristica costante, infatti, dell’adenocarcinoma pancreatico è la formazione di una densa reazione stromale composta (“*reazione desmoplastica*”) da mio fibroblasti o cellule stromali pancreatiche che, sotto l’attivazione di fattori di crescita e citokine (PDGF, VEGF EGF) sono in grado esse stesse di produrre collagene e proteine di matrice e di regolare la crescita ed il turnover della matrice stessa interagendo con i processi di invasività locale, permeabilità e metastatizzazione a distanza (*Hidalgo 2010*) (Figura 6). Infatti, la reazione desmoplastica è intrinsecamente associata alla neovascolarizzazione abnorme ed all’alterata permeabilità capillare.

L’interazione appunto, fra cellule di matrice, stroma e cellule neoplastiche è alla base delle moderne teorie circa i meccanismi metastatici, ovvero un potenziale bersaglio per lo sviluppo di nuovi farmaci e terapie mirate.

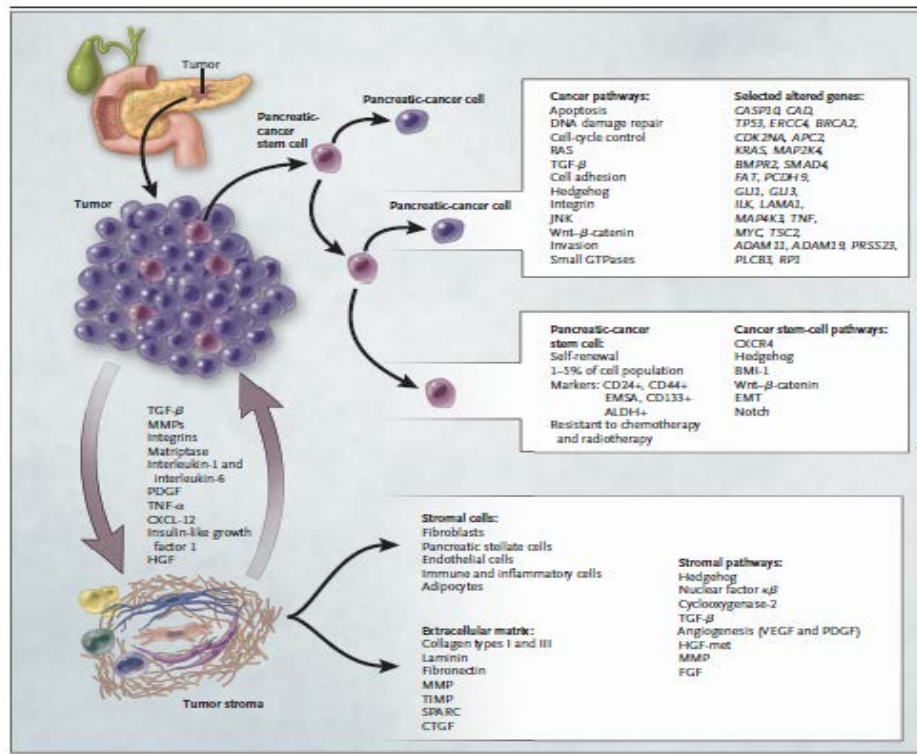


Figura 6. Cancerogenesi e progressione neoplastica: interazione fra cellule e stroma (Hidalgo 2010)

Targeted Therapy

La chirurgia e la radioterapia si sono dimostrate, per la loro natura intrinseca di azione “locale” e nonostante i continui avanzamenti tecnologici, ancora insufficienti come cura di molti tumori solidi. Tuttavia, uno dei problemi principali della chemioterapia classica (ad azione “sistemica”) resta la tossicità non specifica della maggior parte degli agenti antitumorali verso le cellule normali. La possibilità di indirizzare specificatamente molecole sulle cellule tumorali è una delle principali sfide nella ricerca sulla terapia e sulla diagnosi del cancro.

Il concetto di terapia mirata fu introdotto all’inizio del secolo scorso da Paul Ehrlich (1956) che ipotizzò un “*magicbullet*” per colpire selettivamente un bersaglio cellulare responsabile di una patologia. Ehrlich aspirava a utilizzare molecole dotate di una buona specificità, come gli anticorpi, coniugate chimicamente ad un agente effettore, sviluppando in questo modo una molecola capace di svolgere la propria

azione esclusivamente su un bersaglio specifico, come può essere una cellula tumorale. Queste caratteristiche avrebbero portato alla creazione di farmaci dotati di una maggiore efficacia terapeutica, eliminando o riducendo drasticamente la tossicità aspecifica, limite per eccellenza della chemioterapia classica. Gli studi successivi dello stesso scienziato si volsero verso lo sviluppo di anticorpi contro antigeni tumorali, sebbene l'ostacolo primario di questa strategia "targeted" sia rappresentato dall'espressione variabile dei "tumor antigen", i quali mostrano variazioni qualitative e quantitative sia tra le differenti patologie neoplastiche che tra un paziente e l'altro.

Gli stessi bersagli molecolari potrebbero, inoltre, da un lato rappresentare un marker diagnostico precoce di malattia, dall'altro il vero e proprio bersaglio, nella maggioranza dei casi, terapeutico. Idealmente, un bersaglio diagnostico dovrebbe coincidere con il bersaglio terapeutico e l'effetto del ligando variare in base ad un secondo farmaco o tracciante ad esso veicolato.

Per fare un esempio concreto, si pensi al cancro della mammella ove la ricerca ha fatto passi enormi nella direzione della terapia mirata. Una singola paziente operata di cancro della mammella riceve una sorta di mappatura della singola neoplasia, basata sulla presenza o meno di recettori estro-progestinici, di geni codificanti per il BRCA 1 e 2 (implicati nei meccanismi di riparazione del DNA) e di recettori per una sottoclasse di recettori del fattore di crescita epidermoide (HER-2). Sulla base di tale profilo bio-molecolare è possibile appunto mirare la terapia con molecole anti-ormoniche (tamoxifene, inibitori delle aromatasi) o anti-HER (trastuzumab), ovvero identificare famiglie o consanguinei a rischio di sviluppare un cancro (BRCA) (Riley 2009).

Analogamente, i fallimenti parziali o le sopravvivenze di poco modificate in molti dei pazienti affetti da cancro del colon metastatico trattati con bevacizumab (anticorpo monoclonale diretto contro il fattore di crescita vascolare - VEGF) o

cetuximab (anticorpo monoclonale diretto contro il recettore del fattore di crescita epiteliale - EGFR) hanno condotto ad identificare sottogruppi di soggetti nelle cui rispettive neoplasie fossero espressi, perlomeno, tali recettori, allo scopo di mirare la terapia più efficace (*Riley 2009*).

Purtroppo, nel cancro del pancreas, i risultati delle “targeted therapies” restano ancora più deludenti, sebbene esista un farmaco approvato ed utilizzato, l’erlotinib, in aggiunta al chemioterapico standard (gemcitabina). Tale farmaco, appartenente alla classe delle piccole molecole inibitrici dei recettori tirosin-kinasici, agisce contro EGFR, sebbene il guadagno nella sopravvivenza mediana dei pazienti sia solo di 2 settimane (*Moore 2007*).

La diversa positività recettoriale per EGF, analizzata sulle sezioni dei pezzi operatori asportati potrebbe spiegare le differenze di risultati nei singoli pazienti e la non uniformità dei risultati. Tecniche immunoistochimiche (IHC) e di immunofluorescenza in situ (FISH) sono già disponibili per testare la presenza dei bersagli molecolari.

La mappatura completa del genoma umano, avvenuta agli inizi del nuovo millennio (*Venter 2001, McPherson 2001*) ha notevolmente ampliato l’orizzonte della ricerca di farmaci anticancro, aprendo il nuovo mondo delle terapie a bersaglio molecolare. In sostanza la speranza, in parte disattesa, era quella di identificare il gene (ovvero un prodotto proteico, un messaggero, un recettore) responsabile del processo neoplastico e colpirlo selettivamente.

Da un punto di vista generale, quindi, la base teorica della “terapia mirata” è diretta ad interferire con specifici recettori cellulari o vie di trasduzione di segnali di crescita, proliferazione ed immortalizzazione cellulare (*Riley 2009*). I processi cellulari di oncogenesi e progressione neoplastica dove, almeno teoricamente, si potrebbe intervenire a livello molecolare, sono quelli ben conosciuti e sistematizzati

da Hanahan e Weinberg nel 2000 (autosufficienza dai segnali di crescita, insensibilità ai segnali inibitori, evasione dall'apoptosi, neoangiogenesi, potenziale replicativo illimitato, invasione tissutale e metastasi) integrati più recentemente da altri tre meccanismi rappresentati dall'evasione dalla sorveglianza immunologica, modificazioni epigenetiche e resistenza alla chemioterapia.

Da un punto di vista operativo le armi usate possono essere classificate sostanzialmente in 3 grandi famiglie rappresentate dagli anticorpi monoclonali, dalle "piccole molecole" e dai peptidi, questi ultimi rappresentando l'oggetto della presente tesi.

Gli anticorpi monoclonali

L'utilizzo degli anticorpi monoclonali nella ricerca sul cancro rappresenta solo un capitolo di un ampio spettro di strategie di carattere "immunologico" che includono lo sviluppo di vaccini antitumorali, l'espansione in vitro di cloni reattivi verso antigeni tumorali e la loro reimmissione in circolo o l'utilizzo diretto di citokine come farmaci. Tuttavia, l'approfondita conoscenza della struttura anticorpale e la scoperta, nel 1975, della tecnologia dell'ibridoma hanno fatto sì che queste molecole biologiche si configurassero come il carrier per eccellenza nel targeting tumorale, avvicinandosi in maniera evidente al concetto di "magic bullet" ipotizzato da Erlich quasi un secolo prima. La cronistoria dell'immunoterapia nella terapia del cancro è riassunta in Figura 7.

La Food and Drug Administration (FDA) ha concesso l'autorizzazione al commercio ad alcuni farmaci "*mAB-based*" per la terapia del cancro e molti altri sono in fase di sperimentazione clinica (*Strebhardt 2008, Carter 2008, Newsome 2008*).

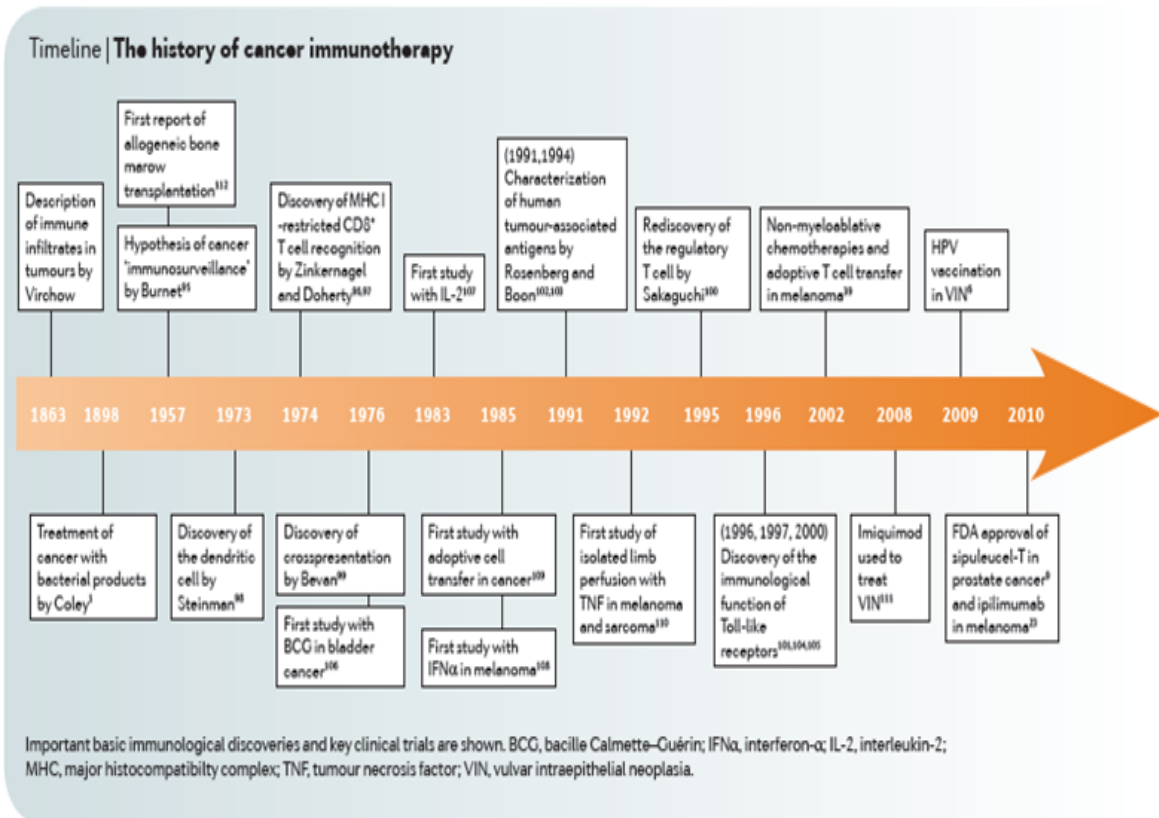


Figura 7. Sviluppo temporale dell'immunoterapia per i tumori (Lesterhuis 2011).

Esempi di impiego clinico possono essere rappresentati sia da anticorpi liberi diretti contro recettori di fattori di crescita, ad es. HER2/neu nella terapia del cancro di mammella metastatico (Romond 2005), da radioimmunocongiugati per alcune neoplasie del sangue (Witzig 2002, Borghaei 2004, Kaminski 2005) o da farmaci citotossici coniugati direttamente ad un anticorpo tumore-specifico (Linenberger 2005)(Figura 8).

Per ragioni di praticità produttiva, l'attenzione è stata posta inizialmente a immunoglobuline di origine murina, sebbene il manifestarsi nell'ospite di una reazione immunogena nei confronti degli stessi anticorpi, aveva come effetto primario una drastica riduzione della loro biodisponibilità.

Il passaggio successivo si è orientato quindi su anticorpi "chimerici" e "umanizzati", in grado di affiancare una relativa facilità produttiva a un aumento dell'efficienza.

Structure	% Human	Target	Oncology Example
Murine	0		None
Chimeric	65	Her-1	Cetuximab
Humanized	95	Her-2	Trastuzumab
Human	100	Her-1	Panitumumab
Structure	ADCC, Complement Activation		Oncology Example
IgG1	High	Her-1	Cetuximab
IgG2	Low	Her-1	Panitumumab
IgG3	High		None
IgG4	None	$\alpha_5\beta_1$ integrin	Volociximab
ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity.			

Figura 8. Proprietà e caratteristiche degli anticorpi monoclonali di impiego clinico (Modificata ed adattata da *Cohen 2008*).

Gli anticorpi chimerici sono composti dalle regioni variabili murine fuse alla regione costante umana. Le sequenze geniche umane, ottenute dalla catena leggera di tipo K e dalla catena pesante delle IgG, danno origine ad anticorpi che sono approssimativamente umani al 65%; allo stesso tempo gli anticorpi umanizzati sono prodotti inserendo i domini ipervariabili (CDR) murini in anticorpi umani, ottenendo in tal modo molecole di origine umana per il 95% circa, e aumentando ulteriormente l'emivita degli stessi. Le modalità con cui vengono prodotte queste varianti anticorpali sono l'utilizzo di topi transgenici o di librerie di Phage Display.

Le conoscenze acquisite in campo genetico permettono oggi di trasferire i geni codificanti per le immunoglobuline umane all'interno di un genoma murino e in seguito di immunizzare il topo con l'antigene desiderato, stimolandone quindi la produzione di anticorpi umanizzati.

Allo stesso tempo possono anche essere usate librerie fagiche, le quali permettono la costruzione in vitro di anticorpi totalmente umani.

Infine ultimamente sta prendendo campo lo sviluppo di frammenti di anticorpi (single-chain Fv e nanobody) come molecole carrier nel tumor targeting, i quali garantirebbero una maggiore penetrazione tumorale, una clearance ematica più rapida e una ridotta immunogenicità rispetto agli anticorpi classici (Cortez-Retamozo 2004). Molti meccanismi sono stati proposti per spiegare l'attività antitumorale degli anticorpi monoclonali diretti verso gli antigeni tumorali, ma negli ultimi dieci anni le ricerche si sono dirette verso l'interazione con i meccanismi recettoriali e di trasduzione del fenotipo cellulare maligno. Sebbene molti altri meccanismi come l'attivazione del complemento o la costimolazione siano stati presi in considerazione, tre restano i principali: la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC), il targeting dei recettori Fc sulle cellule dendritiche per promuovere la presentazione antigenica ed il network della risposta antigenica idiopica (Weiner 2009 e 2010, Griggs 2009)(Figura 9).

Tuttavia, accanto alla evidente versatilità e facilità produttiva, l'impiego di anticorpi monoclonali ingegnerizzati come agenti chemioterapici ha mostrato limiti non trascurabili, legati a caratteristiche peculiari degli stessi. Il primo ostacolo è rappresentato dalla struttura intrinseca dell'immunoglobulina, piuttosto ingombrante da un punto di vista sterico, che spesso ne compromette la possibilità di raggiungere il "core" di tumori solidi, rendendo quindi impossibile la completa eradicazione dello stesso.

Queste limitazioni, insieme alla chimica di legame di molecole effettrici all'anticorpo (la coniugazione di un farmaco all'anticorpo può non essere stabile e può alterare le proprietà di binding specifico dello stesso), fanno sì che il targeting tumorale "mAb-based" resti ancora oggi un problema aperto per un futuro prossimo.

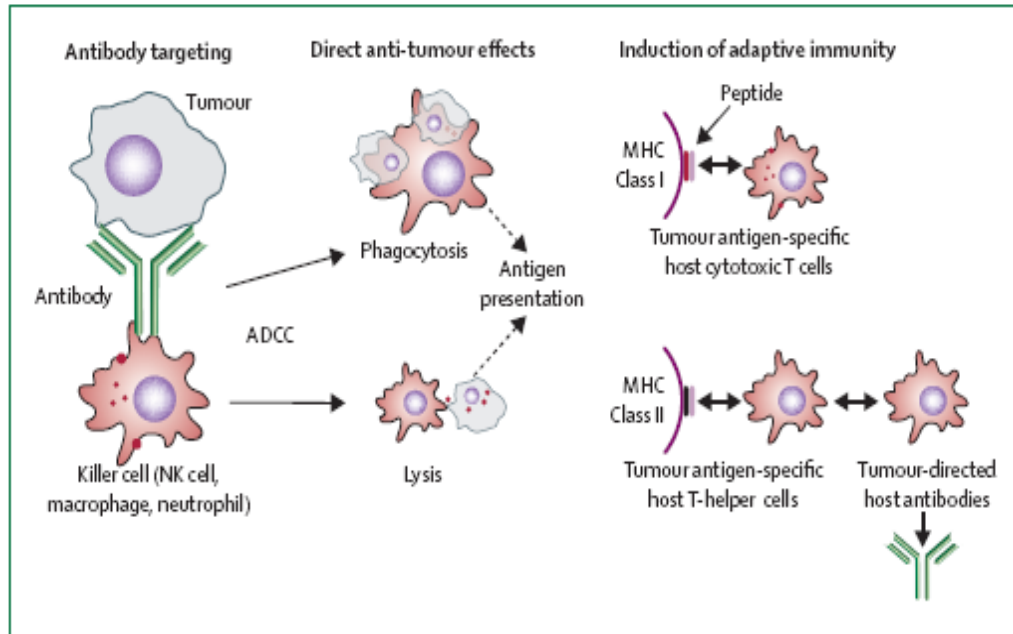


Figura 9. Rappresentazione schematica di induzione di una risposta immunitaria adattativa mediante citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC) (Adattata da *Weiner 2009*).

Per quanto concerne più specificatamente l'impiego degli anticorpi monoclonali nella terapia “mirata” del cancro del pancreas, la ricerca clinica e preclinica si è indirizzata verso l'angiogenesi (VEGF-Bevacizumab), i meccanismi di adesione cellulare e di matrice (Integrine – Velociximab), la famiglia dei fattori di crescita epiteliale (EGFR, HER2 – Cetuximab, Matuzumab, Panitumumab, Trastuzumab), mesoteline (SS1P, MORAAb-009), antigene carcinoembrionario (KAb201), fattori di crescita (IGF-1R – Cixutumumab, AMG 479). Altri bersagli sono stati provati a livello meno esteso o, comunque, preclinico: es. anticorpi monoclonali contro antigeni non specifici (NCA), molecole di adesione epiteliale (EpCAM), mucine (MUC-1), recettori di “morte” (TRAIL), tetraspannine (CLDN4), proteine feto-acinari (FAPP) (*Chames 2010*). Una recente revisione della letteratura mette in risalto il ruolo degli anticorpi come sinergici ad effetto potenziante in associazione ai chemioterapici classici e ad altri farmaci a bersaglio molecolare (*Lesterhuis 2011*).

Purtroppo, a tutt'oggi, nessuna di queste molecole ha dimostrato un reale vantaggio di sopravvivenza rispetto alla chemioterapia classica con gemcitabina o in associazione ad essa, a fronte di un costo notevole.

Le “piccole molecole”

Capostipiti di questa nuova classe farmacologica sono gli inibitori delle tirosin kinasi (TK) (un particolare tipo di kinasi), nate come molecole dotate di capacità selettiva di colpire le cellule tumorali in cui l'attività kinasica è overespressa o abnormemente attivata. Le TK possono essere schematicamente suddivise in recettoriali e non-recettoriali (o cellulari), entrambe le classi implicate nell'aberrante attivazione a cascata di segnali proliferativi che portano alla formazione di un tumore (Lo Russo 2008).

Gli anticorpi monoclonali, di cui si tratterà più estesamente nel paragrafo successivo, competono appunto con i fattori proliferativi per quanto concerne il legame alle TK recettoriali, sebbene la maggior parte di esse risieda invece nel citoplasma, nel nucleo o nella parte interna della membrana plasmatica. Le piccole molecole, invece, agiscono impedendo la fosforilazione da parte delle TK sia che appartengano ad un complesso recettoriale sia che si trovino nella cellula (Figura 10).

Sebbene siano molto noti i meccanismi di azione di queste molecole, variegati i loro impieghi clinici ad esempio l'imatinib nelle leucemie (attraverso l'inibizione del bersaglio Abl-Bcr) e nei tumori stromali gastrointestinali (GIST, attraverso l'inibizione del c-kit), molti rimangono ancora gli interrogativi che ne limitano l'applicabilità clinica. Ad esempio, non sono ancora completamente noti i meccanismi con cui la cellula tumorale sfugge al blocco proliferativo, andando dall'attivazione di un feedback positivo, ad una upstream recettoriale fino all'attivazione di vie alternative di trasduzione del segnale. Infine, ma non meno

importante, la difficoltà, su scala industriale, della sintesi di queste molecole che, a volte presentano anche limiti di specificità e selettività.

Meccanismo	Target	Molecola
Inattivazione/Sequestro del ligando	VEGF-A	Bevacizumab
Inattivazione/legame del recettore	EGFR	Cetuximab
Inibizione della fosforilazione di RTK	EGFR	Erlotinib
Inibizione della fosforilazione di CTK	Bcr-Abl	Imatinib

Figura 10. Meccanismi di azione degli inibitori delle TK (anticorpi e piccole molecole) (Modificata ed adattata da *Lo Rossu 2008*). RTK: tirosin kinasi recettoriali, CTK: tirosin kinasi cellulari.

Le piccole molecole sono state anche recentemente utilizzate per bloccare protein kinasi citosoliche come le PKD (famiglia delle serina-treonina kinasi). In uno studio si sono dimostrate efficaci nella riduzione della proliferazione di linee cellulari pancreatiche (*Harikumar 2010*).

Nella terapia del cancro del pancreas è stato recentemente proposto l'utilizzo dell'erlotinib con buoni risultati. Sebbene gli studi condotti impieghino l'associazione obbligatoria per motivi etici alla gemcitabina, il farmaco si è dimostrato ben tollerato ed impiegabile in studi di Fase II. Tuttavia, non vi è stata, a tutt'oggi, sufficiente evidenza statistica (in termini di guadagno di sopravvivenza od intervallo libero da malattia) da giustificarne l'utilizzo sistematico nella pratica clinica od in studi di Fase III (*Moore 2007, Feliu 2011, Bao 2011*).

I peptidi

L'osservazione che recettori per diversi peptidi regolatori endogeni (tra cui i neuropeptidi cerebrali, gli enteropeptidi, i peptidi vasoattivi e i peptidi del sistema endocrino) sono over-espressi in alcuni tipi di tumori umani, rappresenta la base di partenza per un possibile utilizzo di peptidi naturali diretti selettivamente contro le cellule tumorali, aprendo nuove prospettive sull'uso di analoghi sintetici per ottimizzazione del tumor-targeting (*Reubi 2003*).

Farmaci citotossici o radiotraccianti sono stati coniugati ad analoghi di peptidi regolatori allo scopo di ottenere strutture altamente selettive (*Langer 2001*). Ne è un esempio l'uso di DOTATOC® e OctreoScan®, analoghi stabilizzati del peptide regolatore somatostatina, coniugati con chelanti di metalli, utilizzati rispettivamente per la terapia e la diagnosi di tumori neuroendocrini umani (*Forrer 2007*).

Le potenzialità di sviluppo di peptidi regolatori endogeni nelle strategie di tumor targeting è supportata anche dalla elevata selettività per il loro bersaglio farmacologico con conseguente minore possibilità che si sviluppino effetti collaterali. Inoltre, la loro piccola dimensione, paragonata a quella di carrier macromolecolari come gli anticorpi, aumenta la loro capacità di permeare i tessuti e di raggiungere i tumori. Infine, la relativa facilità di sintesi (che può essere effettuata su fase solida in maniera automatizzata) e le caratteristiche chimico-fisiche rendono i peptidi particolarmente adatti per eventuali modificazioni e coniugazioni con unità funzionali. I peptidi vengono, pertanto, inclusi nella cerchia dei possibili candidati a farmaci chemioterapici (*Ladner 2004*).

Se confrontati con gli anticorpi, i peptidi mostrano una maggiore capacità penetrativa di organi e tessuti; rispetto alle piccole molecole invece possiedono una maggiore specificità ed efficienza, dovuta alla maggiore complessità strutturale dei

peptidi stessi. I farmaci peptidici emergenti mostrano quindi nuovi potenziali non raggiungibili dai farmaci classici basati su piccole molecole o su proteine ricombinanti (Meloan 2004).

Nuove classi di agenti terapeutici

Esiste un'evidenza scientifica abbastanza solida per potere affermare che i microRNA potranno rappresentare un valido ausilio per migliorare la diagnosi, definire la prognosi e sviluppare nuovi farmaci oncologici. I meccanismi operativi coinvolgono strategie come la modulazione di queste molecole, la reintroduzione nelle cellule che le hanno perse e la loro inibizione selettiva mediante oligonucleotidi anti-miRNA (antisense) (Iorio 2009) (Figura 11). Questo tipo di approccio si potrà altresì inserire in un network articolato che include, come possibile terapia anticancro, l'influenza sui chemioterapici classici e la modulazione della risposta ad altri farmaci a bersaglio molecolare. Altri classi a bersaglio molecolare, ancora in fase di sviluppo, sono rappresentati dagli inibitori delle deacetilasi istoniche e dagli agenti demetilanti che agiscono a livello di modificazione epigenetiche (Gore 2008), ovvero gli inibitori dei meccanismi di degradazione proteica intracellulare (sistema ubiquitina-proteasoma) (Molineaux 2008).

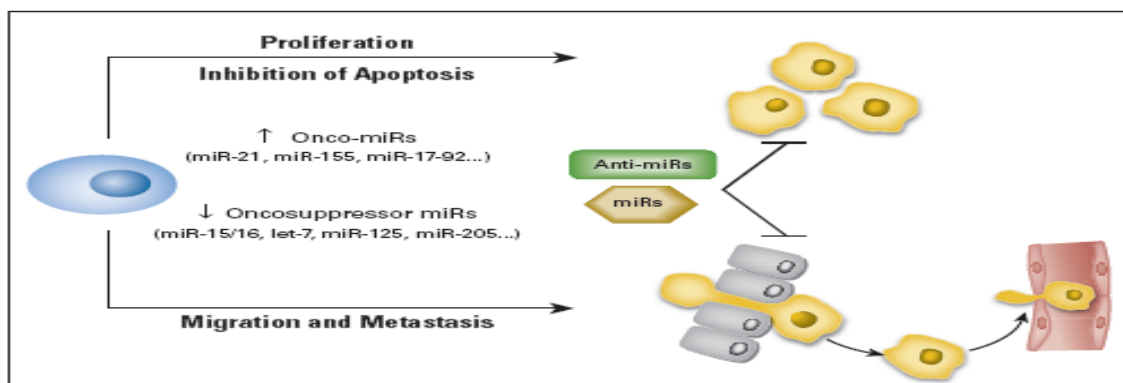


Figura 11. Impiego terapeutico dei micro-RNA in oncologia (ADCC (Adattata da Iorio 2009).

I PEPTIDI COME POSSIBILE “ARMA”

Peptidi come sistema di drug delivery

La possibilità di coniugare un peptide specifico per un target tumorale con una molecola dotata di attività citotossica permette di creare un complesso nel quale il peptide funge da carrier, migliorando la citotossicità del farmaco chemioterapico e associando ad esso un potere estremamente selettivo portato dal carrier stesso (*Langer 2001*).

I peptidi si sono candidati come potenziali sistemi di drug delivery nella terapia antitumorale, quando, nel 2003, lo scienziato svizzero Jean Claude Reubi osservò che recettori per diversi peptidi regolatori endogeni sono over-espressi su un ampio numero di tumori primari umani e, per questo motivo, i liganti peptidici possono essere studiati per la loro potenziale attività di tumor-targeting (*Reubi 1995 e 2003*). Tra questi peptidi figurano neuropeptidi, enteropeptidi, peptidi vasoattivi e del sistema endocrino. Inoltre esistono anche tutta una serie di peptidi di origine, per così dire, “sintetica”, costruite mediante “librerie combinatoriali” o utilizzando fagi (*Pini 2004, Falciani 2005*).

Il primo recettore per un peptide endogeno a essere utilizzato come bersaglio specifico su cellule tumorali è stato il recettore della somatostatina, over-espresso nei tumori pancreatici neuroendocrini (*Reubi 2004*).

Tuttavia anche questo approccio peptidico ha trovato alcune limitazioni davanti a sé, la più importante delle quali è rappresentata dalla breve emivita in vivo, dovuta alla degradazione dei peptidi da parte di proteasi e peptidasi extracellulari. Al fine di aumentare la stabilità peptidica in vivo, sono state sperimentate varie modificazioni chimiche della sequenza aminoacidica, tra cui la glicosilazione, la coniugazione con polietilenglicole (PEG) o albumina, la sostituzione o l'introduzione

di amminoacidi destrutturati o non naturali nella sequenza, l’inserimento di costrizioni strutturali, la ciclizzazione e la conversione di peptidi guida in peptidomimetici o in small molecules. Nonostante ciò ad oggi l’introduzione di tali modificazioni di sequenza ha spesso coinciso con una variazione in negativo della specificità e dell’attività biologica del peptide stesso, annullandone quindi i potenziali benefici.

L’idea di stabilizzare i peptidi attraverso la costruzione di molecole ramificate nasce agli inizi del nuovo millennio nel Laboratorio di Biotecnologie dell’Università di Siena, allo scopo di trovare antagonisti di tossine (*Bracci 2002 e 2003, Lozzi 2003, Pini 2005, 2006 e 2007, Falciani 2007*). La concreta opportunità di aggirare il problema della ridotta stabilità in vivo, fornita dalla sintesi di Multiple Antigen Peptides (MAP), si è resa applicabile nella ricerca oncologica con ampie prospettive di sviluppo sia diagnostiche che terapeutiche (*Falciani 2007*).

La Neurotensina (NT)

Tra tutti i peptidi candidati per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche nella cura dei tumori, la neurotensina si presenta come uno dei più promettenti (*Reubi 2005*). Isolata per la prima volta da Carraway e Leeman nel 1973, come molti altri neuropeptidi, la NT svolge il doppio ruolo di neurotrasmettitore e neuromodulatore nel SNC e di ormone locale a livello periferico.

Nel sistema nervoso centrale, la NT funge da neuromodulatore soprattutto della trasmissione dopaminergica ed in misura minore di quella serotoninergica e noradrenergica, ed influenza anche la secrezione ormonale. A livello periferico la neurotensina è un modulatore paracrino ed endocrino del tratto digestivo e del sistema cardiovascolare dei mammiferi ed può agire anche come fattore di crescita di cellule normali e tumorali (*Vincent JP 1995, Hermans 1998, Mustain 2011*). In

particolare, i recettori per NT sono stati identificati come possibili marker tissutali dell’adenocarcinoma pancreatico (Reubi 1998).

La NT è stata dimostrata essere un potente regolatore della crescita di cellule di adenocarcinoma pancreatico umano coltivate in vitro (MIA PaCa-2), mediante un meccanismo di trasduzione del segnale coinvolgente l’idrolisi del fosfatidil-inositolo e la mobilizzazione del calcio intracellulare (Ishizuca 1993). Tali vie di attivazione della crescita cellulare, dimostrate anche in linee cellulari di neoplasie del colon, sono in grado di attivare in maniera diretta la cascata delle protein kinasi o mediante un “cross-talk” con i recettori dei fattori di crescita epiteliale (Gui 2008, Muller 2011, Barkitzi 2011, Massa 2011)(Figura 12).

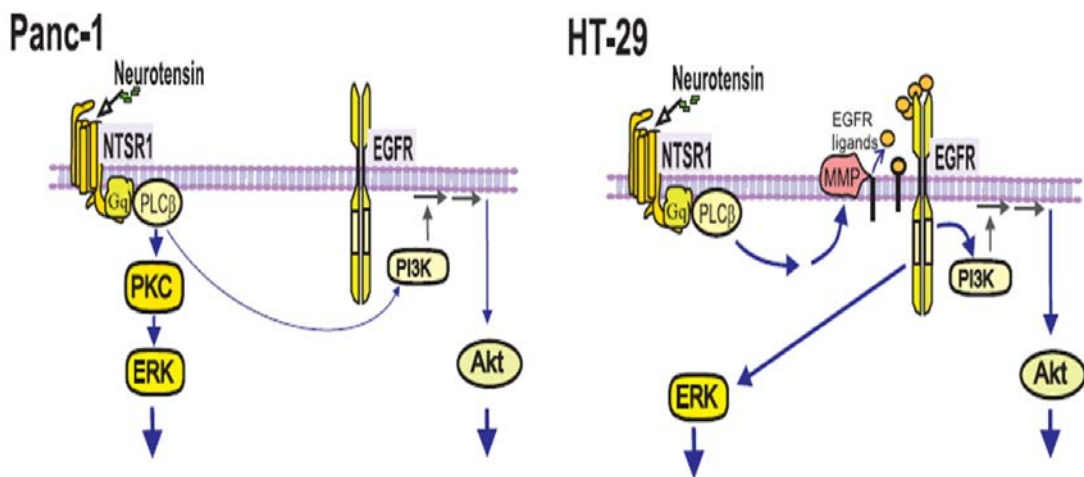


Figura 12. Possibili vie di attivazione della crescita cellulare in vitro (Muller 2011).

Tali peptidi sono quindi candidati per lo sviluppo di nuove biomolecole per tumor-targeting specifiche per diagnosi e terapia di tumori che esprimono i recettori per la Neurotensina, sebbene non si possa escludere a priori che le molecole dendrimeriche di NT interagiscano anche con altri tipi di recettori a diversa affinità (Dupouy 2011). Un filone di ricerca è volto direttamente al silenziamento delle vie di attivazione di NT sfruttando, ad esempio, una nuova classe farmacologica come gli inibitori delle deacetilasi istoniche (Wang 2011).

Da un punto di vista estremamente schematico e speculativo le azioni fisiopatologiche di NT in vivo possono essere così riassunte (tra parentesi si ipotizzano i principali campi applicativi):

- Remodelling della mucosa ileale (cancerogenesi)
- Termoregolazione (danno da ischemia cerebrale)
- Trasmissione dopaminergica (Alzheimer, Parkinson)

Il ruolo fisiologico nel remodelling e nella crescita fisiologica dei tessuti, ovvero i processi fisiopatologici che stanno alla base della crescita e progressione neoplastica, sono stati evidenziati in molti organi come l'intestino tenue, il colon, lo stomaco, il pancreas, le ghiandole surrenali, la mammella, il polmone, la prostata ed altri (Evers 2006). La Neurotensina (NT) è un peptide di 13 aminoacidi (1672 Da) la cui sequenza esatta è N-ter-Glu-Leu- Tyr-Glu-Asn- Lys-Pro-Arg- Arg-Pro-Tyr- Ile- Leu-C-ter (Figura 13).

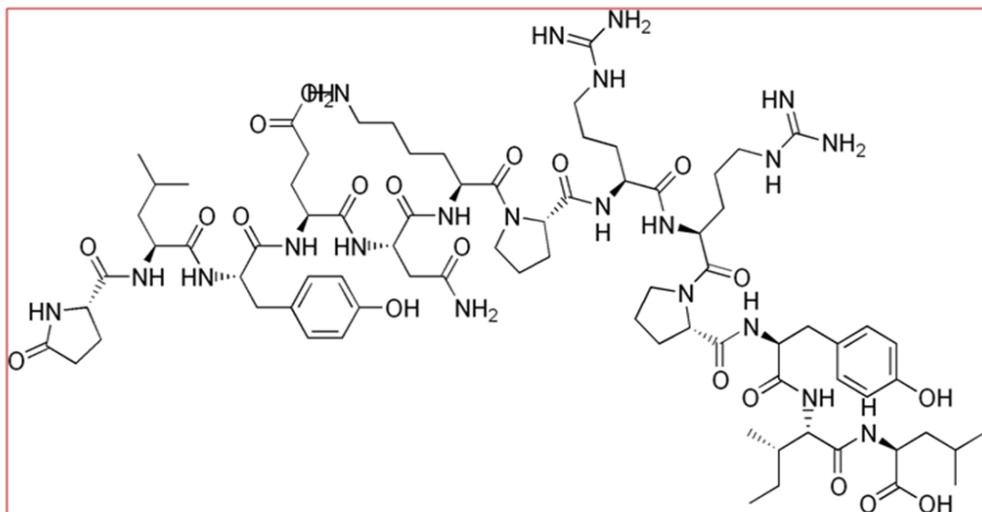


Figura 13. Formula bruta della Neurotensina.

Il frammento attivo, valutato mediante capacità di ottenere ipotermia nel ratto è quello dall'aminoacido 8 al 13, zona dove è anche però presente il legame con le peptidasi e le metalloproteasi (Myers 2009) (Figura 14).

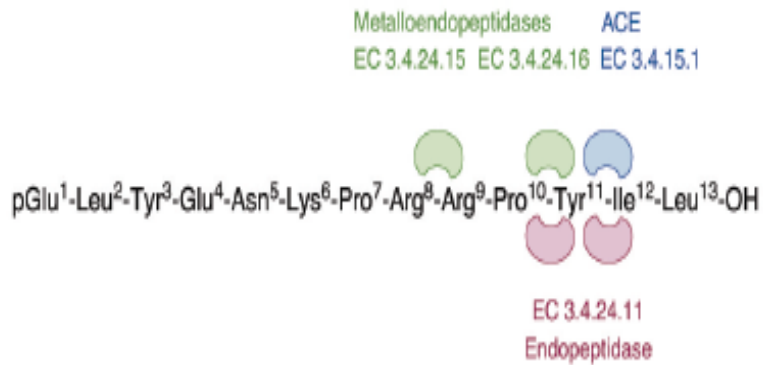


Figura 14. Sequenza aminoacidica della Neurotensina.

Gli iniziali tentativi di stabilizzare il peptide in vivo comprendevano la sintesi di analoghi lineari (*Garcia-Garayoa 2001 e 2002, Achilefu 2003*), isomeri D-neurotensina, agonisti non peptidici o la ciclizzazione della molecola stessa (*Lundquist 1999, Hong F 2002, Myers 2009*). Ovviamente, tutti questi tentativi avevano l'inconveniente di alterarne l'affinità e la specificità recettoriale o, comunque, alcune delle caratteristiche chimico-fisiche peculiari.

Da un punto di vista di biologia molecolare, i recettori di NT appartengono ad una famiglia (NTR family) di recettori con funzionamento diverso ed agonisti-antagonisti di sintesi diversi o con diverse affinità, presenti nei vertebrati (*Vincent JP 1999, Hwang 2009*). Il secondo mediatore è rappresentato dal calcio rilasciato attraverso la via delle fosfochinasi e dell'inositolo trifosfato. Si conoscono almeno 3 tipi di recettore più un quarto di più incerta funzione (Figura 15):

- NTR1: GPCR, alta affinità per NT, antagonista non peptidico SR 45398
- NTR2: GPCR, bassa affinità antagonista non peptidico levocabastina (anti-H1)
- NTR3: 100% omologo della sortilina, un solo dominio transmembrana, multiligando, antagonista non peptidico SR 45398
- NTR4

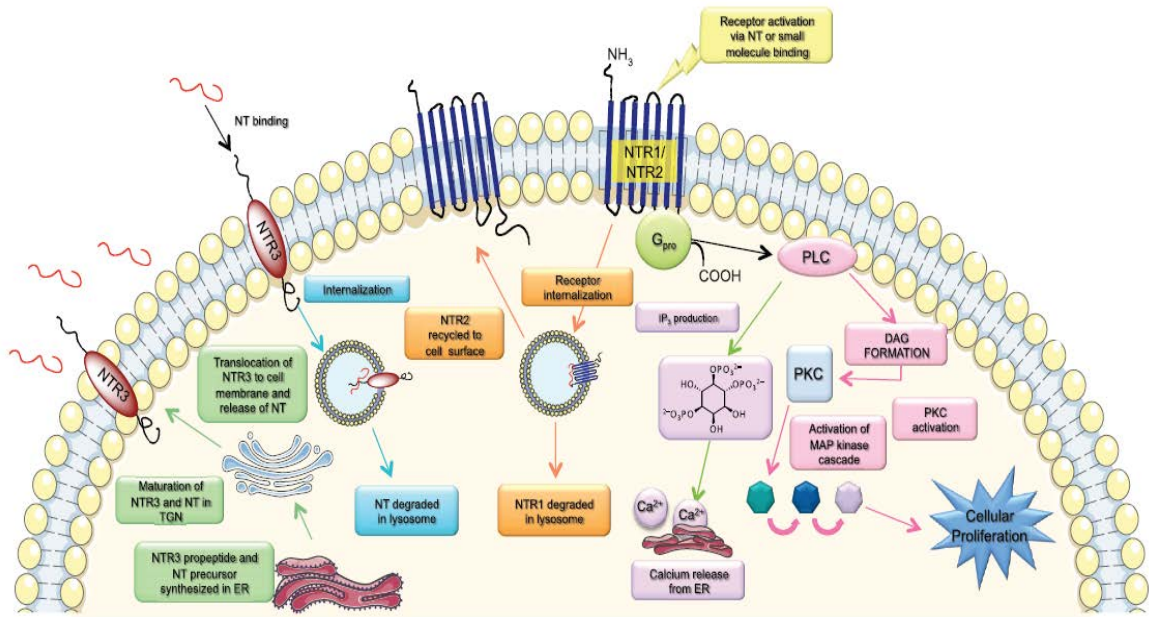


Figura 15. Famiglia recettoriale della Neurotensina (Myers 2009).

Gli analoghi dendrimerici sia di NT che di NT(8-13) marcati con opportune Unità Funzionali, possono essere seguiti per il loro legame e successiva internalizzazione su linee cellulari provenienti da tumori umani, note per over-esprimere il Recettore per Neurotensina. Inoltre, quando vengono coniugati ad Unità Funzionali con azione chemioterapica, risultano essere selettivamente citotossici sia in-vitro che in modelli in-vivo su topi nudi trapiantati con cellule di adenocarcinoma umane (Falciani 2007), per la cui esecuzione è stata ottenuta l’approvazione del Comitato Etico dell’Azienda Ospedaliera Senese in data 23 gennaio 2004 (Prot.1272/03 del 22.12.03).

La sintesi di Neurotensina in forma MAP conferisce quindi alla struttura la stabilità necessaria per lo sviluppo di molecole cliniche e, allo stesso tempo, offre la possibilità di coniugare al peptide ramificato varie unità funzionali attraverso un gruppo amminico libero esposto da una lisina del “core“(Figura 16).

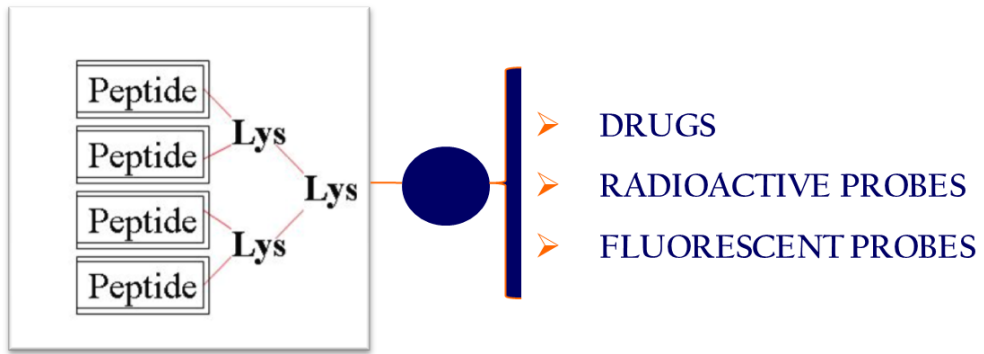


Figura 16. Schema della coniugazione fra MAP4 e unità funzionali.

Come per gli altri peptidi sintetizzati in forma MAP, anche per Neurotensina è stato dimostrato che la struttura MAP4 NT(1-13), se confrontata con la corrispettiva sequenza lineare, mantiene intatta la capacità di legare i recettori specifici, anche quando a questa vengono coniugate unità funzionali.

È stato inoltre osservato che NT in forma MAP4 può dar luogo a endocitosi mediata da recettore, peculiarità che può esser sfruttata utilizzando tale peptide ramificato come carrier per farmaci citotossici (*Falciani 2007*) (Figura 17).

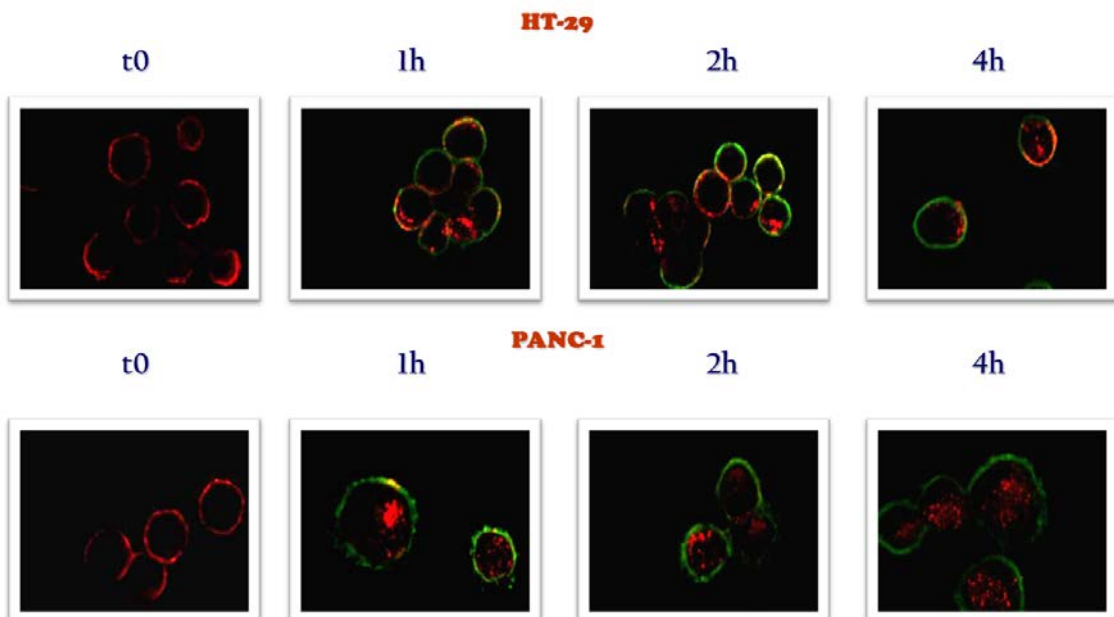


Figura 17. Internalizzazione di NT4 coniugato a fluoresceina all'interno delle cellule.

Questi risultati forniscono la base per sviluppare peptidi diversi, allo scopo di produrre nuove molecole stabili e altamente specifiche per altri tipi di cellule tumorali. I peptidi dendrimerici si presentano quindi quali ottimi candidati per lo sviluppo di nuove biomolecole specifiche per la terapia e la diagnosi del tumore.

MATERIALI E METODI

Obiettivo dello studio

Il presente studio sperimentale in vitro si proponeva di valutare la capacità da parte di peptidi dendrimerici di riconoscere in maniera specifica antigeni tumorali pancreatici.

L'obiettivo dello studio era di valutare la capacità da parte di peptidi dendrimerici di riconoscere selettivamente in vitro i loro recettori presenti nei frammenti microscopici di tessuto tumorale (principalmente di adenocarcinoma pancreatico), prelevati su banco dall'intero tumore asportato a scopo curativo, ed in maniera del tutto indipendente dallo svolgimento dello studio stesso, nella SOD di Chirurgia Generale ed Oncologica diretta dal Prof. Renato Moretti. Il Comitato Etico Locale (CEL) dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Careggi, visionato il Protocollo Operativo ha approvato la ricerca con delibera N°8353/2009 del 3 marzo 2009. I dati di laboratorio ottenuti potranno essere utilizzati per un potenziale sviluppo di tali molecole nella diagnostica e nella terapia di vari tumori e quindi per migliorare la pratica clinica e la diagnosi oncologica preoperatoria.

Popolazione di studio

Sono stati arruolati nel presente studio i pazienti sottoposti a chirurgia oncologica pancreaticata programmata che hanno dato il consenso informato scritto. Sono stati esclusi i pazienti che non hanno sottoscritto il consenso informato. Sono stati reclutati 33 pazienti per una durata complessiva dello studio di 3 anni.

Conformità ai principi di Buona Pratica Clinica ed ai principi etici della Dichiarazione di Helsinki

Il protocollo di studio non ha richiesto che fosse applicata ai pazienti alcuna procedura supplementare di trattamento medico-chirurgico pre-, intra- e post-operatorio rispetto a quanto effettuato di routine dal Centro che ha condotto lo studio. Il prelievo dei campioni non ha pregiudicato la normale analisi istopatologica sui tessuti asportati. I dati sono stati comunque trattati in maniera anonima e raccolti con il solo scopo della ricerca.

I pazienti, previa lettura e firma di un modulo apposito di consenso informato, sono stati liberi di partecipare o meno allo studio dando l'assenso scritto al trattamento dei dati personali in accordo al D.Lgs. 196/2003 ("Codice in materia di protezione dei dati personali"). Lo studio è stato condotto in accordo ai principi etici derivanti dalla dichiarazione di Helsinki.

Consenso Informato Scritto

Si assicura che ai pazienti arruolati nello studio sia stata data una spiegazione completa ed esaustiva circa la natura e i propositi dello studio. Il paziente è stato informato circa la possibilità di interrompere lo studio in qualsiasi momento. Al paziente è stata data la possibilità di fare domande e gli/le è stato offerto tutto il tempo desiderato per valutare le informazioni fornite. Il paziente ha firmato e datato il consenso informato scritto in duplice copia prima che le procedure dello studio che lo riguardavano fossero avviate. Il Medico rilevatore ha conservato il primo originale del consenso informato scritto firmato, mentre la seconda copia dello stesso è stata consegnata al paziente.

Protezione dei dati del paziente

Nel consenso informato scritto è stato specificato che i dati dello studio sono conservati in forma cartacea, automatizzata e/o informatizzata e che la

confidenzialità dei dati stessi sarà mantenuta secondo quanto previsto dalla normativa vigente.

Disegno dello studio

Lo studio in oggetto, come già detto, è stato di tipo sperimentale in vitro, utilizzando frammenti microscopici di tessuto tumorale (circa 3 mm di diametro), prelevati su banco dall'intero tumore asportato a scopo curativo nella SOD di Chirurgia Generale ed Oncologica diretta dal Prof. Renato Moretti ed in maniera del tutto indipendente dallo svolgimento dello studio stesso. Si proponeva di valutare la capacità di tali peptidi di riconoscere selettivamente in vitro antigeni tumorali su cellule di adenocarcinoma pancreatico.

Trattandosi di uno studio sperimentale in vitro, i pazienti non sono stati sottoposti a nessuna manovra né trattamento aggiuntivo nelle fasi preoperatoria, operatoria e di degenza. Il prelievo dei campioni inoltre non ha pregiudicato la normale analisi istopatologica sui tessuti asportati.

I campioni prelevati dai tumori asportati sono stati analizzati tramite immunofluorescenza e microscopia confocale utilizzando come traccianti i peptidi dendrimerici preparati presso il Laboratorio di Biotecnologie Molecolari dell'Università degli Studi di Siena.

Organizzazione dello studio

Lo studio è stato suddiviso in 4 fasi principali.

Fase A. Sintesi dei peptidi dendrimerici coniugati a differenti Unità Funzionali e valutazione della loro bioattività (stabilità alle proteasi e capacità di legame al bersaglio). Le molecole peptidiche sono state coniugate, durante il processo di sintesi su fase solida, ad Unità Funzionali che forniscono potere

tracciante alla struttura finale. E' stata esaminata la capacità dei peptidi dendrimerici di legarsi ad una proteina tumor-marker oppure ai loro recettori specifici in linee cellulari opportunamente selezionate. La stabilità alle proteasi dei peptidi multimerici è stata inoltre confrontata con quella degli analoghi monomerici. Questa fase è stata svolta presso il Laboratorio di Biotecnologie Molecolari, Università di Siena.

Fase B. Raccolta di frammenti microscopici di tessuto provenienti da pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia oncologica programmata, presso la Struttura Dipartimentale Ospedaliera di Chirurgia Generale ed Oncologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze. Dall'intero tumore precedentemente asportato a scopo curativo ed in maniera del tutto indipendente dallo svolgimento dello studio stesso, sono stati prelevati su banco un microscopico campione (circa 3 mm di diametro) di tessuto tumorale ed uno del tessuto sano adiacente. Il prelievo dei campioni è stato effettuato senza pregiudicare la normale analisi istopatologica sui tessuti asportati.

Non appena prelevati i campioni sono stati imbevuti in Tissue Tek (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) allo scopo di mantenerne l'integrità e congelati ad una temperatura di -180°C tramite immersione in azoto liquido. Questa fase è stata svolta presso la SOD di Chirurgia Generale ed Oncologica della Azienda Ospedaliero Universitaria di Careggi, Firenze.

Successivamente i campioni sono stati trasferiti presso il Laboratorio di Biotecnologie Molecolari dell' Università di Siena.

Fase C. Ciascun campione è stato trattato con peptidi dendrimerici coniugati ad opportune unità fluorofore e successivamente analizzato tramite microscopia a fluorescenza e microscopia confocale. E' stata analizzata e confrontata la risposta tra tessuto normale e tumorale di ciascun paziente con l'obiettivo di valutare la capacità

discriminante di ciascun peptide per tipologia di tumore studiato. Il dato qualitativo ottenuto dall'analisi tramite microscopio è stato trasformato tramite un apposito software (ImageJ, NIH) in un numero continuo finito. Il dato "quantitativo" è stato poi sottoposto ad analisi statistica. Questa fase è stata svolta presso il Laboratorio di Biotecnologie Molecolari dell'Università degli Studi di Siena.

Raccolta dei campioni

Dal 1 marzo 2009, in seguito all'approvazione del progetto di Ricerca sottoposto al Comitato Etico, presso la Struttura Operativa Dipartimentale (SOD) di Chirurgia Generale e Oncologica (Direttore: Prof. R. Moretti) dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Careggi, Firenze, 33 pazienti affetti da tumore del pancreas esocrino sono stati sottoposti ad intervento chirurgico con intento radicale. Le caratteristiche demografiche dei pazienti, i dati preoperatori ed istopatologici sono stati raccolti a scopo statistico descrittivo, ed utilizzati in maniera del tutto anonima.

Una volta asportato il pezzo operatorio, questo veniva sezionato identificando ed asportando un frammento di tessuto neoplastico ed uno di tessuto macroscopicamente sano (circa 5-8 mm). I frammenti venivano fissati su supporto in sughero mediante Tissutek™, disidratati e congelati direttamente in sala operatoria in azoto liquido (-270 °C) previo passaggio in isopropano.

Entro 48-72 ore, i campioni congelati venivano trasferiti presso il Laboratorio di Biotecnologie dell'Università degli Studi di Siena (Direttore: Prof.ssa Luisa Bracci).

Sintesi dei peptidi

La sintesi dei peptidi è stata eseguita con MultiSynTech Syro, un sintetizzatore peptidico multiplo automatizzato (Witten, Germany) secondo la

chimica standard Fmoc. Gli L-amminoacidi protetti, i reagenti di coupling (DIPEA e HBTU) e la resina NovaSyn TGR sono stati acquistati da Novabiochem.

Tutti i peptidi tetra-ramificati sono stati costruiti utilizzando due step di coniugazione consecutivi di Fmoc-Lys(Fmoc)-OH per formare il core di ramificazione.

Il peptide NT tetraramificato coniugato a Biotina è stato sintetizzato su resina Novasyn TGR, utilizzando Fmoc-Lys(Biotina)-OH nel primo step di coupling, e Fmoc-PEG-OH (Novabiochem, Darmstadt, Germania) nel secondo step di coupling. Quindi è stato utilizzato Fmoc-Lys(Fmoc)-OH per costituire il core tetramerico. Il peptide MAP(Multiple Antigen Peptide)⁴ NT1-13-peg-K-peg-Fluoresceina, è stato sintetizzato usando Fmoc-Lys(Dde)-OH come primo amminoacido sulla resina Novasyn TGR, seguito da Fmoc-PEG-OH come secondo residuo.

Per costruire il core sono stati utilizzati due step di coupling con Fmoc-Lys(Fmoc)-OH mentre il tetramero è stato sintetizzato usando Pyro-Glu-OPbf come ultimo amminoacido all'N-terminale della sequenza di Neurotensina. Il gruppo protettivo Dde è stato rimosso utilizzando idrazina in DMF al 2% (v/v) per 10 minuti a temperatura ambiente ed il gruppo amminico libero è stato accoppiato con Fmoc-PEG-OH. Quindi si è passati a rimuovere il gruppo Fmoc per consentire la coniugazione con 5-Carboxyfluorescein (Sigma); infine il peptide è stato staccato dalla resina e deprotetto.

Gli analoghi non correlati sono stati sintetizzati analogamente e l'N-terminale è stato acetilato prima dello step di coniugazione. La purificazione in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) è stata eseguita utilizzando una colonna a fase inversa C18 Phenomenex. Acqua contenente TFA allo 0,1% e metanolo sono stati usati in un gradiente lineare come eluenti per le procedure analitiche e

preparative. Tutti i composti sono stati inoltre caratterizzati mediante spettrometro di massa Etnan MALDI-TOF (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

Taglio e fissazione delle sezioni

I campioni congelati sono stati tagliati in sezioni di 5µm di spessore mediante criostato (Reichert-Jung 2800 frigocut N, Depew, NY) a una temperatura di -28°C e posti su vetrini poly-L-lysine.

Successivamente sono stati quindi conservati a una temperatura di -80°C che ne mantiene l'integrità fino al loro utilizzo per i passaggi ulteriori. Le singole sezioni ottenute sono state analizzate attraverso microscopio ottico tramite colorazione standard (Ematossilina & Eosina) oppure tramite test di immunofluorescenza.

Colorazione sezioni Ematossilina e Eosina

Le sezioni sono lasciate asciugare a temperatura ambiente per qualche minuto e quindi immerse in una soluzione di ematossilina precedentemente preparata e filtrata. Dopo un lavaggio accurato in H₂O, le sezioni vengono immerse per pochi secondi in una soluzione preparata e filtrata di eosina (eosin Y, 0.5% w/v, etanolo 90% v/v) e progressivamente passate in concentrazioni crescenti di etanolo pari rispettivamente a 70% e 96%.

Infine vengono passate in etanolo assoluto per 2 volte consecutive. Le sezioni, dopo essere state immerse in Neo-Clear (Merck, xylene substitute), vengono montate con vetrino coprioggetti e con una goccia di opportuna soluzione di montaggio (Leica CV Mount®).

Analisi di sezioni tissutali di pancreas

Le sezioni vengono asciugate a 37°C per 30', fissate immergendole per 15' a temperatura ambiente in una soluzione di TBS-4% paraformaldeide e infine vengono poste in una soluzione di glicina 0,1M in TBS per almeno 12h a 4°C.

Successivamente i campioni vengono saturati con siero fetale bovino (FBS) per 30' a 37°C, incubati per 30' a temperatura ambiente con MAP4 NT1-13-peg-K-peg-Fluoresceina (1µg/ml in TBS-1% BSA) e infine posti per 5' in una soluzione di DAPI (1µg/ml in TBS-1% BSA). Quindi le sezioni vengono montate con vetrino copri oggetti e 10µl di alcool polivinilico (Mowiol: 4-88 Tris 0,2 M pH 8.5 e glicerolo). Ogni step di questa procedura è seguito da almeno un lavaggio con TBS.

Come controllo è stato utilizzato un peptide MAP4 non correlato (sequenza AcDDHSVA) coniugato con Fluoresceina ed incubato nelle stesse condizioni.

Il legame del peptide è stato esaminato attraverso microscopio laser confocale (Leica TCS SP5): i segnali della FITC e del DAPI sono stati acquisiti utilizzando lunghezze d'onda di 490 nm e 350 nm e filtri di emissione di 525 nm e 470nm rispettivamente.

Tutte le immagini acquisite sono state analizzate attraverso il software Image J (NIH); i dati informatici risultanti sono stati riportati come distribuzione di pixel nella scala del verde del sistema RGB.

Metodologia di analisi e metodi statistici

La variabile oggetto dello studio statistico è rappresentata dalla risposta dei campioni alle analisi condotte tramite fluorescenza e microscopia confocale. Le variabili di natura continua sono state riassunte mediante appropriate statistiche descrittive (media, deviazione standard, mediana, minimo e massimo).

Attraverso un software dedicato (ImageJ, NIH) è stata quantificata la fluorescenza e trasformata in un numero continuo finito. La significatività statistica (posto $p < 0.05$) tra la risposta del tessuto sano e tumorale è stata valutata tramite un apposito software statistico mediante un test non parametrico per campioni appaiati (Kruskall-Wallis). Il software statistico utilizzato è stato SPSS vers. 18 (Statistical Software for Social Science, SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

RISULTATI

Caratteristiche della popolazione di studio

Le caratteristiche demografiche dei pazienti arruolati nello studio e la diagnosi finale istopatologica sono stati riassunti in Tabella I.

Pazienti (N°)	(n=33)
Sesso (M/F)	15/18 (0.8)
Età mediana (range)	67 (36-79) anni
Istotipo	Adenocarcinoma duttale 20 (61%) Adenocarcinoma papillare 6 (18%) Neoplasie cistiche 4 (12%) Linfoma 1 (3%) Carcinoma neuroendocrino 1 (3%) Metastasi adenocarcinoma rene 1 (3%)

Tabella I. Caratteristiche dei pazienti operati. Pazienti inclusi nello studio: Marzo 2009 – Marzo 2011, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Careggi, Firenze SOD Chirurgia Generale e Oncologica (Direttore: Prof. R. Moretti).

Selezione dei pazienti con adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC)

Poiché la biologia degli adenocarcinomi pancreatici di tipo duttale (acronimo anglosassone PDAC), ovvero paradigmatici dei tumori pancreatici, può differire di molto da altri istotipi quali ad esempio le neoplasie cistiche a potenziale di malignità incerto o gli adenocarcinomi non propriamente pancreatici della regione papillare, è

stata fatta un'analisi più approfondita dei primi. In particolare, è stata descritta la stadiazione TNM secondo le direttive dell'AJCC (Tabella II).

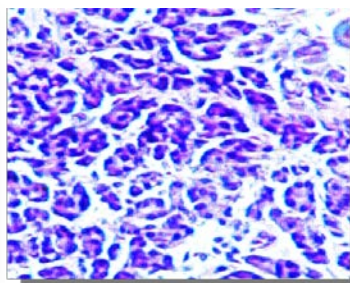
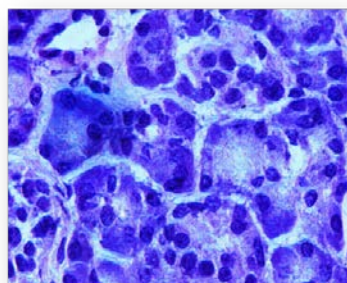
I casi finali sono risultati essere 20 (61%) sul totale, molto meno della reale incidenza di questo istotipo principale che, come precedentemente riportato, arriva ad oltre il 90% del totale. Tale discrepanza può essere spiegata tenendo conto dell'origine della casistica da pezzi operatori di pazienti trattati con intento curativo, limitando in tal modo l'istotipo a prognosi peggiore, inoperabile in oltre la metà dei casi.

Pazienti (N°)	(n=20)
Sesso (M/F)	15/18 (0.8)
Età mediana (range)	65 (36-79) anni
Sesso	
- Maschi	11 (55%)
- Femmine	9 (45%)
Sede	Testa 13 (65%) Corpo-coda 7 (35%)
N+	12 (60%)
TNM	Stage Ib 4 (20%) Stage IIa 2 (5%) Stage IIb 11 (55%) Stage III 4 (20%)

Tabella II. Dati demografici ed istopatologici definitivi dei pazienti affetti da adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC).

Risultati della fluorescenza

Le sezioni di tessuto sano e tumorale sono state identificate preliminarmente mediante colorazione con ematossilina-eosina (**Figura 18A e B**).



A: Tessuto sano

B: Tessuto tumorale

La fluorescenza è stata quindi analizzata in diverse sezioni di frammento sano e tumorale, effettuate per ciascuna coppia biotica corrispondente ad ogni singolo paziente (Figura 19).

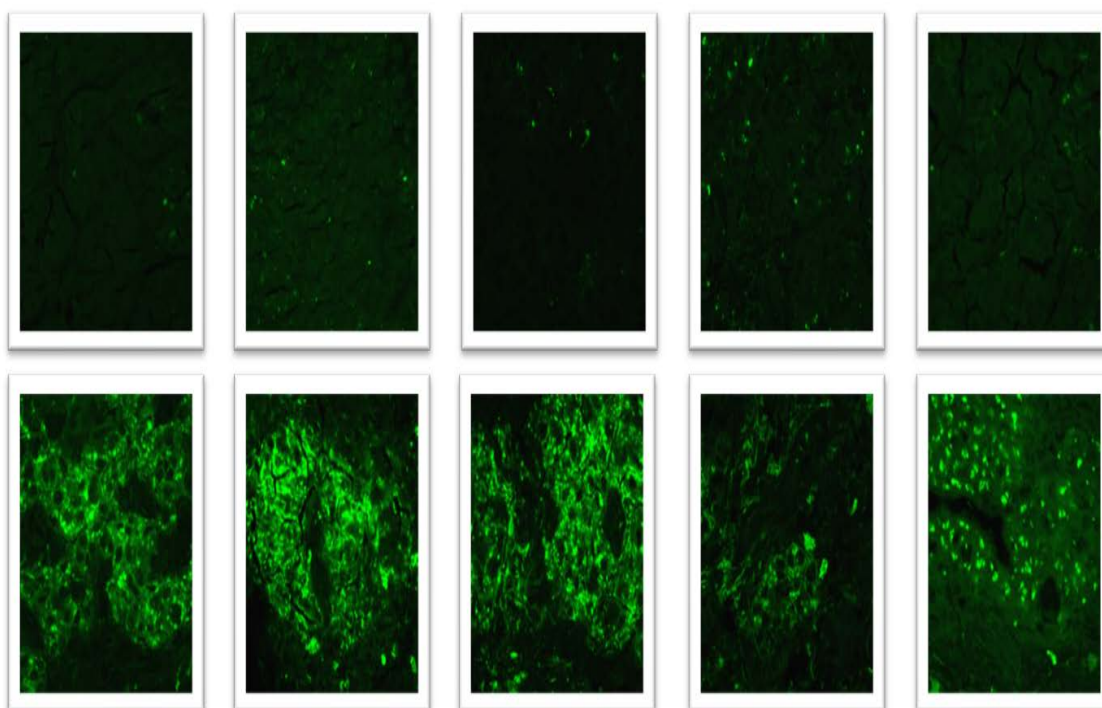


Figura 19. Fluorescenza su 5 sezioni di frammento sano (sopra) e tumorale (sotto).

Attraverso un software dedicato (ImageJ, NIH) è stata quantificata la fluorescenza e trasformata in un numero continuo finito (Figura 20).

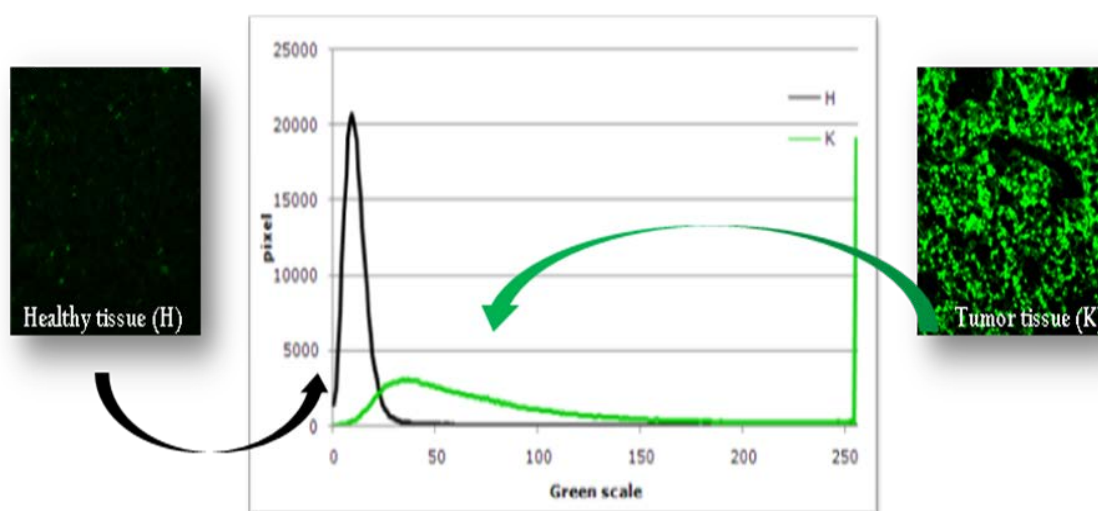


Figura 20. Fluorescenza in RGB scale di sezione di tessuto sano e tumorale di un paziente: trasformazione quantitativa.

La variabile oggetto dello studio statistico è rappresentata dalla risposta dei campioni alle analisi condotte tramite fluorescenza e microscopia confocale. Le variabili di natura continua sono state riassunte mediante appropriate statistiche descrittive (media, deviazione standard, mediana, minimo e massimo). I valori medi della fluorescenza rilevata nei campioni in esame sono riassunti in Tabella II.

Paziente	K	H	K/H	Paziente	K	H	K/H
P1	15,89	9,5	1,673	P14	20,13	7,86	2,561
P2	33,62	14,3	2,351	P17	16,78	21,56	0,778
P3	38,09	16,1	2,366	P20	18,35	14,81	1,239
P4	85,48	11,39	7,505	P22	21,6	20,93	1,032
P6	25,92	12,07	2,147	P28	39,08	46,9	0,833
P8	64,43	15,78	4,083	P30	31,21	26,87	1,162
P9	42,07	19,44	2,164	P31	35,95	30,99	1,16
P10	33,46	6,23	5,371	P32	39,54	33,6	1,177
P11	36	11,23	3,206	P33	40,79	25,98	1,57
P13	31,7	11,48	2,761				

Tabella III. Numero di pixel fluorescenti per ciascun campione: calcolato come media dei pixel di ciascuna sezione analizzata.

La significatività statistica (posto $p < 0.05$) tra la risposta del tessuto sano e tumorale è stata valutata tramite un apposito software statistico mediante un test non parametrico per campioni appaiati (Kruskal-Wallis) (Figura 21). Il software statistico utilizzato è stato SPSS vers. 18 (Statistical Software for Social Science, SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

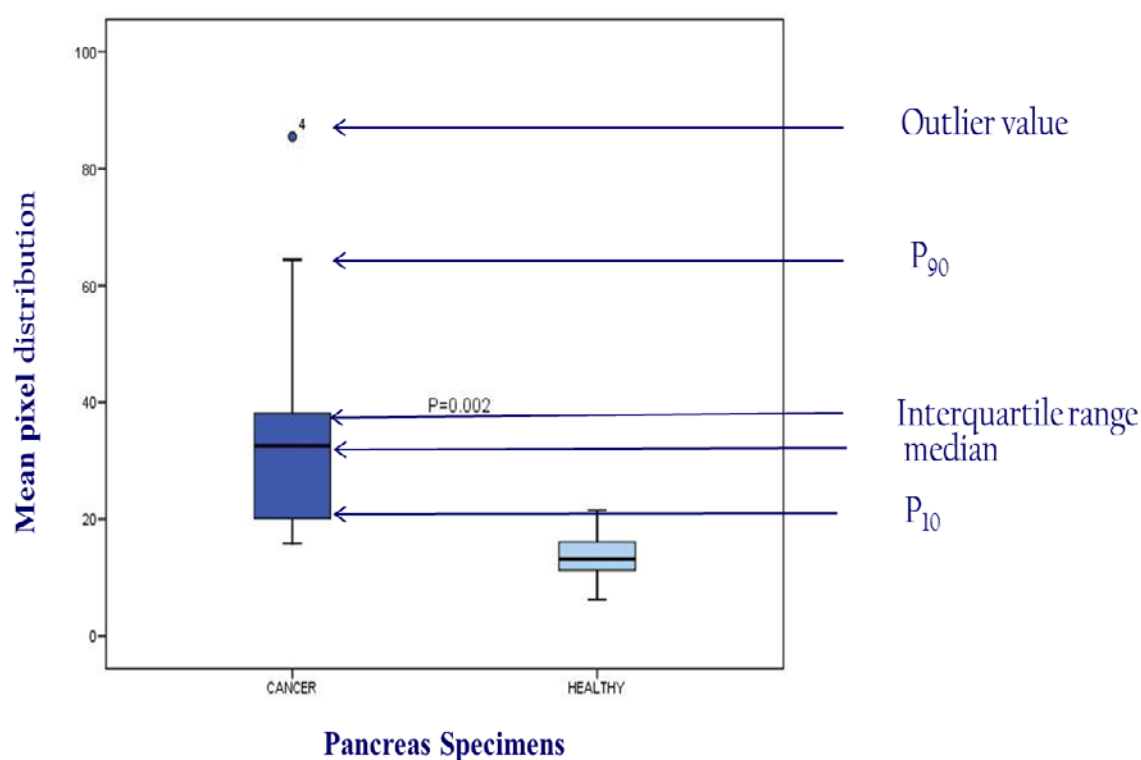


Figura 21. Diagramma tipo “box-plot” che dimostra la significativa differenza statistica di fluorescenza fra tessuto sano e tumorale.

DISCUSSIONE

Fra tutti i tessuti sani e tumorali nei quali si sono dimostrati in vitro ed in vivo overespressi i recettori di NT, il presente studio è stato focalizzato sull'adenocarcinoma pancreatico (PDAC). Questo è dovuto alla necessità di concentrare gli sforzi della ricerca in un settore ove, purtroppo, sia i risultati della “vecchia medicina” che quelli della “terapia mirata” non hanno prodotto risultati incoraggianti. In tale ottica, il finanziamento da parte della rete oncologica toscana (Istituto Tumori Toscano – ITT) era essenzialmente diretto alla ricerca sul PDAC. Inoltre, già dalla fine del secolo scorso, la presenza di recettori di NT si è dimostrata come un marker specifico del PDAC (*Reubi 1998*).

Il cancro del pancreas non è sicuramente tra i tumori più frequenti dell'apparato gastroenterico, ma la sopravvivenza complessiva a 5 anni resta, negli ultimi dati disponibili, inferiore al 6%, (*Horner 2009, Brenner 2009, Artiom 2011*), con una aspettativa di vita media di circa 18 mesi dalla diagnosi, in pazienti operati con finalità radicale e nessun apparente residuo di malattia. Pertanto l'impatto sociale è altamente elevato e rende l'idea di quanto sia attuale la necessità di sviluppare nuove strategie diagnostiche e terapeutiche.

La chirurgia, dopo la riduzione al minimo della mortalità perioperatoria, ha raggiunto il massimo dello sviluppo possibile rimanendo poi stabile da oltre 15 anni, mentre la radioterapia (pre-, post- od intraoperatoria) non sembra aggiungere molto ai risultati. Tuttavia, uno dei problemi principali in chemioterapia classica è la tossicità non specifica della maggior parte degli agenti antitumorali verso le cellule normali. La possibilità di indirizzare specificatamente molecole sulle cellule tumorali è una delle principali sfide nella ricerca sulla terapia e sulla diagnosi del cancro.

Nonostante le promesse iniziali di farmaco-selettività ed efficienza, i nuovi farmaci basati sul “*tumor targeting*” specifico a livello molecolare non hanno tuttora prodotto i risultati attesi in campo clinico, a fronte di difficoltà notevoli nella fase di sintesi e di sviluppo. Tutti questi aspetti si traducono in costi elevatissimi per la maggior parte dei sistemi sanitari pubblici (*Moore 2007, Vervenne 2008, Hidalgo 2010, Vincent A 2011*). Inoltre, da un punto di vista diagnostico/prognostico, nessuno dei molti biomarker studiati e pubblicati si è rivelato impiegabile, a tutt’oggi, nella pratica clinica quotidiana (*Ansari 2011*).

Molti “targeting agents” selettivi, attualmente usati nelle pratiche cliniche, sono anticorpi o small molecules diretti contro antigeni tumore-specifici o maggiormente espressi su tessuti di natura neoplastica. Da qualche anno i peptidi sono stati identificati come valida alternativa ad anticorpi e a small molecules nell’ambiziosa strategia del tumor targeting selettivo.

Queste “piccole proteine” riuniscono alcuni vantaggi tipici delle immunoglobuline e altri peculiari delle small molecules, rappresentando ad oggi uno degli approcci più promettenti per una terapia personalizzata e selettiva. Esse presentano caratteristiche intermedie rispetto ad anticorpi e a small molecules a livello di peso molecolare, costi di sintesi e selettività, configurandosi quindi come punto d’incontro tra queste due classi di biomolecole.

Tra i peptidi figurano anche alcune sequenze endogene che negli ultimi anni hanno riscosso un notevole successo grazie all’over-espressione dei rispettivi recettori osservata in alcune patologie tumorali. I recettori per peptidi endogeni presentano quindi le caratteristiche peculiari per poter esser considerati antigeni tumorali ed i rispettivi peptidi liganti possono essere usati come agenti di targeting.

Questo rappresenterebbe un’opportunità concreta ed efficace per la discriminazione tra cellule sane e neoplastiche. Considerevole sarebbe anche il

risparmio in termini economici che l'utilizzo di suddette sequenze endogene consentirebbe bypassando le lunghe e costose analisi proprie di tecnologie di drug discovery come il de-novo design e lo screening di librerie.

L'osservazione che recettori per diversi peptidi regolatori endogeni (tra cui i neuropeptidi cerebrali, gli enteropeptidi, i peptidi vasoattivi e i peptidi del sistema endocrino) sono over-espressi in alcuni tipi di tumori umani (*Evers 2006*), rappresenta la base di partenza per un possibile utilizzo di peptidi naturali diretti selettivamente contro le cellule tumorali, aprendo nuove prospettive sull'uso di analoghi sintetici per ottimizzazione del tumor-targeting.

Farmaci citotossici o radiotraccianti sono stati coniugati ad analoghi di peptidi regolatori allo scopo di ottenere strutture altamente selettive. Ne è un esempio l'uso clinico di DOTATOC® e OctreoScan®, analoghi stabilizzati del peptide regolatore somatostatina, coniugati con chelanti di metalli, utilizzati rispettivamente per la terapia e la diagnosi di tumori neuroendocrini umani. Qualcosa di analogo è stato recentemente sviluppato, a livello sperimentale e su topi transfettati con cellule di cancro del colon (HT29), sfruttando appunto il legame della NT alla DOTA per la scintigrafia con ^{111}In e la PET con ^{68}Ga (*Alshoukr 2011*).

Le potenzialità di sviluppo di peptidi regolatori endogeni nelle strategie di tumor targeting è supportata anche dalla elevata selettività per il loro bersaglio farmacologico con conseguente minore possibilità che si sviluppino effetti collaterali. Inoltre, la loro piccola dimensione, paragonata a quella di carrier macromolecolari come gli anticorpi, aumenta la loro capacità di permeare i tessuti e di raggiungere i tumori. Infine, la relativa facilità di sintesi (che può essere effettuata su fase solida in maniera automatizzata) e le caratteristiche chimico-fisiche rendono i peptidi particolarmente adatti per eventuali modificazioni e coniugazioni con unità

funzionali. Per queste ragioni molti differenti coniugati costituiti da peptidi carrier e unità citotossiche o radioligandi sono attualmente allo studio.

Tuttavia, l'uso di peptidi in vivo e lo sviluppo di farmaci analoghi sono ampiamente limitati dalla loro breve emivita dovuta alla degradazione provocata dalle proteasi e dalle peptidasi tissutali e plasmatiche. Per aumentarne l'emivita sono state studiate molte differenti strategie, la maggior parte delle quali ne altera profondamente l'attività e la specificità.

Studi recenti effettuati presso il Laboratorio di Biotecnologie Molecolari dell'Università degli Studi di Siena riportano risultati che ripropongono la sintesi di peptidi bioattivi nella forma dendrimerica (*Tam 1988*) come strategia valida per aumentarne la vita media in plasma e siero umani, grazie all'aumentata resistenza all'azione delle proteasi e delle peptidasi e comparando la loro attività biologica e la loro resistenza alle proteasi in confronto a quella dei corrispondenti monometrici (*Bracci 2002, Bracci 2003, Falciani 2007*).

I peptidi dendrimerici risultano essere più efficienti dei peptidi monomerici in diverse applicazioni: la loro natura multimerica li rende infatti adatti ad interazioni polivalenti. E' stato provato che la maggiore efficienza in vivo dei peptidi dendrimerici rispetto ai monomerici è dovuta anche al vantaggio farmacocinetico, cioè alla diversa clearance, oltre che alla resistenza all'attività delle proteasi e delle peptidasi.

I risultati ottenuti indicano che la sintesi in forma dendrimerica può essere un metodo generale per aumentare la stabilità in vivo dei peptidi bioattivi. Infatti, in ciascun caso analizzato, la forma dendrimerica mantiene completamente l'attività del peptide nativo, sia quando si tratti di peptidi che si legano a recettori di membrana (come le encefaline, la neurotensina, la nociceptina) sia quando si legano a recettori solubili (*Bracci 2002, Bracci 2003, Falciani 2007, Falciani 2007*).

Nel corso di questi studi è stato dimostrato, ad esempio, che sia Neurotensina (NT) che il suo frammento attivo NT (8-13), una volta sintetizzati in forma dendrimerica tetraramificata, mantengono completamente la loro attività biologica e diventano molto più resistenti alle proteasi plasmatiche. Il recettore per il peptide regolatore endogeno Neurotensina (NT) è noto per essere over-espresso su numerosi tumori solidi, tra cui gli adenocarcinomi di pancreas, colon, prostata e polmone, considerandolo, pertanto, un potenziale carrier specifico. In particolare, come già dagli studi precedenti, il limite principale è rappresentato dalla sua scarsa emivita in vivo, che può essere oltrepassato sintetizzando la Neurotensina in forma di Multiple Antigen Peptide (*Bracci 2003*).

La sintesi dei peptidi in forma MAP4, modificata per l'attacco di unità funzionali, come descritto in precedenti lavori (*Bracci 2002, Pini 2008, Falciani 2010 e 2011*) presenta notevoli vantaggi in termini di multimericità, resistenza alla proteolisi e modularità.

La multimericità permette al peptide ramificato un "binding" più forte rispetto al peptide monomero, aumentando quindi la selettività verso cellule che over-esprimono il recettore per tale peptide e producendo una più efficiente internalizzazione mediata da recettore. A questi vantaggi va ad aggiungersi anche un peso molecolare almeno 10 volte inferiore rispetto alle IgG, al quale si deve il merito della maggior penetrazione tumorale peptidica rispetto a quella anticorpale.

Un altro punto a favore della struttura ramificata è rappresentato dalla modularità di tale strategia biosintetica che consente la coniugazione al "core" di ramificazione di varie unità funzionali, come agenti chemioterapici o fluorofori, senza andare a compromettere irreparabilmente la capacità di binding. Tale modularità può inoltre consentire di utilizzare un farmaco o un altro o addirittura una combinazione di farmaci utilizzando sempre la stessa molecola carrier.

I peptidi ramificati legati a unità citotossiche possono quindi combinare l'alta selettività data dal legame multimerico al recettore di membrana specifico altamente espresso sul tessuto tumorale, con l'alta efficienza degli attuali farmaci chemioterapici che interferiscono con differenti pathways cellulari.

La sintesi di Neurotensina in forma MAP conferisce quindi alla struttura la stabilità necessaria per lo sviluppo di molecole cliniche e, allo stesso tempo, offre la possibilità di coniugare al peptide ramificato varie unità funzionali attraverso un gruppo amminico libero esposto da una lisina del core. Come per gli altri peptidi sintetizzati in forma MAP, anche per Neurotensina è stato dimostrato che la struttura MAP4 NT(1-13), se confrontata con la corrispettiva sequenza lineare, mantiene intatta la capacità di legare i recettori specifici, anche quando a questa vengono coniugate unità funzionali. È stato inoltre osservato che NT in forma MAP4 può dar luogo a endocitosi mediata da recettore, peculiarità che può esser sfruttata utilizzando tale peptide ramificato come carrier per farmaci citotossici.

In questo lavoro è stato ipotizzato l'uso di peptidi ramificati della Neurotensina coniugati a molecole capaci di emettere fluorescenza come possibili "targeting agents" per una terapia tumorale personalizzata nel cancro del pancreas. In quest'ottica, le analisi su campioni biotipici hanno dato risultati incoraggianti per il possibile futuro sviluppo di queste molecole in ambito di tumor targeting.

Il peptide MAP4 NT(1-13) coniugato, direttamente o indirettamente, con Fluoresceina è stato testato su un campione di 33 biopsie di lesioni pancreatiche tumorali, 20 delle quali derivanti da resezione chirurgica di adenocarcinoma duttale pancreatico classico. Il segnale di fluorescenza così ottenuto è stato quindi confrontato con quello derivante da un saggio analogo su tessuto sano dello stesso paziente. I dati risultanti hanno evidenziato una netta differenza (statisticamente significativa) nell'emissione di fluorescenza tra tessuto tumorale e corrispettivo sano.

Tale discrepanza tra i segnali di fluorescenza è stata opportunamente quantizzata numericamente digitalizzando l'immagine in scala RGB che, per ciascun paziente analizzato, ha mostrato valori numerici relativi alla fluorescenza specifica del tessuto tumorale (K) e del corrispettivo sano (H).

La possibilità di calcolare un rapporto K/H offre a questa strategia la possibilità, se ulteriormente e adeguatamente sviluppata, di candidarsi come metodo di "tumor imaging" per molte patologie neoplastiche del tratto gastro-intestinale.

L'eterogeneità dei risultati ottenuti all'interno del nostro campione riflette la variabilità fenotipica tipica delle patologie tumorali in sé all'interno della popolazione, sottolineando ancora una volta quanto sia importante oggi lo sviluppo di strategie come quella esposta che abbiano le potenzialità di portare avanti un trattamento su base individuale (*Tailored therapy*).

Il peptide dendrimerico presenta, in conclusione, 3 caratteristiche che lo rendono un potenziale agente sia tracciante che terapeutico: la multimericità che aumenta la selettività e specificità di legame, la resistenza alla proteolisi che ne permette l'impiego in vivo, la modularità che ne garantisce l'impiego con finalità diverse.

Prospettive future di applicazione

Come già detto, la modularità del peptide tetra-ramificato può essere un potente mezzo in grado di "armare" la molecola con varie unità funzionali, come agenti terapeutici o sonde per un imaging pre-terapeutico. Altri gruppi di ricerca si sono invece orientati verso l'utilizzo di agonisti-antagonisti del segnale diretto di NT interferendo con la sua supposta capacità neoproliferativa diretta. In tale ottica sono state messe a punto strategie diverse di stabilizzazione del peptide in vivo,

rendendolo ad esempio ciclico o sintetizzando l'analogo isomerico (*Myers 2009, Röhrich 2011*).

Mantenendo quindi l'idea innovativa di utilizzare una stessa molecola per “segnare” i tessuti malati prima e per curare la patologia stessa poi, lo studio potrebbe essere sviluppato in varie direzioni, tra le quali la sperimentazione in vivo (su topi xenotrapiantati) di test atti a valutare l'effettiva unione tra specificità ed efficienza offerta da peptidi MAP coniugati con molecole chemioterapiche, in analogia a quanto già provato con modelli di cancro del colon.

L'obiettivo finale potrebbe essere l'impiego in vivo su esseri umani, sia per quanto riguarda la parte diagnostica (es. coniugando il MAP4 a molecole radiotraccianti in grado di essere rilevate dalle comuni metodiche di imaging nucleari ed in analogia con quello che viene comunemente impiegato nella pratica clinica per i tumori neuroendocrini – Octreoscan) che terapeutica (es. coniugando il MAP4 alla Gemcitabina).

CONCLUSIONI

La dimostrazione della capacità da parte di un peptide ramificato (dendrimerico) - Neurotensina D4 - di riconoscere in maniera specifica bersagli (target) tumorali molecolari su tessuti umani di adenocarcinoma pancreatico incoraggia verso il potenziale sviluppo di tali molecole in vivo. La capacità discriminante ex-vivo potrebbe, inoltre, rivelarsi utile nei casi, tutt'altro che infrequenti, di dubbi diagnostici, ovvero come fattore prognostico e di selezione di pazienti a maggiore responsività ai trattamenti.

Gli studi preliminari in vitro di citotossicità su colture cellulari ed in vivo su animali da esperimento incoraggiano verso un impiego di questa nuove molecole per veicolare i chemioterapici in maniera più selettiva e con minori effetti collaterali.

In futuro, tali peptidi potrebbero portare ad un importante passo avanti nella diagnostica e nella terapia di tumori altamente letali e resistenti alle chemioterapie convenzionali.

BIBLIOGRAFIA:

1. ARTIOM AA. *Epidemiol Prev* 2011; 35 (5-6) supp. 3: 94.
2. Achilefu S, Srinivasan A, Schmidt MA, Jimenez HN, Bugaj JE, Erion JL. Novel bioactive and stable neurotensin peptide analogues capable of delivering radiopharmaceuticals and molecular beacons to tumors. *J Med Chem* 2003; 46: 3403-11.
3. Alberts SR, Gores GJ, Kim GP, Roberts LR, Kendrick ML, Rosen CB, Chari ST, Martenson JA. Treatment options for hepatobiliary and pancreatic cancer. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 628-37.
4. Alshoukr F, Prignon A, Brans L, Jallane A, Mendes S, Talbot JN, Tourwé D, Barbet J, Gruaz-Guyon A. Novel DOTA-neurotensin analogues for ¹¹¹In scintigraphy and ⁶⁸Ga PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors. *Bioconjug Chem* 2011; 22: 1374-85.
5. Ansari D, Rosendahl A, Elebro J, Andersson R. Systematic review of immunohistochemical biomarkers to identify prognostic subgroups of patients with pancreatic cancer. *Br J Surg* 2011;98:1041-55.
6. Bakirtzi K, Hatziapostolou M, Karagiannides I, Polytaichou C, Jaeger S, Iliopoulos D, Pothoulakis C. Neurotensin Signaling Activates MicroRNAs-21 and -155 and Akt, Promotes Tumor Growth in Mice, and Is Increased in Human Colon Tumors. *Gastroenterology* 2011; 141: 1749-61.
7. Bao PQ, Ramanathan RK, Krasinkas A, Bahary N, Lembersky BC, Bartlett DL, Hughes SJ, Lee KK, Moser AJ, Zeh HJ 3rd. Phase II study of gemcitabine and erlotinib as adjuvant therapy for patients with resected pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 2011;18:1122-9.

8. Borghaei H and Schilder RJ. Safety and efficacy of radioimmunotherapy with yttrium 90 ibritumomab tiuxetan (Zevalin). *Semin Nucl Med* 2004; 34: 4-9.
9. Borja-Cacho D, Jensen EH, Saluja AK, Buchsbaum DJ, Vickers SM. Molecular targeted therapies for pancreatic cancer. *Am J Surg* 2008; 196: 430-41.
10. Bracci L, Falciani C, Lelli B, Lozzi L, Runci Y, Pini A, De Montis MG, Tagliamonte A, Neri P. Synthetic peptides in the form of dendrimers become resistant to protease activity. *J Biol Chem.* 2003; 278: 46590-5.
11. Bracci L, Lozzi L, Pini A, Lelli B, Falciani C, Niccolai N, Bernini A, Spreafico A, Soldani P, Neri P. Branched peptide mimotope of the nicotinic receptor binding site is a potent synthetic antidote against the snake neurotoxin alpha-bungarotoxin. *Biochemistry* 2002; 41: 10194-9.
12. Brenner H, Francisci S, de Angelis R, Marcos-Gragera R, Verdecchia A, Gatta G, Allemani C, Ciccolallo L, Coleman M, Sant M; EUROCORE Working Group. Long-term survival expectations of cancer patients in Europe in 2000-2002. *Eur J Cancer* 2009; 45: 1028-41.
13. Brown KM. Approach to Tumors of the Pancreas and Biliary Tree. *Surg Clin N Am* 2009; 89: 115-31.
14. Carraway RE and Leeman SE. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem* 1973; 248: 6854-61.
15. Carter PJ and Senter PD Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Cancer J* 2008; 14: 154-69.
16. Chames P, Kerfelec B, Baty D. Therapeutic antibodies for the treatment of pancreatic cancer. *Scientific World Journal* 2010; 10: 1107-20.

17. Cohen SJ, Cohen RB, Meropol NJ. Targeting Signal Transduction with Antibodies. In De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer. Principle & Practice of Oncology*, 8th d. Lippincot Williams & Wilkins 2008, Philadelphia.
18. Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, Wernery U, De Baetselier P, Muyldermans S, Revets H. Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res* 2004; 64: 2853-7.
19. Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, Firpo MA, Mulvihill SJ. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 2010; 39: 425-35.
20. Dimou AT, Syrigos KN, Saif MW. Novel agents in the management of pancreatic adenocarcinoma: phase I studies. Highlights from the "2011 ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium". San Francisco, CA, USA. January 20-22, 2011. *JOP* 201; 12: 114-6.
21. Dupouy S, Mourra N, Doan VK, Gompel A, Alifano M, Forgez P. The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie* 2011;93:1369-78.
22. Erlich P. On immunity with special reference to cell life: Croonian lecture The collected papers of Paul Erlich, Vol II: Immunology and Cancer Research 148-192, Pergammon, London, 1956
23. Evers BM. Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. *Peptides* 2006;27:2424-33.
24. Falciani C, Fabbrini M, Pini A, Lozzi L, Lelli B, Pileri S, Brunetti J, Bindi S, Scali S, Bracci L. Synthesis and biological activity of stable branched neurotensin peptides for tumor targeting. *Mol Cancer Ther* 2007; 9: 2441-8.

25. Falciani C, Lozzi L, Pini A, Bracci L. Bioactive peptides from libraries. *Chem Biol* 2005; 12: 417-26 .
26. Falciani C, Lozzi L, Pini A, Corti F, Fabbrini M, Bernini A, Lelli B, Niccolai N, Bracci L. Molecular basis of branched peptides resistance to enzyme proteolysis. *Chem Biol Drug Des* 2007; 69: 216-21.
27. Falciani C, Lelli B, Brunetti J, Pileri S, Cappelli A, Pini A, Pagliuca C, Ravenni N, Bencini L, Menichetti S, Moretti R, De Prizio M, Scatizzi M, Bracci L. Modular branched neurotensin peptides for tumor target tracing and receptor-mediated therapy: a proof-of-concept. *Curr Cancer Drug Targets* 2010;10:695-704.
28. Falciani C, Accardo A, Brunetti J, Tesauro D, Lelli B, Pini A, Bracci L, Morelli G. Target-selective drug delivery through liposomes labeled with oligobranched neurotensin peptides. *Chem Med Chem* 2011; 6: 678-85.
29. Feliu J, Borrega P, León A, López-Gómez L, López M, Castro J, Belda-Iniesta C, Barriuso J, Martínez V, González-Barón M. Phase II study of a fixed dose-rate infusion of gemcitabine associated with erlotinib in advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 67: 215-21.
30. Forrer F, Valkema R, Kwekkeboom DJ, de Jong M, Krenning EP. “Neuroendocrine tumors. Peptide receptor radionuclide therapy” *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007; 21: 111-29.
31. Frelove R, Walling AD. Pancreatic Cancer: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician* 2006; 73: 485-92.
32. García-Garayoa E, Allemann-Tannahill L, Bläuenstein P, Willmann M, Carrel-Rémy N, Tourwé D, Iterbeke K, Conrath P, Schubiger PA. In vitro and in vivo evaluation of new radiolabeled neurotensin(8-13) analogues with high affinity for NT1 receptors. *Nucl Med Biol* 2001; 28: 75-84.

33. García-Garayoa E, Bläuenstein P, Bruehlmeier M, Blanc A, Iterbeke K, Conrath P, Tourwé D, Schubiger PA. Preclinical evaluation of a new, stabilized neurotensin(8-13) pseudopeptide radiolabeled with (99m)tc. *J Nucl Med* 2002; 43: 374-83 .
34. Gore SD, Baylin SB, Herman JG. Histone Deacetylase Inhibitors and Demethylating Agents. In De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer.Principle & Practice of Oncology*, 8th d. Lippincot Williams & Wilkins 2008, Philadelphia.
35. Griggs J, Zinkewich-Peott K. The state of the art: immune-mediated mechanism of monoclonal antibodies in cancer therapy. *Br J Canc* 2009; 101: 1807-12.
36. Gui X, Guzman G, Dobner PR, Kadkol SS.Increased neurotensin receptor-1 expression during progression of colonic adenocarcinoma.*Peptides* 2008;29:1609-15.
37. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
38. Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Ochi N, Tong Z, Deorukhkar A, Sung B, Kelland L, Jamieson S, Sutherland R, Raynham T, Charles M, Bagherzadeh A, Foxton C, Boakes A, Farooq M, Maru D, Diagaradjane P, Matsuo Y, Sinnett-Smith J, Gelovani J, Krishnan S, Aggarwal BB, Rozengurt E, Ireson CR, Guha SA. novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2010;9:1136-46.
39. Hartwig W, Hackert T, Hinz U, Gluth A, Bergmann F, Strobel O, Büchler MW, Werner J. Pancreatic cancer surgery in the new millennium: better prediction of outcome.*Ann Surg.* 2011; 254: 311-9.
40. Hermans E and Maloteaux JM. Mechanisms of regulation of neurotensin receptors *Pharmacol Ther*1998; 79: 89-104.

41. Hidalgo M. Pancreatic Cancer *N Engl J Med* 2010; 362: 1605-17.
42. Hochster HS, Haller DG, de Gramont A, Berlin JD, Philip PA, Moore MJ, Ajani JA. Consensus Report of the International Society of Gastrointestinal Oncology on Therapeutic Progress in Advanced Pancreatic Cancer. *Cancer* 2006; 107: 676-85.
43. Hong F, Zaidi J, Cusack B, Richelson E. Synthesis and biological studies of novel neurotensin(8-13) mimetics. *Bioorg Med Chem* 2002; 10: 3849-58.
44. Hong SM, Park JY, Hruban RH, Goggins M. Molecular signatures of pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 716-27.
45. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlander N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis DR, Eisner MP, Stinchcomb DG, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/, based on November 2008 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2009.
46. Hwang JI, Kim DK, Kwon HB, Vaudry H, Seong JY. Phylogenetic history, pharmacological features, and signal transduction of neurotensin receptors in vertebrates. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1163: 169-78.
47. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in Cancer: Small Molecules With a Huge Impact. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5848-56.
48. Ishizuka J, Townsend CM, Thompson JC. Neurotensin Regulates Growth of Human Pancreatic Cancer. *Ann Surg* 1993; 217: 439-46.
49. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, *CA Cancer J Clin.* 2010; 60: 277-300
50. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.

51. Kaminski MS, Tuck M, Estes J, Kolstad A, Ross CW, Zasadny K, Regan D, Kison P, Fisher S, Kroll S, Wahl RL. 131I-tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma. *N Engl J Med* 2005; 52: 441-9.
52. Ladner RC, Sato AK, Gorzelany J, de Souza M. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today* 2004; 9: 525-9.
53. Langer M, Beck-Sickinger AG. Peptides as carrier for tumor diagnosis and treatment. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2001; 1: 71-93.
54. Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ. Cancer immunotherapy--revisited. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 591-600.
55. Li C, Lee CJ, Simeone DM. Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods Mol Biol* 2009; 568: 161-73.
56. Linenberger ML. CD33-directed therapy with gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance. *Leukemia* 2005; 19: 176-82.
57. Lo Russo PM, Ryan AJ, Boerner SA, Herbst RS. Small-Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors. In De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer. Principle & Practice of Oncology*, 8th d. Lippincot Williams & Wilkins 2008, Philadelphia.
58. Lozzi L, Lelli B, Runci Y, Scali S, Bernini A, Falciani C, Pini A, Niccolai N, Neri P, Bracci L. Rational design and molecular diversity for the construction of anti-alpha-bungarotoxin antidotes with high affinity and in vivo efficiency. *Chem Biol* 2003; 10: 411-7.
59. Lundquist J and Dix TA. Abstract Preparation and receptor binding affinities of cyclic C-terminal neurotensin (8-13) and (9-13) analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 1999; 9: 2579-82 .

60. Massa F, Tormo A, Béraud-Dufour S, Coppola T, Mazella J. Neurotensin-induced Erk1/2 phosphorylation and growth of human colonic cancer cells are independent from growth factors receptors activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 414: 118-22.
61. Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an update. *Dig Dis* 2010; 28: 645-56.
62. McPherson JD, Marra M, Hillier L, McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J et al. A physical map of the human genome. *Nature* 2001; 409: 934-941.
63. Meloen R, Timmerman P, Langedijk H. Bioactive peptides based on diversity libraries, supramolecular chemistry and rational design: a new class of peptide drugs. Introduction. *Mol Divers* 2004; 8: 57-9.
64. Merika E, Syrigos KN, Saif MW. Pharmacogenetics and other molecular targets in the management of pancreatic adenocarcinoma. Highlights from the "2010 ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA. June 4-8, 2010. *JOP* 2010; 11: 328-30.
65. Mihaljevic AL, Michalski CW, Friess H, Kleeff J. Molecular mechanism of pancreatic cancer--understanding proliferation, invasion, and metastasis. *Langenbecks Arch Surg* 2010; 395: 295-308.
66. Molineaux CJ, Crews CM. Proteasome Inhibitors. In De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer. Principle & Practice of Oncology*, 8th d. Lippincot Williams & Wilkins 2008, Philadelphia.
67. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer:

- a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25:1960-6.
68. Muller KM, Tveteraas IH, Aasrum M, Odegard J, Dawood M, Dajani O, Christoffersen T, Sandnes DL. Role of protein kinase C and epidermal growth factor receptor signalling in growth stimulation by neurotensin in colon carcinoma cells. *BMC Cancer* 2011;11:421.
69. Mustain WC, Rychahou PG, Evers BM. The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011; 18: 75-82.
70. Myers RM, Shearman JW, Kitching MO, Ramos-Montoya A, Neal DE, Ley SV. Cancer, Chemistry, and the Cell: Molecules that Interact with the Neurotensin Receptors. *ACS Chem Biol* 2009; 4: 503-25.
71. Newsome BW and Ernstoff MS. The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies in the treatment of malignancy, have the magic bullets arrived? *Br J Clin Pharmacol* 2008; 66: 6-19.
72. Pini A, Giuliani A, Falciani C, Fabbrini M, Pileri S, Lelli B, Bracci L. Characterization of the branched antimicrobial peptide M6 by analyzing its mechanism of action and in vivo toxicity. *J Pept Sci* 2007; 13: 393-9.
73. Pini A, Giuliani A, Falciani C, Runci Y, Ricci C, Lelli B, Malossi M, Neri P, Rossolini GM, Bracci L. Antimicrobial activity of novel dendrimeric peptides obtained by phage display selection and rational modification. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2665-72.
74. Pini A, Giuliani A, Ricci C, Runci Y, Bracci L. Strategies for the construction and use of peptide and antibody libraries displayed on phages. *Curr Protein Pept Sci* 2004; 5: 487-96 .

75. Pini A, Runci Y, Falciani C, Lelli B, Brunetti J, Pileri S, Fabbrini M, Lozzi L, Ricci C, Bernini A, Tonello F, Dal Molin F, Neri P, Niccolai N, Bracci L. Stable peptide inhibitors prevent binding of lethal and oedema factors to protective antigen and neutralize anthrax toxin in vivo. *Biochem J* 2006; 395:157-63 .
76. Ranganathan P, Harsha HC, Pande A. Molecular Alterations in Exocrine Neoplasms of the Pancreas. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 405–12.
77. Reubi JC. In vitro identification of vasoactive intestinal peptide receptors in human tumors: implications for tumor imaging. *J Nucl Med* 1995; 36: 1846-53.
78. Reubi JC. Neuropeptide receptors in health and disease: the molecular basis for in vivo imaging. *J Nucl Med* 1995; 36: 1825-35.
79. Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev* 2003; 24: 389-427.
80. Reubi JC, Mäcke HR, Krenning EP. Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. *J Nucl Med* 2005; 46 Suppl 1: 67-75.
81. Reubi JC, Waser B, Friess H, Büchler M, Laissue J. Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma. *Gut* 1998; 42: 546-50.
82. Reubi JC. Somatostatin and other Peptide receptors as tools for tumor diagnosis and treatment. *Neuroendocrinology* 2004; 80 Suppl 1: 51-6.
83. Riley LB, Desai DC. The Molecular Basis of Cancer and the Development of Targeted Therapy. *Surg Clin N Am* 2009; 89: 1-15.
84. Rivera F, López-Tarruella S, Vega-Villegas ME, Salcedo M. Treatment of advanced pancreatic cancer: From gemcitabine single agent to combinations and targeted therapy. *Cancer Treatment Reviews* 2009; 35: 335–9.

85. Röhrich A, Bergmann R, Kretzschmann A, Noll S, Steinbach J, Pietzsch J, Stephan H. A novel tetrabranched neurotensin(8-13) cyclam derivative: synthesis, ⁶⁴Cu-labeling and biological evaluation. *J Inorg Biochem* 2011;105:821-32.
86. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1673-84.
87. Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 473-80.
88. Tam JP Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5409-13.
89. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-51.
90. Vervenne W, Bennouna J, Humblet Y, Gill S, Moore MJ, Van Laethem J, Shang A, Cosaert J, Verslype C, Van Cutsem E. A randomized, double-blind, placebo (P) controlled, multicenter phase III trial to evaluate the efficacy and safety of adding bevacizumab (B) to erlotinib (E) and gemcitabine (G) in patients (pts) with metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: suppl; abstr 4507.
91. Vincent JP Neurotensin receptors: binding properties, transduction pathways, and structure *Cell Mol Neurobiol* 1995; 15: 501-12.
92. Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P. Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 302-9.
93. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011; 378: 607-20.

94. Wang X, Jackson LN, Johnson SM, Wang Q, Evers BM. Suppression of neurotensin receptor type 1 expression and function by histone deacetylase inhibitors in human colorectal cancers. *Mol Cancer Ther* 2010;9:2389-98.
95. Weiner LM, Dhodapkar MV, Ferrone S. Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *Lancet* 2009; 373: 1033-1040.
96. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 317-327.
97. Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, Czuczman MS, Emmanouilides C, Joyce R et al. Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2453-63.
98. Yang GY, Wagner TD, Fuss M, Thomas CR. Multimodality Approaches for Pancreatic Cancer. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:352-67.
99. Zavoral M, Minarikova P, Zavada F, Salek C, Minarik M. Molecular biology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 2897-908.
100. Zuckerman DS, Ryan DP. Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *Cancer* 2008; 112: 243-9.