



TerPage

**FOR MARCHE FESR 2007-2013 – Intervento 1.1.1.04.02
“PROMOZIONE DELLA RICERCA INDUSTRIALE E DELLO
SVILUPPO SPERIMENTALE IN FILIERE
TECNOLOGICOPRODUTTIVE”**

Senigallia 24 Maggio 2016

Prof. Mauro Magnani

Diatheva Srl

mauro.magnani@uniurb.it

Giuseppe Ottaviani 100 anni, marchigiano, campione europeo master indoor 200m

miletomarathon.it

RAZIONALE: In Europa e negli USA patologie cardiocircolatorie, cancro e malattie delle basse vie respiratorie sono quelle a più alta incidenza nella popolazione anziana e sono tra le principali cause di morte. In particolare l'incidenza dell'infarto, dei tumori del colon-retto e delle BPCO aumenta con l'età (JAGS 60:323–327, 2012). Il progressivo allungamento della vita è per gran parte attribuibile proprio alla diminuzione di mortalità per queste tre classi di patologie (meno 13,3 % nel periodo 2000-2010) (National Vital Statistics System, Mortality USA).

IL PROGETTO: LA REALIZZAZIONE DI STRUMENTI DIAGNOSTICI E TERAPEUTICI INNOVATIVI (DEFINITI COLLETTIVAMENTE **DISPOSITIVI MEDICI**) CHE CONTRIBUISCANO ALLA REALIZZAZIONE DI UN APPROCCIO PERSONALIZZATO PER LA CURA DELLE PATOLOGIE MAGGIORMENTE DIFFUSE NELLA POPOLAZIONE ANZIANA QUALI LE PATOLOGIE DELL'APPARATO RESPIRATORIO (BRONCOPNEUMOPATIE CRONICO-OSTRUTTIVE, BPCO), LE PATOLOGIE CARDIOVASCOLARI (INFARTO ACUTO DEL MIOCARDIO, AMI) ED I TUMORI.

TerPAge

Terapie Personalizzate Età avanzata

OBIETTIVI: Il progetto concerne innovazione di prodotto con la realizzazione di **dodici nuovi kit diagnostici ed un nuovo dedicato dispositivo medico per la somministrazione di farmaci.**

Saranno realizzati i primi **prototipi non commercializzabili** per tutti i prodotti citati sopra e saranno attivati specifici protocolli clinici idonei a valutare e a validare la trasferibilità e la riproducibilità delle tecnologie presso strutture pubbliche (INRCA, Azienda Sanitaria della Regione Marche) (**progetti di dimostrazione pilota**). Tutti i dispositivi medici saranno inoltre, durante il progetto o al termine dello stesso, marcati CE-IVD secondo la normativa vigente.

Le Imprese.

(progettazione, realizzazione e certificazione dei dispositivi medici)

Università ed Enti di Ricerca:

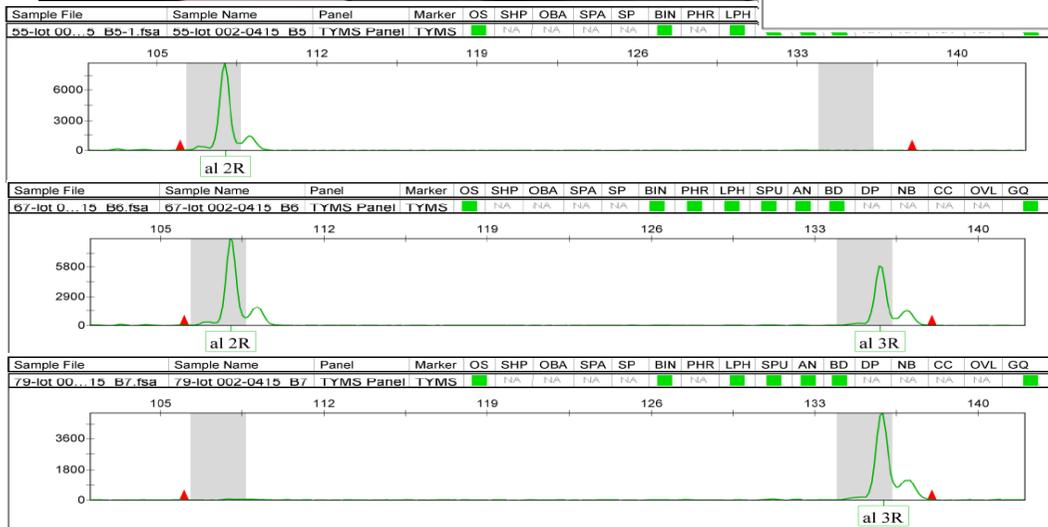
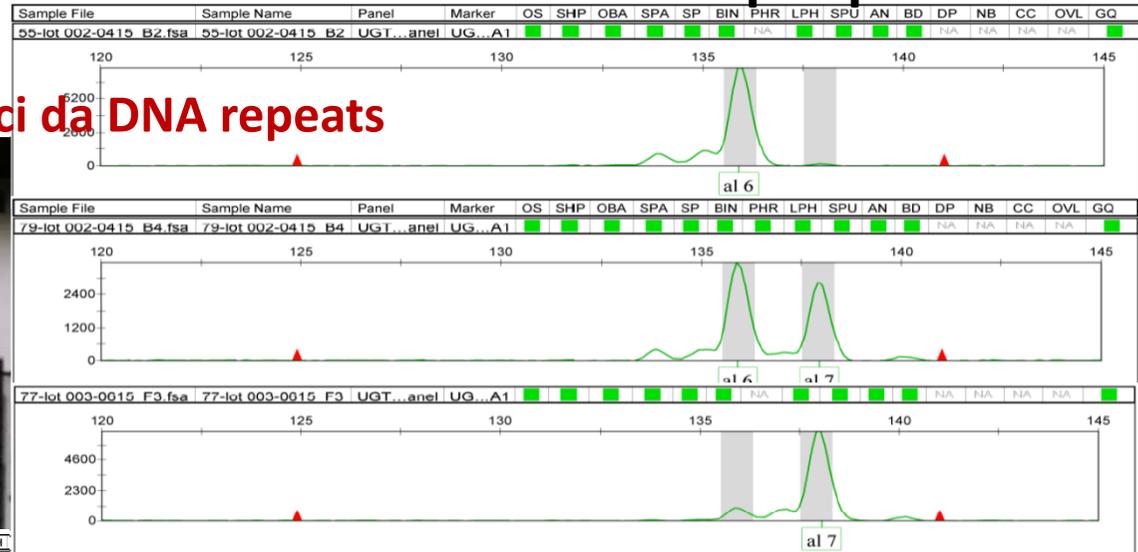
(collaborare nella progettazione, valutare e validare la trasferibilità e la riproducibilità delle tecnologie presso strutture sanitarie)



Analisi dei frammenti: UGT1A1*28 e TYMS 28bp repeats

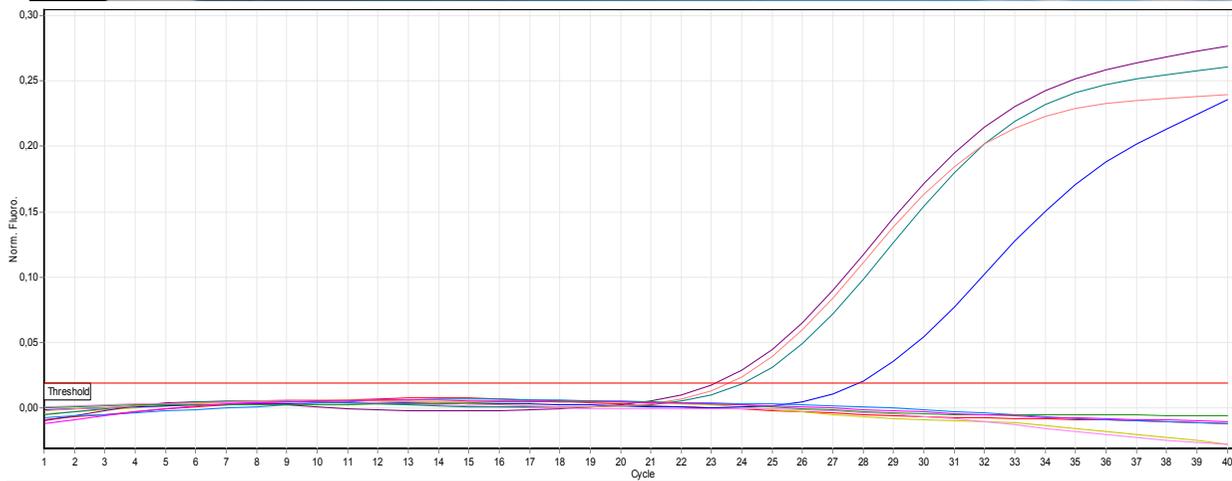
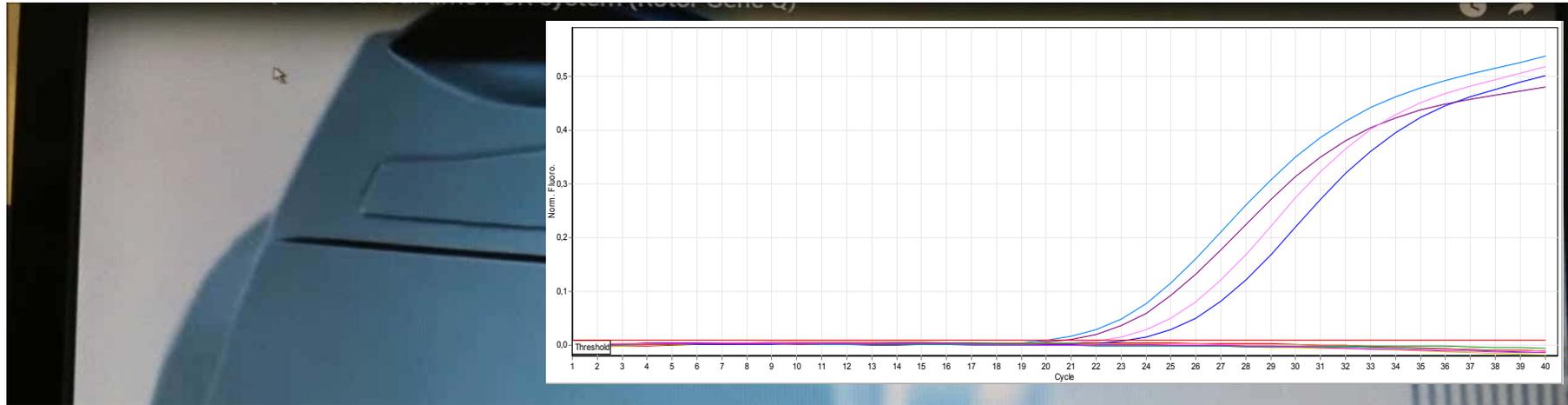
Obiettivo Realizzativo 1:

Detection di polimorfismi genici da DNA repeats



Real time PCR: GSTT1/M1 del

Obiettivo Realizzativo 1



TERPAGE Obiettivo Realizzativo 2: Sviluppo di kit per MassARRAY per detection di SNPs predittori di tossicità/efficacia nei trattamenti del tumore al colon-retto

Il kit **Myriapod® ADMET** permette il rilevamento e l'identificazione di 126 polimorfismi in 58 geni coinvolti nell'Assorbimento, nella Distribuzione, nel Metabolismo, nell'Eliminazione e nella Tossicità dei chemioterapici antitumorali.

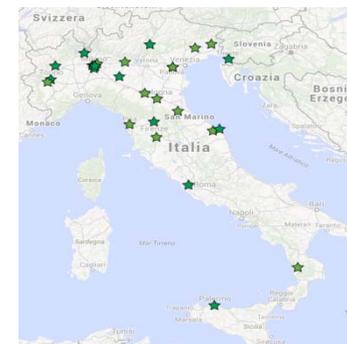
Geni analizzati: DPYD, UGT1A1, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, ABCB1, GSTP1, TSER, ERCC1, RRM1, XRCC1, CDA e molti altri.

Farmaci considerati: fluoropirimidine, irinotecano, derivati del platino, ecc.



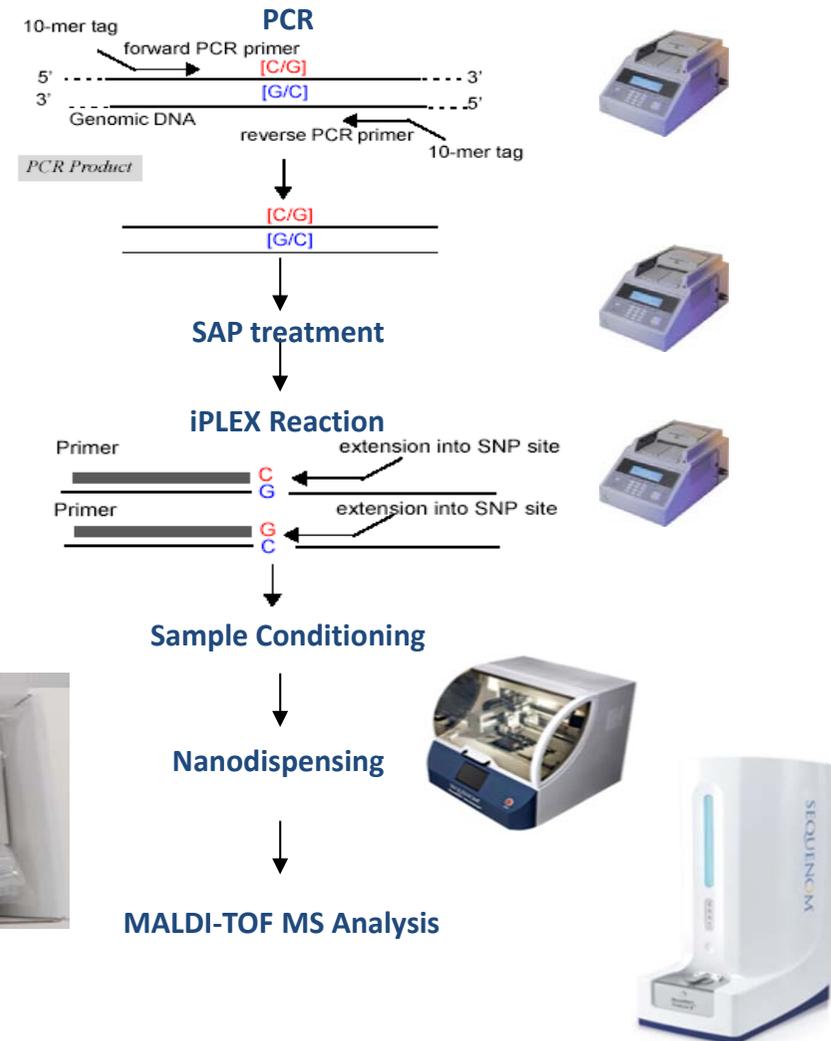
Il kit **Myriapod® ADMET** è stato progettato, sviluppato e validato secondo quanto previsto dal D.Lgs n. 332 del 08/09/2000 e successive modifiche ed integrazioni (“Attuazione della direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*”).

Il kit **Myriapod® ADMET** è presente sul mercato italiano dal marzo 2015.



- Piattaforma: Spettrometria di Massa MALDI-TOF associata alla tecnologia Single Base Extension.

- 8 reazioni multiplex
- 1 profilo termico
- < 10 h dal DNA ai genotipi
- ≥ 99.7% accuratezza
- Reagenti controllo positivo di reazione



Circa 50 esperimenti sono stati eseguiti tra la fase di messa a punto del kit e quella di validazione per la valutazione delle sue prestazioni.

Specificità

Sono stati testati 150 campioni di DNA con diverso genotipo già caratterizzati con metodi alternativi (Pyrosequencing, High resolution Melt, Sequenziamento Sanger, RFLP). Di questi 129 provenivano dal Dipartimento di Scienze Biomolecolari dell'Università degli Studi di Urbino. Tutti i campioni sono stati correttamente genotipizzati.

Sensibilità analitica

Sono state testate, in due sedute indipendenti, differenti concentrazioni di DNA comprese nel range 200-5 ng/reazione. Il limite di sensibilità è risultato pari a: 10 ng di DNA.

Robustezza

Comparazione diversi metodi di estrazione

Tutti i campioni, indipendentemente dal metodo di estrazione, hanno dato un risultato concordante e accettabile a livello di genotipizzazione.

Variabilità tra strumenti e tra operatori

Non sono state rilevate differenze sostanziali, in termini di risultati, tra gli strumenti impiegati, né tra sedute eseguite da operatori diversi.

Lot to lot consistency

Sono stati testati per tutti i saggi almeno due diversi lotti di oligonucleotidi e reagenti di amplificazione/estensione per valutare la variabilità delle forniture delle materie prime necessarie all'assemblaggio del kit finale.

Riproducibilità (variabilità *inter-assay*)

I risultati sono stati riproducibili a livello di genotipizzazione per tutti i saggi analizzati in due sedute indipendenti, eseguite da due operatori differenti.

Ripetibilità (variabilità *intra-assay*)

I risultati sono ripetibili in termini di genotipizzazione per tutti i saggi analizzati, tra le repliche dei campioni testati nella stessa seduta.

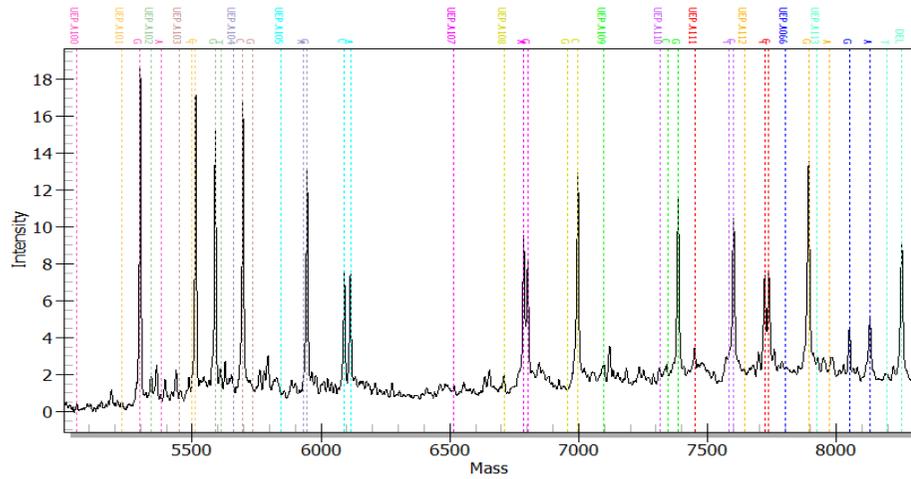


Plate Data						
Sample Id	Sample Description	Call	Assay Id	Well Position	Description	
261	02 20160428	G	A074	E02	K.Non-Polymorphic	
262	02 20160428	AG	A072	E02	J.Polymorphic	
263	02 20160428	CA	A071	E02	J.Polymorphic	
264	02 20160428	GA	A070	E02	J.Polymorphic	
265	02 20160428	G	A069	E02	K.Non-Polymorphic	
266	02 20160428	AG	A068	E02	J.Polymorphic	
267	02 20160428	G	A083	E02	K.Non-Polymorphic	
268	02 20160428	A	A082	E02	K.Non-Polymorphic	
269	02 20160428	G	A081	E02	K.Non-Polymorphic	
270	02 20160428	C	A080	E02	K.Non-Polymorphic	
271	02 20160428	A	A079	E02	K.Non-Polymorphic	
272	02 20160428	A	A078	E02	K.Non-Polymorphic	
273	02 20160428	AAGTTA.DEL	A077	E02	J.Polymorphic	
274	02 20160428	T	A076	E02	K.Non-Polymorphic	



Dossier - TABELLA RISULTATI CORSA - plateData: 20160503_CLsample.csv

SAMPLE_ID	Marker	Valore Marker
02 20160428_CL	DPYD rs1801159-rs1801265-rs1801158-rs55886062-rs3918290-rs1801160	*5/*9
02 20160428_CL	DPYD_1896T>C rs17376848	T
02 20160428_CL	DPYD_2846A>T rs67376798	A
02 20160428_CL	DPYD_496A>G rs2297595	A
02 20160428_CL	DYNC2H1_6980574A>G rs716274	GA
02 20160428_CL	EGFR_1562G>T/C/A rs2227983	GA
02 20160428_CL	EGFR_2369C>T rs121434569	C
02 20160428_CL	ERBB2_1963A>G/T/C rs1136201	A
02 20160428_CL	ERCC1_*197G>T rs3212986	G

54% 50/93

Software iGenetics® Myriapod®

EXPLOITATION

Farmacogenetica “prêt-à-porter”, quando la medicina personalizzata diventa una realtà

MARKER NAME	rs	GENOTYPE	FARMACO	RILEVANZA CLINICA (Livello di Evidenza)	ANNOTAZIONI CLINICHE
DPYD_1905+1G>A (IVS14 + 1G>A)	rs3918290	G	Fluorouracil, Capecitabine, Pyrimidine analogues	1A Toxicity/ADR	Patients with the GG genotype (DPYD *1/*1) may have decreased, but not non-existent, risk for drug toxicity when treated with fluoropyrimidine based chemotherapy as compared to patients with the GA or AA genotype (DPYD *1/*2A or *2A/*2A). Fluoropyrimidines are often used in combination chemotherapy such as FOLFOX (fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin), FOLFIRI (fluorouracil, leucovorin and irinotecan) or FEC (fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide) or with other drugs such as bevacizumab, cetuximab, raltitrexed. The combination and delivery of the drug may influence risk for toxicity. Other genetic and clinical factors may also influence a patients response to fluoropyrimidine based chemotherapy.
DPYD_2194G>A	rs1801160	G	Fluorouracil, Capecitabine	3 Toxicity/ADR	
DPYD_1896T>C	rs17376848	T	Capecitabine, Fluorouracil, Irinotecan, Leucovorin, Oxaliplatin	3 Toxicity/ADR	
DPYD_2846A>T	rs67376798	A	Fluorouracil, Capecitabine	1A Toxicity/ADR	Patients with the AA genotype and Cancer who are treated with fluoropyrimidine-based chemotherapy 1) may have increased clearance of the drug 2) may have a decreased, but not absent, risk and reduced severity of drug toxicity as compared to patients with the AT genotype. Fluoropyrimidines are often used in combination chemotherapy such as FOLFOX (fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin), FOLFIRI (fluorouracil, leucovorin and irinotecan) or FEC (fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide) or with other drugs such as bevacizumab, cetuximab, raltitrexed. The combination and delivery of the drug may influence risk for toxicity. Other genetic and clinical factors may also influence a patients response to fluoropyrimidine-based chemotherapy.
DPYD_2846A>T	rs67376798	A	Oxaliplatin	3 Toxicity/ADR	
DPYD_496A>G	rs2297595	A	Fluorouracil, Capecitabine	2A Toxicity/ADR	Patients with the AA genotype may have 1) decreased but not absent risk of severe toxicity when treated with fluoropyrimidines and 2) increased metabolism of fluorouracil as compared to patients with the GG or AG genotype. However, contradictory or negative results exist for these associations. Other genetic and clinical factors may also influence a patients chance of adverse events.

Article | [OPEN](#)

Genetic markers for toxicity of adjuvant oxaliplatin and fluoropyrimidines in the phase III TOSCA trial in high-risk colon cancer patients

Annamaria Ruzzo , Francesco Graziano [...] Mauro Magnani*Scientific Reports* **4**, Article number: 6828 (2014)

doi:10.1038/srep06828

[Download Citation](#)[Colon cancer](#) [Predictive markers](#)

Received: 10 June 2014

Accepted: 02 October 2014

Published online: 05 November 2014

Abstract

We investigated 17 polymorphisms in 11 genes (*TS*, *MTHFR*, *ERCC1*, *XRCC1*, *XRCC3*, *XPD*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*, *ABCC1*, *ABCC2*) for their association with the toxicity of fluoropyrimidines and oxaliplatin in colorectal cancer patients enrolled in a prospective randomized trial of adjuvant chemotherapy. The TOSCA Italian adjuvant trial was conducted in high-risk stage II–III colorectal cancer patients treated with 6 or 3 months of either FOLFOX-4 or XELOX adjuvant chemotherapy. In the concomitant ancillary pharmacogenetic study, the

Obiettivo realizzativo 3a

Obiettivo

Sviluppo di un Medical Device per rilascio di corticosteroidi in circolo in pazienti BPCO (EryDel SpA)

In Particolare:

- 3.1 Tests finalizzati alla ottimizzazione di incapsulamento farmaco e parametri di funzionalità dei globuli rossi
- 3.2 Definizione dei requisiti del software (alto livello) e del Kit monouso
- 3.3 Produzione documentazione necessaria al fine di sviluppo prototipi
- 3.4 Realizzazione prototipi con metodiche di produzione standard

e) DSP encapsulated (two different dosages: 125 mg and 250 mg)

Patients	mg /bag
TER 1 (125 mg)	12.48
*TER 3 (125 mg)	ND
TER 5 (125 mg)	15.64
TER 7 (125 mg)	23.32
TER 9 (125 mg)	18.03
TER 11 (125 mg)	17.13
MEDIA	17.32±3.54

Patients	mg /bag
TER 2 (250 mg)	27.34
TER 4 (250 mg)	29.01
*TER 6 (250 mg)	ND
TER 8 (250 mg)	38.56
TER 10 (250 mg)	25.21
*TER 12 (250 mg)	13.97
MEDIA	26.82±7.88

* The TER 3, 6 patients were excluded from the results on the quantification of the DSP encapsulated and TER 12 showed an altered encapsulation because they have abnormal osmotic resistance that obstructs the loading process

Data show that the new software version 3.2.0 permits to efficiently load Dexametasone 21-P in RBCs from COPD patients. Encapsulated mg are in accordance to primary outcome of the sub-study (no patient < 5 mg).

b) Globular Osmotic Resistance

Hemolysis curves both from unprocessed and processed RBCs have been performed. In the table are reported NaCl % (values range) at which 50 % hemolysis was observed.

Patients	Unprocessed RBCs	Processed RBCs	
TER 1	0.425-0.45	0.50-0.60	
TER 2	0.425-0.45	0.50-0.55	
TER 3	0.30-0.35	0.35-0.40	
TER 4	0.425-0.45	0.55-0.60	N.V. (normal value): 0.40-0.45
TER 5	0.425-0.45	0.50-0.55	
TER 6	0.30-0.35	0.30-0.35	
TER 7	0.425-0.45	0.50-0.55	
TER 8	0.425-0.45	0.55-0.60	
TER 9	0.40-0.425	0.50-0.55	
TER 10	0.40-0.425	0.50-0.55	
TER 11	0.40-0.425	0.50-0.55	
TER 12	0.35	0.35-0.40	

Processed RBCs show a higher osmotic fragility compared with unprocessed cells. Similar results were also observed in processed cells from healthy donors

Targa Red Cell Loader con procedura CE

www.erydel.com

EryDel

EryDel SpA
Via Sasso, 36 - 61029 Urbino (PU) - ITALY
tel. +39 0722 378711 - fax +39 0722 328166

CE 0123

Cod. ET0100-01 Rev.B

RED CELL LOADER

REF	0100
P/N	0222500
S/N	

 Use only with the dedicated disposable
Verwenden Sie nur mit den verfügbaren gewidmet
Utilisez uniquement le dédié jetables
Use únicamente con la dedicada desechables
Usare solo con il disposable dedicato





 IP 21

200-240 V ~50 Hz 400 W

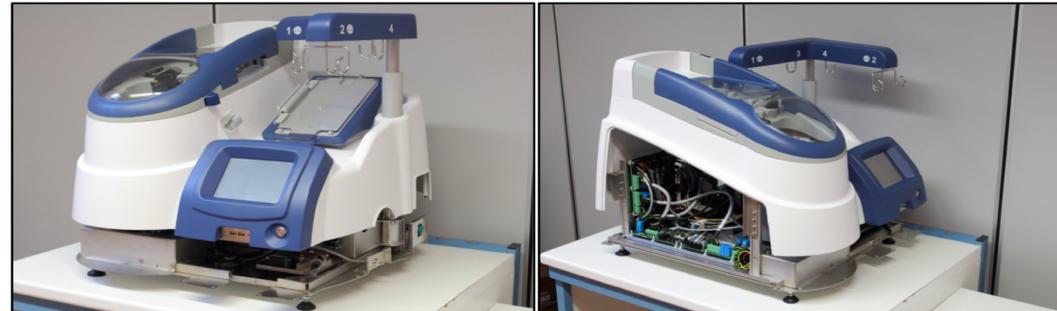
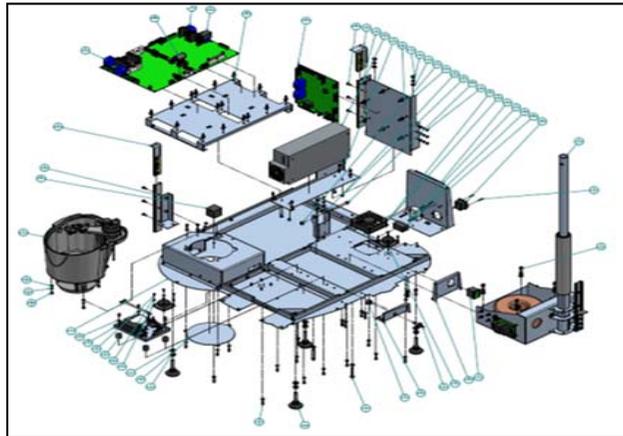
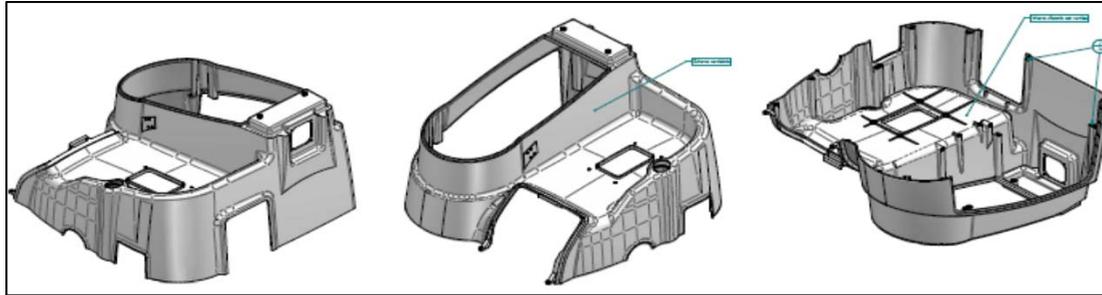
 **2 x 6,3 A T 250V 5x20 mm**

Heater: 200 W



Produced by:  LEAN s.r.l.
41036 Medolla (Mo) Italy

Realizzazione Prototipi



CONCLUSIONS

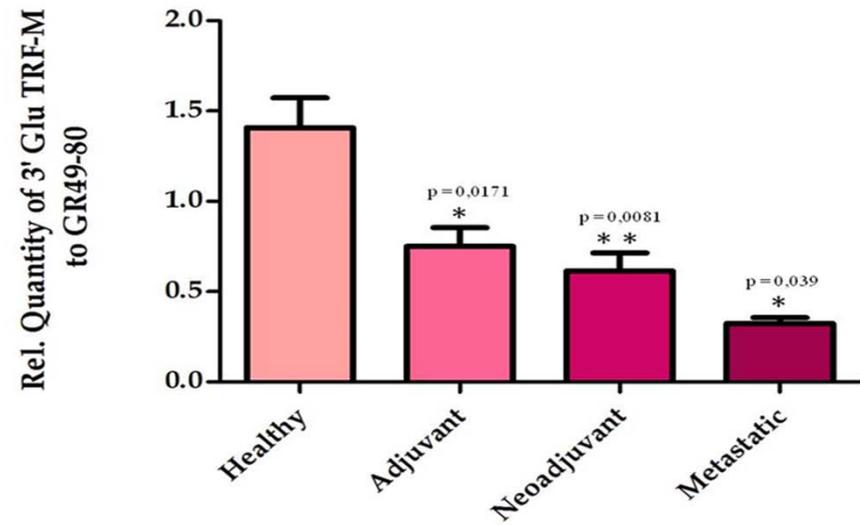
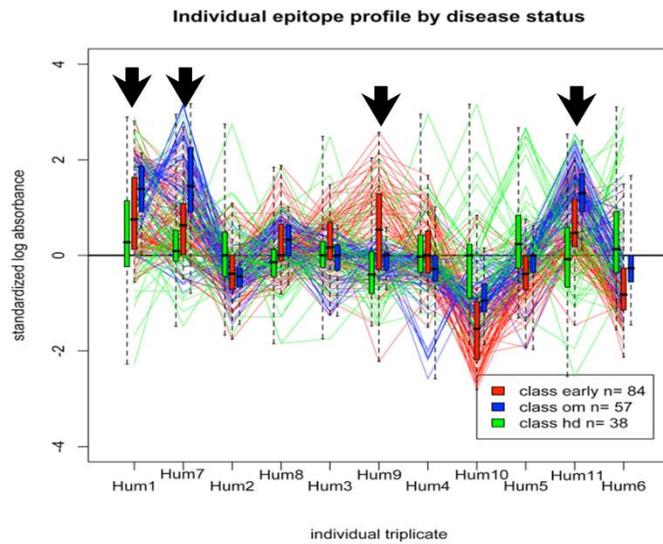
The results show that erythrocytes (12 subjects with COPD) loaded with the new 3.2.0 software, behave similarly to those of healthy control subjects. However is interesting to note that 3 of 12 patients (25%), displayed an altered osmotic globular resistance. This condition has made two of these patients (TER3 and TER6) not suitable for drug loading process and is related with the reduced encapsulation in TER12 patient. Therefore, a prior evaluation of this parameter could be crucial in order to know in advance if a patient is suitable for loading procedure.

Obiettivo realizzativo 3b

Tabella 8. Variazione in percentuale delle variabili di dispnea (%delta BORG e DELTA MRC) e della saturazione di ossigeno

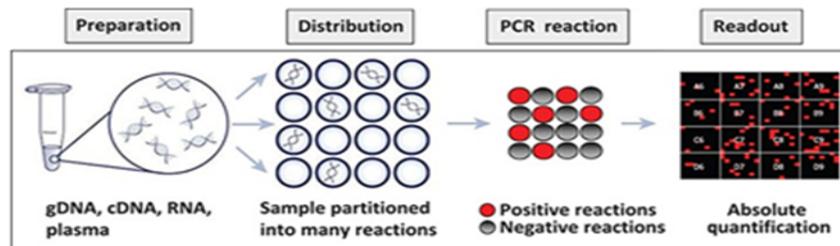
Snp	delta borg (uscita-entrata)%	delta mrc (uscita-entrata) %	delta_SAO2T1 %
Mediana			
NR3C1 rs6189			
GG	-42.9	-25.0	-0.00
GA	-35.7	-25.0	1.67
<i>P value</i>	<i>0.767</i>	<i>0.395</i>	<i>0.307</i>
NR3C1 rs6190			
GG	-42.8	-25.0	-0.00
GA	-57.1	-25.0	0.07
<i>P value</i>	<i>0.413</i>	<i>0.264</i>	<i>0.977</i>
NR3C1 rs41423247			
GG	-21.4	-12.5	-1.57
GC	-35.4	-25.0	-0.00
CC	-44.4	-25.0	-0.00
<i>P value</i>	<i>0.566</i>	<i>0.913</i>	<i>0.298</i>
GLCCII rs37972			
CC	-42.8	-25.0	-0.00
CT	-37.5	-25.0	-0.00
TT	-57.1	-25.0	-1.56
<i>P value</i>	<i>0.092</i>	<i>0.332</i>	<i>0.495</i>
MDR-1 rs2032582			
GG	-30.9	0.0	-1.03
GT	-44.4	-25.0	0.00
GA	-57.1	-25.0	0.00
TT	-28.6	-25.0	0.52
<i>P value</i>	<i>0.196</i>	<i>0.244</i>	<i>0.780</i>
FK506 rs4713916			
GG	-37.5	0.00	0.00
GA	-56.3	-25.0	-1.04
<i>P value</i>	<i>0.071</i>	<i>0.019</i>	<i>0.020</i>

Obiettivo realizzativo 4:(early detection of breast cancer)



Obiettivo realizzativo 5: (rilevazione di mRNA per patologie cardiovascolari)

DIGITAL PCR (Life t.)



Analizzati in DIGITAL PCR i livelli di miR-17 ottenuti da campioni di plasma EDTA con diversi livelli di troponina

Sample	Troponina	miR17(Copies/ μ l)	
		Qiagen	Norgen
1	3.76	64.8	97.24
2	6.33	563.84	
3	50	37.45	53.09
4	72.91	128.57	
5	584.1	50.85	74.02
6	1168	76.42	65.76

Criticità riscontrate e soluzioni adottate:

1. **Criticità:** La tecnologia originariamente proposta (HRM) si è rivelata poco fruibile per l'utente finale, necessitando di alta formazione specifica, della quale difficilmente dispongono gli operatori di settore. **Soluzione adottata:** adozione di tecnologia alternativa (real-timePCR), acquisizione di licenza per suo impiego. Svantaggio: ritardo nello sviluppo dei kit. Vantaggio: la nuova tecnologia ha permesso di risolvere problemi unici e di poter determinare polimorfismi non evidenziabili con la precedente tecnologia
2. **Criticità:** Risultati biologici inattesi e non prevedibili. **Soluzione adottata:** clusterizzazione dei pazienti responders al trattamento
3. **Criticità:** software di processo instabili. **Soluzione adottata:** acquisizione di competenze esperte dedicate e disegno di nuovo software
4. Alcuni kits sono stati realizzati a livello di prototipo ma non validati. La maggior difficoltà è l'accesso a campioni di pazienti in numero adeguato ai processi di validazione. Quando i risultati rispondono ad un medical need si prevede lo sviluppo e ulteriore validazione al di fuori del progetto qualora le risorse lo permettano.

Trasferibilità dei risultati

Le aziende coinvolte nel progetto hanno realizzato nuovi **prodotti che sono pronti per la distribuzione**. In dettaglio, Diatech Pharmacogenomics ha realizzato un sistema completamente nuovo per **evidenziare 129 differenti** polimorfismi a singolo nucleotide su **58 diversi geni con un unico sistema diagnostico**. I risultati di tali analisi permetteranno al medico di fornire un trattamento personalizzato ai pazienti oncologici con la capacità di prevedere le risposte ai farmaci più comuni utilizzati nel trattamento dei tumori solidi dell'intestino. Tale risultato si complementa con i **4 kits** realizzati da Diatheva, **pronti per la distribuzione**, che permettono di completare il quadro analitico-predittivo negli stessi pazienti. Le due aziende stanno discutendo anche di accordi di distribuzione per tali prodotti in quanto il progetto ha permesso di integrare attività e risultati creando di fatto prodotti che si complementano tra di loro. EryDel ha realizzato un nuovo dispositivo medico per il delivery di Dexametasone che è stato ottimizzato a tale scopo e validato in laboratorio in particolare per le BCPO. Il nuovo dispositivo medico, **trasferito in produzione**, non sarà immediatamente commercializzato (necessitando di studi clinici registrativi a tale scopo) ma sarà impiegato in clinica a partire dal mese di ottobre 2015. Gli studi clinici attualmente in corso da parte di EryDel realisticamente completeranno la fase 3 non prima del 2018. Da tale momento il dispositivo medico entrerà in distribuzione.

Biolab ha realizzato un kit prototipo che necessita di **ulteriori sviluppi** e validazioni per poter essere commercializzato. Nel corso del 2015 il kit è stato usato internamente nei

Ricadute industriali

In conseguenza di tali attività Diatech Pharmacogenomics ha ampliato la nuova sede in Jesi e Diatheva ha iniziato la costruzione del nuovo stabilimento a Fano con un investimento di 3,5 milioni di € in infrastruttura e strumentazioni e 1 milione per il fabbricato. La nuova struttura sarà operativa dal 2016.

Le risorse economiche previste come investimenti nel periodo di durata del contratto sono state tutte realizzate.

Diatheva aveva previsto il trasferimento di Sabrina Dominici (PhD) dall'università per la durata del progetto. **Oggi la stessa ricercatrice è assunta da Diatheva a tempo indeterminato.** Inoltre è stata assunta Veronica Ceppetelli (biotecnologa) CoCoPro, **contratto che è stato convertito in assunzione dal mese di ottobre 2015.**

EryDel e Biolab hanno stipulato i contratti previsti. EryDel ha chiuso un nuovo round di investimenti da parte della attuale compagine sociale in data 11 maggio 2015 per 29.5 M€, il 9 ottobre 2014 ha assunto Renè Goedloop come direttore medico. In pratica, tutte le ipotesi formulate inizialmente si sono avverate con la realizzazione di tutti gli investimenti previsti, la stipula dei contratti e convenzioni previste e un impatto su tutte le aziende che le ha rafforzate in ambito nazionale ed internazionale come documentato dai consistenti nuovi investimenti di cui sopra e dalla assunzione di ulteriore personale a tempo indeterminato.

2 progetti in Horizon2020 nel 2015

Grazie per la vostra attenzione

- **Considerazioni personali:**
 - Le risorse acquisite hanno permesso alle aziende proponenti di sviluppare nuovi prodotti che sono per buona parte già sul mercato
 - Le aziende coinvolte hanno condiviso esperienze e conoscenze e tratto vantaggio dalla relazione stabilita
 - Il rapporto con università e istituti di ricerca ha permesso l'accesso a campioni biologici necessari per validare i prodotti ed a competenze essenziali per interpretare le necessità mediche e la validità dei prodotti realizzati
 - Tutte le aziende coinvolte hanno fatto e continuano a fare ulteriori investimenti nei settori identificati come core business
- Giuseppe Ottaviani 100 anni, marchigiano, campione europeo master indoor 200m

