

Piano di lavoro progettuale Bando di ricerca sanitaria 2015 “programma 5 per mille anno 2013”

Alla Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori
Via Alessandro Torlonia, 15
00161 – Roma

Piano di lavoro progettuale

Il sottoscritto Marco Alloisio, in qualità di Presidente della Sezione Provinciale LILT di Milano, Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori – Sezione provinciale di Milano, Via Venezian, 1 20133 Milano, C.F. 80107930150, intende richiedere alla Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori – Sede Centrale – un finanziamento nell’ambito del “programma 5 per mille anno 2013” tramite il predisposto “piano di lavoro progettuale”.

Titolo del Progetto

Studio pilota sul ruolo delle cellule tumorali circolanti (CTC) nella diagnosi precoce del tumore polmonare

Area tematica di ricerca

Prevenzione secondaria: approcci innovativi nella diagnosi precoce dei tumori e nel miglioramento della qualità dei percorsi di diagnosi precoce

Durata: Annuale Biennale X

Costo finanziato con fondi oggetto del bando di ricerca sanitaria 2015 LILT:
€ 90.000

Costo complessivo del progetto (se co-finanziato):
€ 153.000

Responsabile del Progetto

Dr.ssa Giulia Veronesi, Divisione di Chirurgia Toracica , Istituto Clinico Humanitas, Via Manzoni 56
20089, Rozzano, Tel 0282247396-4420
giulia.veronesi@humanitas.it

Sinossi del Progetto / Premesse e razionalità

Lo screening con TC torace a basso dosaggio (TCBD) in soggetti ad alto rischio di tumore polmonare è oggi raccomandato dalla maggior parte delle società scientifiche e negli Stati Uniti è già rimborsato da assicurazioni private e federali.

In Italia e in Europa, l'attuazione dello screening è rallentata dal timore di costi eccessivi per il sistema sanitario pubblico e dalle incertezze derivate dai risultati oncologici emersi dagli studi randomizzati europei.

La possibilità di sviluppare marcatori circolanti per la diagnosi precoce delle neoplasie polmonari faciliterebbe programmi di screening su larga scala, aumenterebbe il reclutamento di individui ad alto rischio, riducendo la medicalizzazione e i costi. Tra i vari marcatori le cellule tumorali circolanti rappresentano uno strumento promettente per identificare i tumori solidi in modo non invasivo tramite biopsia liquida con implicazioni cliniche per la diagnosi, la prognosi e la terapia degli stessi.

Intendiamo sviluppare uno studio pilota per standardizzare la tecnica di isolamento e tipizzazione delle cellule tumorali circolanti (CTC), utilizzando la tecnologia ISET (Isolamento per dimensione delle cellule tumorali epiteliali), in soggetti affetti da tumore del polmone riscontrato per comparsa di sintomi o per screening e verificare la potenzialità di trasferire i risultati ottenuti in un ampio programma di screening prospettico che utilizzi sia la TC a basso dosaggio che le CTC in individui sani ad alto rischio.

Piano di lavoro progettuale (articolazione del progetto con dettaglio del ruolo della Sezione LILT capofila e delle Sezioni LILT coinvolte e tempi di realizzazione, non superiori a 24 mesi dalla data di approvazione del progetto)

INTRODUZIONE

Il tumore del polmone è la principale causa di morte per cancro e l'incidenza annuale continua ad aumentare nelle donne e nei paesi sviluppati. L'alto tasso di fatalità del tumore polmonare è legato all'aggressività biologica intrinseca di questa neoplasia che rende la diagnosi tardiva nella maggior parte dei pazienti, ma anche per la mancanza di programmi di diagnosi agli stadi iniziali. La diagnosi precoce nella popolazione ad alto rischio per tabagismo è essenziale per qualsiasi tipo di trattamento efficace. Studi osservazionali hanno provato come l'uso della TC Torace a basso dosaggio di radiazioni (TCBD) sia in grado di diagnosticare gli stadi precoci di malattia. In seguito alla pubblicazione dei risultati del National Lung Screening Trial (NLST), la maggior parte delle società scientifiche ha approvato la TCBD in un sottogruppo di popolazione a rischio (fumatori o ex fumatori di età superiore ai 50 o 55 anni).

Nel dicembre 2013 la US Preventive Services Task Force ha approvato lo screening con TCBD, le compagnie assicurative private e pubbliche (Medicare a Medicaid) hanno concordato nel 2014 di coprire i costi dello screening annuale con TCBD per la popolazione statunitense a rischio.

In associazione alla TCBD la diagnosi degli stadi precoci di tumore polmonare potrebbe giovare di marcatori molecolari diagnostici, in particolar modo quelli presenti nel siero e/o nel plasma dei pazienti. La disponibilità di un test ematico per la diagnosi dei tumori polmonari agli stadi iniziali permetterebbe un programma di screening a larga scala con un netto incremento del reclutamento di pazienti, conseguente riduzione dell'ospedalizzazione e delle procedure diagnostiche invasive (con una conseguente riduzione dei tassi di complicanze) e successiva riduzione dei costi.

Le Cellule Tumorali Circolanti (CTC) sono espressione di disseminazione ematogena di neoplasia. L'analisi e la caratterizzazione citologica e molecolare di queste cellule potrebbe rappresentare una tipologia di "biopsia liquida" del tumore.

La possibilità di identificare le CTC nel sangue mediante un esame capace di "filtrare" le cellule

tumorali grazie alle loro caratteristiche fisiche (Rarecells Diagnostic, Paris, France), potrebbe aumentare la sensibilità del test con la possibilità di applicazione nel campo della diagnosi precoce. L'identificazione delle CTC potrebbe inoltre aprire le porte delle NGS (Next-generation sequencing) del DNA e dell'RNA isolato dalle CTC con relative implicazioni diagnostiche e terapeutiche.

In uno studio recentemente pubblicato da Hofman P. et al (Plosone 2014) eseguito su soggetti asintomatici, ma ad alto rischio di tumore polmonare è stata valutata la presenza di CTC mediante ISET su un campione di 245 soggetti negativi per neoplasia. Lo studio includeva 168 (68.6%) pazienti affetti da BPCO (Bronco-pneumopatia cronica ostruttiva) e 77 soggetti non-BPCO (31.4%), di cui 32 fumatori e 35 non fumatori. I pazienti sono stati monitorati annualmente mediante TCBD. Le CTC sono state identificate nel 3% del campione BPCO (5/168). Il controllo annuale dei pazienti positivi per CTC mediante TCBD ha identificato la comparsa di un nodulo polmonare a distanza di un periodo compreso tra 1 fino a 4 anni dopo l'identificazione delle CTC a cui è seguito successivamente un trattamento chirurgico di resezione e analisi istopatologia del tumore.

Le cellule epiteliali con caratteristiche citomorfologiche benigne sono state inoltre identificate mediante ISET nell'1.8% dei pazienti COPD (3/168). Nessuno di questi 3 pazienti e nessuno degli altri 160 pazienti con COPD hanno sviluppato un nodulo polmonare, come dimostrato dalla TCBD annuale di FUP. Nei pazienti non-BPCO sia fumatori (42) che nei non fumatori (35) non sono state identificate CTC. I controlli TCBD a 5 anni non hanno dimostrato infatti la comparsa di noduli polmonari. La CTC identificate nei pazienti COPD presentavano un'espressione eterogenea di marcatori epiteliali e mesenchimali simili al fenotipo cellulare delle cellule polmonari neoplastiche.

La stadiazione TNM è ad oggi l'unico fattore prognostico validato nel tumore polmonare. Più del 25% dei pazienti con tumore polmonare allo stadio precoce mostrano una recidiva neoplastica dopo resezione radicale della neoplasia. Pochi dati sono disponibile sul ruolo prognostico delle CTC nei tumori polmonari. Hofman e al. hanno dimostrato che un'alta percentuale di pazienti affetti da neoplasia polmonare presenta un'elevata percentuale di CTC al momento della diagnosi. La presenza di 50 CTC per campione analizzato correla con una prognosi peggiore nei pazienti con tumore polmonare allo stadio iniziale sottoposto a trattamento chirurgico con intento radicale. Altri studi hanno dimostrato che l'identificazione di CTC può essere utile come marcatore di rischio di recidiva neoplastica agli stadi precoci o marcatore di efficacia della chemioterapia negli stadi avanzati. Può inoltre rappresentare una fonte di DNA per analisi mutazionale e quindi per l'identificazione di target per la terapia biologica.

Il nostro obiettivo è quello di sviluppare uno studio pilota atto a standardizzare la tecnica ISET per l'identificazione delle CTC in pazienti affetti da tumore del polmone e per valutare il ruolo potenziale del test in un piccolo gruppo di pazienti al fine di trasferire i risultati successivamente in un ampio studio prospettico di screening con TCBD e isolamento delle CTC.

OBIETTIVI

Obiettivi primari

1. Standardizzazione della tecnica ISET per l'isolamento delle CTC e identificazione delle stesse nei pazienti affetti da tumore polmonare;
2. Esplorare il tasso di isolamento delle CTC nei pazienti affetti da tumore del polmone ai differenti stadi di malattia per definire il ruolo potenziale del test nei programmi di diagnosi degli stadi iniziali degli individui asintomatici ad alto rischio.

Obiettivi secondari

1. Valutare la presenza di CTC nelle fasi avanzate di malattia come gruppo di controllo e nei soggetti sani;
2. Valutare la correlazione tra CTC e stadio patologico della malattia;
3. Valutare il valore prognostico del numero di CTC alla diagnosi (misurato in termini di

"sopravvivenza libera da progressione" e "la sopravvivenza globale");

4. Caratterizzare molecolare delle CTC (mutazioni EGFR e riarrangiamento ALK);
5. Valutare il valore predittivo di risposta al trattamento sulla base della eventuale riduzione del numero di CTC;
6. Identificare le variazioni di fenotipo e genotipo tra CTC e tumore primario;
7. Identificare alterazioni genetiche, che possano essere associate a specifici tipi di tumore, con i conseguenti vantaggi diagnostici e terapeutici.
8. Valutare la possibilità di avviare colture cellulare da CTCs

METODO

Lo studio arruolerà in modo consecutivo e prospettico pazienti ricoverati presso la Divisione di Chirurgia Toracica di Humanitas e dei centri partecipanti, affetti da tumore polmonare.

Durante la prima fase dello studio saranno inclusi soggetti con tumore polmonare riscontrato al di fuori di programmi di screening sia in stadio iniziale per i quali il prelievo sarà eseguito prima del trattamento chirurgico, sia in fase avanzata per i quali il prelievo sarà eseguito prima del trattamento sistemico. Saranno arruolati 30 pazienti con tumore sintomatico e 10 controlli sani. Successivamente verranno inclusi in studio soggetti con tumore riscontrato grazie allo screening (20 soggetti). Il prelievo verrà eseguito prima del trattamento, a 1 mese e a 6 mesi dalla fine del trattamento sia esso chemioterapia o chirurgia.

Le analisi delle CTCs sarà eseguita presso il laboratorio di Medicina Molecolare di Humanitas in collaborazione con il laboratorio di Biologia Cellulare e Molecolare dell'Università di Paris Descartes equipaggiati con le tecnologie più avanzate

Le analisi saranno eseguite secondo le seguenti procedure:

Isolamento delle CTC. 10 mL di sangue periferico verrà collezionato in una provetta di EDTA, mantenuto a temperatura ambiente e processato. L'isolamento per Dimensione delle Cellule Epiteliali Tumorali (ISET) (Rarecells Diagnostics, Paris, France) sarà eseguito tramite metodo ISET (Figure 1), un Sistema di filtro del sangue, che arricchisce una membrana di policarbonato in cellule di dimensioni maggiore di 8 microns. La membrana viene tagliata in due parti contenenti 6 piastre per immunocitochimica e 4 per colorazione di May Grünwald Giemsa (MGG), per l'analisi citologica e la diagnosi delle Cellule tumorali circolanti (10).

L'immunocitochimica sarà eseguita usando un doppia immunomarcatura con pannello di anticorpi anticitocheratine (mouse, clone KL-1; Immunotech-Beckman-Coulter, Villepinte, France), e un anticorpo antivimentina (mouse, clone V9; Glostrup, Denmark) applicati al filtro per 45 minuti a temperatura ambiente (14). I pazienti saranno considerati positive per le CTCs in base alla analisi citopatologica delle cellule isolate con caratteristiche di malignità secondo criteri predeterminati

Conta e caratterizzazione fenotipica delle CTCs. The CTCs saranno contate e caratterizzate usando il Sistema ISET. I livelli di EGFR saranno valutati tramite immunocitochimica. Le alterazioni genetiche delle CTCs saranno scrinate mediante:

1. valutazione whole-genome delle aneuploidie (by whole-genome next-generation sequencing e/o FISH)
2. valutazione della presenza di mutazioni potenzialmente target per terapie molecolari attraverso il pannello COSMIC di 1800 mutazioni (Thermofisher).
3. valutazione della possibilità di avviare colture cellulari isolate dalle CTCs. In questo modo sarà possibile aumentare il numero di cellule per le analisi genetiche. Per escludere la possibilità che il sistema di coltura in vitro alteri il loro stato genetico, ogni anomalia genetica osservata nelle colture primarie derivate dalle CTC sarà validata sulle CTCs isolate dal paziente.

Fasi del progetto e durata

Il progetto durerà 24 mesi. Durante il primo mese saranno messe a punto le metodiche di isolamento e studio delle CTC, l'analisi fenotipica e lo screening genotipico.

Dal secondo al dodicesimo mese, verranno arruolati e testati prospetticamente i pazienti con tumore polmonare. Dal dodicesimo al diciottesimo mese verranno arruolati soggetti con tumore riscontrato da test di screening e testato il sangue periferico degli stessi. I prelievi post trattamento verranno eseguiti a 1 e 6 mesi dalla data della registrazione.

Durante i tre mesi finali procederemo con la valutazione e interpretazione dei risultati e alla stesura del report scientifico e del paper.

Ruolo delle sezioni Lilt

La sezione LILT coordinatrice del progetto tramite la Divisione affiliata di Chirurgia Toracica di Humanitas, Rozzano, eseguirà la selezione dei soggetti eleggibili candidati al trattamento per neoplasia polmonare, si farà carico del prelievo del sangue e del tessuto dai pazienti, eseguirà tramite i laboratori di Humanitas e il laboratorio partner di Parigi le analisi cellulari e molecolari, eseguirà l'analisi dei dati e la stesura del draft del paper.

Le sezioni LILT partecipanti provvederanno a fornire campioni biologici per le analisi cellulari e molecolari di pazienti trattati nelle rispettive Divisioni di Chirurgia Toracica, inoltre favoriranno tramite i centri antifumo, la selezione e l'arruolamento di soggetti candidati a screening del tumore polmonare con TC a basso dosaggio, per la validazione in pazienti con tumore riscontrato per screening. Saranno infine coinvolti nella elaborazione scientifica dei risultati e pubblicazione degli stessi.

Risultati attesi dalla ricerca, con specifica evidenza agli approcci con elevato livello di trasferibilità sociale, in particolare all'interno del SSN

Ci aspettiamo di poter confermare il ruolo potenziale delle CTCs nella diagnosi precoce del tumore polmonare e di migliorare le conoscenze sui meccanismi di rilascio delle cellule dal tumore polmonare nella fase precoce della cancerogenesi. Ci aspettiamo di poter utilizzare le CTC per selezionare la popolazione target per lo screening con TC a basso dosaggio (utilizzo delle CTC come screening di prima linea), e/o di utilizzare le CTC in parallelo alla TC di screening per aumentare la sensibilità e la specificità della TC.

Come risultati aggiuntivi ci aspettiamo di identificare sottogruppi di pazienti a prognosi negativa in base al numero delle CTC ed ottenere pertanto una migliore stratificazione prognostica dei pazienti con neoplasia polmonare

In caso di conferma del ruolo predittivo delle CTC alla risposta ai trattamenti oncologici, l'identificazione di alterazione genetiche specifiche correlate alla risposta avrà conseguenze terapeutiche positive.

Inoltre l'identificazione di singoli o multipli cloni di CTC in confronto a quelli costitutivi del tumore primitivo sarà utile nella comprensione del processo di diffusione ematica dei tumori

Trasferibilità sociale e a livello del sistema sanitario nazionale

Lo studio proposto ha un forte impatto sociale potenziale e di trasferibilità nella pratica clinica. Infatti, la determinazione quantitativa di CTC e la loro tipizzazione in fase precoce di malattia oncologica polmonare potrebbe facilitare l'applicazione a livello nazionale dei programmi di screening, con riduzione dei costi, riduzione della esposizione alle radiazioni e più facile partecipazione di soggetti a rischio.

Essa consentirà ai medici di eseguire una biopsia liquida con l'analisi delle caratteristiche genetiche senza biopsie invasive dei tessuti. Il processo di screening ideale dovrebbe essere in grado di

effettuare la diagnosi di patologia maligna in modo non invasivo con marker circolanti (CTC se convalidato), confermare il nodulo polmonare con un TC a bassa dose senza contrasto, ed infine consentire un trattamento non invasivo del tumore iniziale. Questo processo aumenterebbe la curabilità del tumore del polmone, privilegiando la qualità della vita e la soddisfazione del paziente mantenendo un'adeguata radicalità oncologica.

Risultati attesi dalla ricerca, con specifica evidenza riguardo lo sviluppo di reti collaborative fra le Sezioni LILT e qualificate strutture operanti in ambito sanitario e di ricerca

Questo studio potrebbe costituire la base per la diffusione tra le sedi LILT della cultura della prevenzione secondaria del tumore polmonare per sviluppare progetti di screening condivisi che prevedano una stretta alleanza con i centri antifumo distribuiti sul territorio. La sinergia tra prevenzione primaria e secondaria del tumore polmonare rappresenta la strada maestra per ridurre la mortalità per il tumore polmonare.

Lo scopo finale è l'avvio di un ampio programma di prevenzione delle patologie fumo correlate comprensivo di aggressiva attività antifumo, diagnosi precoce del tumore polmonare, riduzione dei fattori di rischio cardiovascolari e diagnosi e trattamento precoce delle patologie polmonari benigne come enfisema e interstiziopatie con l'ausilio di marcatori circolanti.

Sezioni LILT

LILT Sezione di Milano
LILT Sezione di Brescia
LILT Sezione di Bergamo

Altre Strutture

Laboratory of Cellular and Molecular Biology
University Paris Descartes.

Enti coinvolti nel progetto

Istituto Clinico Humanitas, Rozzano

Dr.ssa Giulia Veronesi, Divisione di Chirurgia Toracica
Stefano Duga, Professore di Biologia Molecolare, Dipartimento di Scienze Biomediche
Giovanna Finocchiaro, Oncologia toracica
Massimo Roncalli, Anatomia Patologica

Università Paris Descartes, Parigi, Francia.

Patrizia Paterlini, Professore di Biologia Cellulare e Molecolare

Sezioni LILT

Dr. Marco Alloisio, Presidente della Sezione LILT di Milano e Coordinatore dell'Unione Regionale della Lombardia
Prof. Lorenzo Magno, Presidente della Sezione LILT di Brescia
Dr. Beppe Chiesa, Presidente della Sezione LILT di Bergamo

Estremi per ricevere il finanziamento

Banca Popolare Commercio & Industria
Agenzia di Milano-Lombardia
Viale Lombardia 14/16 - Milano
IBAN: IT 33 B 050 480 1629 0000000 18213
Intestato a Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori Sezione di Milano

Costo complessivo del Progetto articolato per voci di spesa

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	50.000	50.000
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	9.200	9.200
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)	81.000	18.000
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	10.000	10.000
Elaborazione dati	2.800	2.800
Spese amministrative	//	//
Altro (indicare quali)	//	//
TOTALE	153.000	90.000

Alla presente proposta deve essere allegato:

- il curriculum vitae del Responsabile del progetto di ricerca e dei Responsabili di eventuali enti partecipanti al medesimo;
- la complessiva documentazione di progetto.

In fede,

Il Presidente della Sezione Provinciale

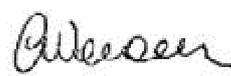
Il Responsabile del Progetto

Firma



prof. Marco Alloisio

Firma



dr.ssa Giulia Veronesi

Milano 27.11.2015