



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca Scientifica e Tecnologica

Rendiconto di assegnazione risorse 5 per mille ANNO 2019 Contributo percepito € 1.675.286,26

Enti della Ricerca Sanitaria

ENTE*: IRCCS ISTITUTO CLINICO HUMANITAS - HUMANITAS MIRASOLE SPA

Num. Prog.	Titolo del progetto	Fondi 5 per mille assegnati al progetto	Costo complessivo del progetto	Data indicativa di inizio progetto	Durata prevista
1	Identificazione di alterazioni molecolari iniziali del carcinoma dell'ovaio per la diagnosi precoce e lo sviluppo di biomarcatori e nuovi bersagli molecolari per terapie più selettive e personalizzate	1.310.203,60	1.310.203,60	01/05/2021	36 mesi
2	Caratterizzazione molecolare, immunologica e farmacologica del mesotelioma pleurico per identificare nuovi approcci terapeutici	365.082,67	365.082,67	01/03/2021	36 mesi
		1.675.286,26			

Data 31/07/2021

Il Legale Rappresentante

DR. LUCIANO RAVERA

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

Il Legale Rappresentante

DR. LUCIANO RAVERA

*Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Rendiconto 5 per mille ANNO 2019
Contributo percepito € 1.675.286,26 In data 02/10/2020

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente: amministratore.delegato@humanitas.it
HUMANITASMIRASOLE@LEGALMAIL.IT
Dati del rappresentante legale: Luciano Ravera

Titolo del progetto: Identificazione di alterazioni molecolari iniziali del carcinoma dell’ovaio per la diagnosi precoce e lo sviluppo di biomarcatori e nuovi bersagli molecolari per terapie più selettive e personalizzate

Data di inizio progetto: 01/05/2021	Data di fine progetto: 30/04/2024
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: € 1.310.203,60	Di cui: Quota sostenuta entro l’anno di rendicontazione: € 0,00 Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni): € 1.310.203,60

VOCI DI SPESA	Quota sostenuta entro l’anno di rendicontazione	Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni)
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)		408,918.18

Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)		742,176.00
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)		
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)		
Elaborazione dati		40.000,00
Spese amministrative		119,109.42
Altro (indicare quali)		
TOTALE	0,00	1.310.203,60

Data, 30/07/2021

Il Responsabile del Progetto
Prof. Maurizio D'incalci

Il Legale Rappresentante

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

Il Legale Rappresentante



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Rendiconto 5 per mille ANNO 2019
Contributo percepito € 1.675.286,26 In data 02/10/2020

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente: amministratore.delegato@humanitas.it
HUMANITASMIRASOLE@LEGALMAIL.IT
Dati del rappresentante legale: Luciano Ravera

Titolo del progetto: Identificazione di alterazioni molecolari iniziali del carcinoma dell’ovaio per la diagnosi precoce e lo sviluppo di biomarcatori e nuovi bersagli molecolari per terapie più selettive e personalizzate

Relazione illustrativa

A causa della mancanza di una sintomatologia specifica e della scarsa specificità e sensibilità degli attuali strumenti diagnostici, il carcinoma dell’ovaio viene generalmente diagnosticato in fase avanzata quando la malattia si è già estesa oltre le gonadi interessando molteplici aree del peritoneo (stadio III) o addirittura in aree extra peritoneali (stadio IV). In queste condizioni l’approccio terapeutico, basato principalmente sulla chirurgia accoppiata alla chemioterapia non risulta curativo e oltre l’80% delle pazienti recidiva con una patologia progressivamente resistente ad ogni tipo di terapia. Contrariamente, in quei rari casi in cui la patologia è diagnosticata confinata alle sole ovaie (stadio I), l’approccio terapeutico, anche solo chirurgico, risulta essere curativo nell’80% dei casi. Per avere un impatto significativo sulla sopravvivenza bisogna sviluppare delle nuove tecnologie per attuare una diagnosi precoce e una anticipazione della diagnosi e capire come colpire selettivamente la malattia nelle sue forme iniziali. Pertanto il nostro progetto si propone di: 1) sviluppare nuove metodologie basate sulla tecnologia Next Generation Sequencing (NGS) per intercettare le prime lesioni molecolari del carcinoma dell’ovaio presenti nel DNA di prelievi endocervicali (pap test) che caratterizzano il processo di trasformazione neoplastica (progetto A). 2) Migliorare le conoscenze sulle alterazioni molecolari delle fasi precoci del tumore ovarico al I stadio identificando per ogni istotipo biomarcatori prognostici e target molecolari per nuove terapie (progetto B).

Sia il progetto A che il progetto B si basano sui risultati ottenuti precedentemente dal proponente e sono il frutto di una collaborazione multidisciplinare con diversi centri clinici e di ricerca sia nazionali che internazionali.

Background

Il tumore epiteliale maligno dell'ovaio è una malattia estremamente complessa ed eterogenea caratterizzata ancora oggi da una elevata mortalità. Da anni questa patologia porta il soprannome di "silent killer" in quanto cresce e si sviluppa in modo silenzioso senza una sintomatologia precisa. Nella maggior parte dei casi la diagnosi è tardiva, quando ormai la malattia si presenta con molteplici metastasi diffuse nella cavità peritoneale (stadio III) e in altre sedi extra peritoneali (stadio IV). Ancora oggi, nonostante siano stati fatti studi internazionali su un'ampia popolazione di donne, gli attuali strumenti diagnostici quali l'ecografia transvaginale accoppiata alla misura del CA-125, un biomarcatore sierico, non sono in grado di intercettare in tempo quelle donne sane ad alto rischio di sviluppare la patologia oppure quelle donne in cui la malattia è ancora nelle fasi iniziali di sviluppo, cioè con il tumore confinato alle sole ovaie (stadio I). Contrariamente a quanto avviene per le pazienti con diagnosi allo stadio III e IV, la diagnosi di tumore ovarico allo stadio I ha una prognosi molto favorevole, e questo conferma l'importanza di arrivare quanto prima ad avere degli strumenti diagnostici in grado di intercettare le fasi iniziali dello sviluppo della patologia. Purtroppo, per i motivi che dicevamo prima, le diagnosi di stadio I sono molto poco frequenti nella popolazione.

Quanto più la malattia è in fase avanzata con metastasi diffuse, tanto più risulta difficile attuare delle terapie efficaci.

Nella malattia sistemica, con metastasi multiple disseminate nella cavità peritoneale la chirurgia da sola non è in grado di eradicare tutte le metastasi presenti. Per questo il protocollo terapeutico prevede oltre alla chirurgia una terapia farmacologica (sia di tipo adiuvante che neo-adiuvante). La terapia medica basata principalmente sulla combinazione di Carboplatino e Paclitaxel produce una remissione temporanea in una larga frazione di casi, ma nella quasi totalità delle pazienti la presenza di cloni resistenti determina una recidiva della malattia. È esperienza clinica che circa l'80% delle donne con tumore allo stadio III-IV, rispondano in maniera soddisfacente alla prima linea terapeutica, ma inevitabilmente sviluppano recidive che diventano progressivamente resistenti ad ogni terapia farmacologica. Quando la malattia è diagnosticata allo stadio I, la prognosi è decisamente migliore in quanto solo il 20% delle pazienti sviluppa una recidiva platino resistente nell'arco degli anni.

Oggi non siamo in grado di prevedere quali pazienti siano già resistenti alla terapia farmacologica (i.e., resistenza primaria) e quali svilupperanno solo in seguito dei meccanismi di resistenza al platino (i.e., resistenza secondaria). L'unico parametro che viene preso in considerazione per pianificare la terapia di seconda linea è il tempo che intercorre tra la fine della prima linea e la comparsa della recidiva. Se la recidiva avviene dopo un anno dalla fine della chemio allora le pazienti sono ancora sensibili al platino e possono essere ritratte con questo farmaco. Se invece recidivano entro un anno allora devono essere trattate con altri farmaci perché sono resistenti o solo parzialmente sensibili al platino stesso. La scelta di come trattare la seconda linea è largamente empirica e non abbiamo oggi marcatori molecolari in grado di stratificare il rischio delle pazienti di avere una seconda recidiva.

Nonostante la grande quantità di studi fatti sui meccanismi molecolari che guidano la crescita e la progressione tumorale, sono poche le informazioni che possono oggi essere sfruttate dal punto di vista terapeutico. Molti tumori dell'ovaio hanno difetti dei meccanismi di riparazione del DNA e questo spiega la loro sensibilità al Carboplatino, che agisce causando danni al DNA. In molti casi i carcinomi dell'ovaio presentano dei difetti nei meccanismi di Homologous Recombination (HR). La deficienza di HR (HRD) è spesso dovuta a mutazioni dei geni BRCA1 o BRCA2 o da altri geni coinvolti nello stesso pathway. L'evidenza che sostanze che inibiscono gli enzimi PARP sono particolarmente citotossiche contro cellule tumorali HRD ha permesso di sviluppare degli inibitori che sono oggi utilizzati in clinica in pazienti con carcinoma ovarico nella terapia di mantenimento dopo risposta alla prima terapia basata sull'impiego di regimi contenenti composti di coordinazione del Platino.

Al di là della deficienza di alcuni meccanismi di riparazione del DNA non sono state identificate fino ad oggi delle alterazioni molecolari "drivers" della malattia con l'unica eccezione della mutazione di TP53 che almeno per il carcinoma ovarico sieroso ad alto grado costituisce un evento precoce.

Certamente negli ultimi anni sono emerse molte conoscenze sulla biologia dei tumori ovarici che anche attraverso lo sfruttamento di nuove tecnologie potrebbe costituire la base per una rivisitazione complessiva della diagnosi e terapia di queste malattie.

Il programma di ricerca che qui viene proposto si pone l'obiettivo di sviluppare dei nuovi metodi per la diagnosi precoce del carcinoma dell'ovaio, e biomarcatori per attuare una diagnosi e terapia

più mirata e personalizzata che si basa sulla identificazione e caratterizzazione di biomarcatori specifici.

Possiamo schematizzare il progetto in due sotto-progetti:

A) Progetto A: diagnosi precoce mediante l'analisi del DNA nel PAP test:

B) Progetto B: Identificazione di alterazioni precoci dei carcinomi dell'ovaio, che potrebbero essere dei biomarcatori diagnostici e dei target farmacologici.

In particolare il progetto A mira a sviluppare un saggio NGS che analizzi la sequenza del gene TP53 nel DNA estratto dal Pap-test di donne che sono normalmente sottoposte a normale screening per tumore della cervice uterina. Vista la continuità anatomica tra le tube di Fallopio e l'utero, è stato possibile in un piccolo studio retrospettivo identificare in donne apparentemente sane la mutazione eziopatogenica nel gene TP53 fino a 6 anni prima dell'insorgenza del carcinoma ovarico. Questo progetto mira a: i) estendere e confermare queste osservazioni su una coorte più ampia di casi; ii) sviluppare un saggio NGS ad hoc; iii) valutare prospetticamente in donne con sindrome eredo-famigliare con mutazione germinale nei geni BRCA1 e 2, mutazioni patogenetiche nel gene TP53 (nel DNA estratto dal PAP test) indicative dell'insorgenza di carcinoma ovarico.

Il progetto B, invece mira a validare ed ampliare il valore prognostico di un classificatore molecolare precedentemente identificato sui campioni bioptici di carcinoma ovarico allo stadio I congelati anche su campioni conservati in paraffina, che sono il sistema di elezione per la conservazione dei campioni in ogni anatomia patologica. L'integrazione delle informazioni sul profilo genomico, epigenetico e trascrittomico oltre ad avere un significato prognostico rilevante (per identificare i casi di carcinoma ovarico al I stadio che richiedono oltre alla chirurgia una chemioterapia aggiuntiva) permetteranno di identificare nuovi biomarcatori e bersagli molecolari ("driver") per delle terapie selettive e personalizzate, che potrebbero avere efficacia anche in casi più avanzati.

Approccio e Metodologia

Dal punto di vista metodologico, sia il progetto A che il progetto B si basano sull'utilizzo di tecniche di sequenziamento massivo del DNA (i.e., NGS), che grazie alla loro estrema sensibilità permettono di identificare le alterazioni molecolari primitive che stanno alla base del processo che sostiene la crescita e la progressione tumorale. I due progetti sono il frutto di una collaborazione decennale con alcuni gruppi bio-informatici per l'analisi e l'integrazione dei dati e sulla collaborazione di diversi centri clinici che garantiscono la raccolta multicentrica dei campioni biologici e dei dati clinici associati. Entrambi i progetti si basano su una serie di dati sperimentali raccolti dal proponente e già pubblicati sulle principali riviste internazionali.

L'approccio dei due progetti è tuttavia diverso. Il progetto A si focalizza principalmente sull'identificazione delle prime lesioni patologiche nel gene Tp53 nei pap test di donne sane. Obiettivo dello studio è sviluppare un assay molecolare in grado di identificare i primi eventi patologici in grado di sostenere la trasformazione neoplastica.

Il progetto B, si focalizza invece sulla caratterizzazione della biologia dei tumori allo stadio I al fine di identificare dei nuovi classificatori molecolari che possano aiutare il medico a definire la prognosi di una paziente con stadio I (in modo da limitare la chemioterapia post-chirurgica ai casi con alto rischio di recidiva) e di identificare dei nuovi biomarcatori e bersagli molecolari per terapie selettive e personalizzate.

Discutendo più nel dettaglio l'approccio e la metodologia, il progetto A si basa su due osservazioni principali, una molecolare e l'altra anatomopatologica. I dati molecolari hanno dimostrato che l'istotipo più frequente del carcinoma ovarico, cioè il sieroso ad alto grado (HGSEOC) presenta un panorama mutazionale riproducibile, con un ampio spettro di alterazioni del numero di copie di cromosomi e solo un piccolo numero di geni frequentemente mutati. Tra questi il gene TP53 risulta la caratteristica principale dell'istotipo HGSOC in quanto mutato in oltre il 95% dei casi. La natura clonale delle mutazioni somatiche in TP53 riflette la natura precoce di questa mutazione durante il processo di tumorigenesi. Dal punto di vista anatomopatologico, la maggior parte dell'HGSOC originano nella tuba di Fallopio; la continuità anatomica del lume tubarico, con la cavità endometriale e il canale cervicale rendono il campionamento citologico della cervice ipoteticamente la migliore fonte per catturare le cellule neoplastiche annesse. Questa ipotesi è stata esplorata e confermata in uno studio pubblicato recentemente dal proponente (1); su una piccola casistica di cui erano disponibili i pap test in momenti diversi della storia clinica delle pazienti (fino a 6 anni prima della diagnosi di tumore), sono state identificate le stesse mutazioni

patogeniche nel gene Tp53 che contraddistinguevano il tumore primario della paziente. Questi risultati pongono le basi per uno studio più ampio che mira a sviluppare un saggio molecolare per ricercare nel DNA estratto dal PAP test le mutazioni patogeniche nel gene TP53 che sono alla base del processo di trasformazione neoplastica. In particolare il progetto si articola nelle seguenti fasi:

- a) validazione in una coorte più ampia per intercettare le mutazioni patogeniche in TP53 e stabilire la finestra temporale massima in cui queste osservazioni sono riproducibili.
- b) Sviluppare un saggio NGS in grado di avere la sensibilità e specificità necessarie per identificare in donne sane le mutazioni TP53 nel DNA purificato da PAP test. Lo sviluppo di questo saggio richiede anche lo sviluppo di una pipeline bioinformatica che garantisca la chiamata corretta delle varianti patogeniche identificate dal saggio.
- c) Valutare prospettivamente le performance del saggio NGS su una coorte di donne sane a rischio di sviluppare un tumore, come ad esempio le donne con sindrome ereditaria familiare per mutazioni nei geni BRCA1 e 2.

L'approccio e la metodologia del progetto B sono invece completamente diversi in quanto si basano sulla analisi multi-omica delle caratteristiche molecolari dei tumori con diagnosi di stadio I. Lo stadio I è una patologia rara e per questa ragione nel corso degli anni abbiamo archiviato una grande quantità di casi che ci consente di avere coorti rappresentative di pazienti per condurre studi traslazionali che non sono mai stati fatti fino ad oggi. Dati precedentemente raccolti dal proponente hanno dimostrato su una coorte retrospettiva di oltre 250 biopsie congelate di casi di tumore allo stadio I con 10 anni di follow up, che è possibile identificare sul tumore primario alla diagnosi una "firma trascrizionale" in grado di stratificare meglio dei classici parametri istologici il rischio per le pazienti di sviluppare una recidiva (2,3,4,5). In particolare si è evidenziato il valore prognostico della firma molecolare che consentirebbe di definire in pazienti ad alto rischio di recidiva che richiedono una terapia farmacologica dopo la chirurgia. L'idea del progetto è quella di estendere e validare le osservazioni su una coorte più ampia di pazienti per sviluppare un test che possa essere di aiuto per delle scelte terapeutiche razionali. Vista la complessità del progetto e la relativa rarità dei carcinomi ovarici al I stadio è essenziale per questo progetto la collaborazione con altri centri clinici. Inoltre è essenziale un forte apporto bioinformatico per integrare i dati trascrizionali con quelli genomici.

In particolare, declinando le varie tecniche di NGS su DNA e RNA estratto dalle biopsie primarie dei tumori allo stadio I, il progetto si propone di:

- a) Convalidare il valore prognostico della firma trascrittomico in un'ampia coorte multicentrica di campioni FFPE che, a differenza dei tessuti congelati, è comunemente disponibile in ogni Unità di Patologia di ogni ospedale.
- b) Identificare le principali alterazioni cromosomiche che caratterizzano il genoma dei diversi istotipi dello stadio I e definire quanto queste possano influenzare il valore prognostico dell'ISC. Questo tipo di studio verrà fatto utilizzando la tecnologia shallow whole genome sequencing (sWGS) che nonostante la bassa densità di lettura (0,5X) permette di identificare le principali alterazioni strutturali (SCNA) ricorrenti per ogni istotipo.
- c) Implementare ed integrare le conoscenze disponibili di genomica, trascrittomico e di epigenetica (miRNoma) anche in relazione ai diversi istotipi attraverso la validazione dei dati su una coorte di casi indipendente.

Impatto sul SSN

La realizzazione del progetto oltre ad aumentare le conoscenze sulla biologia dei tumori ovarici avrà un potenziale impatto nella pratica clinica.

Se il progetto avrà successo si tradurrà in un miglioramento significativo della sopravvivenza attraverso un'anticipazione diagnostica che consentirà anche la guarigione di un maggior numero di casi di carcinomi ovarici. Inoltre se la stratificazione proposta sulla base molecolare sarà validata sarà possibile evitare terapie tossiche e costose a una frazione di pazienti che non ne hanno un beneficio anche con un vantaggio economico per il Servizio Sanitario Nazionale.

Questo progetto ha degli obiettivi molto innovativi che potranno essere facilmente trasferibili nella pratica clinica. Fino ad oggi si è ritenuto impossibile attuare una diagnosi precoce del carcinoma dell'ovaio con i biomarcatori classici. Lo sviluppo di nuove tecnologie con l'ausilio di nuovi strumenti bioinformatici sta modificando lo scenario consentendoci di determinare alcune alterazioni molecolari precoci con altissima sensibilità. Questo rende plausibile concentrare gli

sforzi per anticipare la diagnosi di carcinomi dell'ovaio che consentirebbe un miglioramento significativo nella curabilità e sopravvivenze delle pazienti affette da questa malattia. Le maggiori conoscenze molecolari sulle alterazioni driver del carcinoma dell'ovaio potranno anche consentirci lo sviluppo di nuovi marcatori e di terapie selettive e personalizzate.

1. Detection of TP53 clonal mutations in PAP test samples collected up to six years prior to high grade serous epithelial ovarian cancer diagnosis. A proof of principle study. Lara Paracchini, Chiara Pesenti, et al., . JAMA Netw. Open. 2020 Jul 1;3(7):e207566.
2. Transcriptional characterization of stage I Epithelial Ovarian Cancer: a multicentric study. Enrica Calura, Matteo Ciciani, et al. . Cells. 2019 Dec 1;8 (12). *co-last authors.
3. lncRNAs as novel indicators of patients' prognosis in stage I epithelial ovarian cancer: a retrospective and multicentric study. Paolo Martini, Lara Paracchini, et al. . Clin Cancer Res. 2016 Nov 8.*co-last authors.
4. A prognostic regulatory pathway in stage I Epithelial Ovarian Cancer: new hints for the poor prognosis assessment. E. Calura, L. Paracchini, et al. Ann Oncol. 2016 Aug;27(8):1511-9. *co-last authors.
5. miRNA landscape in Stage I Epithelial Ovarian Cancer defines the histotype specificities. Enrica Calura, Robert Fruscio, et al., Clin Clin Cancer Res. 2013 Aug 1;19(15):4114-4123. *co-last authors

Data, 30/07/2021

Il Legale Rappresentante

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

Il Legale Rappresentante



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Rendiconto 5 per mille ANNO 2019
Contributo percepito € 1.675.286,26 In data 02/10/2020

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente: amministratore.delegato@humanitas.it
HUMANITASMIRASOLE@LEGALMAIL.IT
Dati del rappresentante legale: Luciano Ravera

Titolo del progetto: Caratterizzazione molecolare, immunologica e farmacologica del mesotelioma pleurico per identificare nuovi approcci terapeutici

Data di inizio progetto: 01/03/2021	Data di fine progetto: 28/02/2024
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: € 365.082,67	Di cui: Quota sostenuta entro l'anno di rendicontazione: € 0,00 Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni): € 365.082,67

VOCI DI SPESA	Quota sostenuta entro l'anno di rendicontazione	Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni)
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)		331,893.34

Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)		
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)		
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)		
Elaborazione dati		
Spese amministrative		33,189.33
Altro (indicare quali)		
TOTALE	0,00	365.082,67

Data, 30/07/2021

Il Responsabile del Progetto
Prof. Maurizio D'incalci

Il Legale Rappresentante

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

Il Legale Rappresentante



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Rendiconto 5 per mille ANNO 2019
Contributo percepito € 1.675.286,26 In data 02/10/2020

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Istituto Clinico Humanitas
Codice fiscale: 10125410158
Sede legale: via Manzoni 56 – 20089 – Rozzano (MI)
Indirizzo di posta elettronica dell'ente: amministratore.delegato@humanitas.it
HUMANITASMIRASOLE@LEGALMAIL.IT
Dati del rappresentante legale: Luciano Ravera

Titolo del progetto: Caratterizzazione molecolare, immunologica e farmacologica del mesotelioma pleurico per identificare nuovi approcci terapeutici

Relazione illustrativa

Il mesotelioma pleurico (MPM) è un tumore causato prevalentemente dall'esposizione all'Asbesto; è un tumore aggressivo associato a prolungata infiammazione cronica, poco sensibile alle terapie disponibili e letale nella maggioranza dei casi. L'infiltrazione di cellule infiammatorie ed immunosoppressive ha certamente un ruolo nel determinare la progressione della malattia e la sua resistenza alla terapia. Per scoprire e sviluppare nuovi approcci terapeutici è importante attuare una caratterizzazione genomica, trascrittomica ed immunologica di un ampio numero di mesoteliomi umani e il gruppo proponente ha già iniziato questi studi creando una collaborazione tra diversi centri. I dati preliminari sostengono come vi siano alcuni meccanismi immunologici che potrebbero essere modulati da specifici approcci terapeutici. Il primo obiettivo di questo progetto è di estendere ed approfondire questi studi molecolari che sono alla base dell'identificazione di nuovi target terapeutici e di validarli anche con l'impiego di modelli preclinici in vitro ed in vivo già sviluppati nei nostri laboratori. Il secondo obiettivo è quello di studiare se e in che misura i campi elettrici (TTFIELDS) possano modificare la penetrazione e l'effetto di farmaci.

La recente approvazione da parte dell'FDA di un device che produce TTFIELDS per il trattamento di pazienti con mesotelioma, così come alcuni dati preliminari dei nostri laboratori, ci inducono a ritenere importante comprendere i meccanismi molecolari e farmacologici di questa terapia fisica, in modo da applicarla nel modo più razionale ed efficace in clinica.

Background

Nonostante che l'asbesto sia stato bandito da molti anni nei paesi industrializzati, il numero di casi di mesotelioma pleurico (MPM) continua ad aumentare (per review sul mesotelioma vedi referenza n. 1). MPM è un tumore altamente aggressivo, con prognosi infausta e opzioni di trattamento limitate. Il meccanismo della carcinogenesi sembra essere essenzialmente guidato

dall'infiammazione. Le fibre di amianto che penetrano nella pleura dopo essere state inalate sono il principale motore di questa infiammazione cronica, e circa l'80% dei pazienti ha una storia documentata di esposizione alle fibre di amianto.

Questa malattia non risponde in maniera significativa al trattamento con terapie convenzionali e la sopravvivenza globale mediana dei pazienti è di circa un anno anche se ci sono casi che hanno una sopravvivenza più lunga, ma non si conosce quali siano le ragioni di questa eterogeneità. La maggior parte dei pazienti viene trattata con regimi contenenti pemetrexed e derivati del platino, ma sfortunatamente, nella maggioranza dei casi la malattia diventa resistente e progredisce.

Le scelte di terapia per l'MPM sono state finora guidate dallo stadio clinico e dalle caratteristiche del paziente piuttosto che dalle caratteristiche istologiche o molecolari della malattia.

Sono stati identificati diversi percorsi molecolari coinvolti nella carcinogenesi dell'MPM. Tuttavia, l'efficacia clinica di farmaci che hanno come target questi percorsi non è finora stata dimostrata.

Gli inibitori di PD-1 e PD-L1 sono in fase di valutazione nell' MPM. I dati preliminari su piccoli gruppi di pazienti suggerivano che l'immunoterapia ha un beneficio limitato in questa malattia, probabilmente a causa del basso carico mutazionale di MPM e dell'attività immunosoppressiva del microambiente tumorale. La strada dell'immunoterapia è comunque interessante come indicato da dati molto recenti secondo i quali la combinazione di anticorpi indirizzati a due checkpoint del sistema immunitario quali CTLA4 e PD1 (studio CheckMate 743)(2) produce un'attività antitumorale significativa in una frazione di pazienti con MPM. Questa è una novità importante anche perché nei pazienti rispondenti la combinazione dei due anticorpi ne ha migliorato la sopravvivenza.

La seconda novità che riguarda la terapia dei mesoteliomi è che sono emersi dati promettenti con l'utilizzo di campi elettrici, in inglese Tumor Treating Fields (TTFields) che sembrano migliorare l'attività antitumorale di chemioterapie in pazienti con MPM. E' stato infatti dimostrato in clinica come TTFields (con particolari frequenze ed intensità) migliorino la risposta terapeutica ai chemioterapici. Queste evidenze hanno portato all'approvazione da parte di FDA di un device per attuare questo tipo di terapia, anche se il preciso meccanismo d'azione non è del tutto chiarito (3).

Le conoscenze sulle caratteristiche molecolari del mesotelioma sono limitate, come per molti altri tumori rari, e solo di recente alcuni laboratori hanno iniziato degli studi per identificare a livello genomico e trascrittomico le alterazioni più significative in ampie casistiche (4).

E' un tumore eterogeneo, alcuni casi sono associati a mutazioni germinali dei geni BAP1 e BLM, geni che sembrano aver un ruolo nella riparazione del DNA.

Maggiori conoscenze biologiche sono necessarie per mettere a punto terapie più efficaci e questo ci ha spinti ad intraprendere uno studio per comprendere la natura biologica di questa malattia, attraverso l'analisi trascrittomico di biopsie di pazienti, alla diagnosi. Lo studio è stato possibile attraverso la collaborazione con diversi centri di ricerca che includono l'Ospedale SS Arrigo e Biagio (Alessandria), Humanitas (Rozzano), Humanitas (Bergamo), Ospedale Santo Spirito (Casale Monferrato) così da poter studiare le caratteristiche biologiche di un alto gruppo di mesoteliomi. Questo studio, denominato MATCH (Mesothelioma And Translational Clinical and Health -related data) ha permesso di comprendere come gli istotipi epitelioide e sarcomatoide abbiano delle importanti diversità biologiche probabilmente rilevanti per l'andamento clinico e per la suscettibilità alle terapie. Questi studi hanno rinforzato l'idea che il microambiente tumorale sia cruciale sia per la patogenesi che per la risposta alle terapie e alla sopravvivenza dei pazienti.

In parallelo sono state ottenute delle linee cellulari di mesotelioma (da biopsie chirurgiche o lavaggi pleurici) (5) che ci hanno permesso di iniziare degli studi che riguardano gli effetti dei campi elettrici su queste cellule tumorali.

Il progetto può essere schematizzato in due sottoprogetti distinti A e B il cui scopo è:

Sottoprogetto A) Continuare ed estendere il progetto MATCH, approfondendo come le diverse caratteristiche molecolari dei mesoteliomi condizionino il microambiente tumorale e la risposta immunitaria, che sono emerse negli studi condotti fino ad oggi. Questi studi saranno integrati con alcuni studi immunologici che saranno condotti in collaborazione con l'Unità di Cellular Immunology della Dr.ssa Allavena, anche attraverso l'impiego di modelli sperimentali preclinici già sviluppati in collaborazione con il suo laboratorio (6).

Sottoprogetto B) studiare il meccanismo d'azione dei TTFields da soli o in combinazione con diverse classi di farmaci per ottenere dati preclinici rilevanti per indirizzare la ricerca clinica in questo campo nel modo più razionale.

Dati preliminari sottoprogetto A

Risultati preliminari provenienti dallo studio MATCH

L'analisi trascrittomica, eseguita tramite la tecnologia del sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq) in 68 casi, ha permesso di mettere in luce come gli istotipi non-epitelioide ed epitelioide rappresentino due tumori con forti diversità biologiche. Infatti, sono stati identificati ben 817 geni differenzialmente espressi tra i due gruppi, ovvero geni che sono regolati in modo opposto nei due istotipi. Queste evidenze dimostrano come l'istotipo non-epitelioide presenti una componente immunitaria marcata e preponderante che spiega la sua particolare sensibilità al trattamento immunoterapico. Lo studio CheckMate 743 recentemente riportato ha infatti evidenziato un sostanziale vantaggio in sopravvivenza con la combinazione nivolumab e ipilimumab rispetto alla chemioterapia tradizionale proprio nell'istotipo non-epitelioide (2).

I dati trascrittomici ci indicano come la categoria dei lungo sopravvivenenti sembrerebbe avere una maggiore presenza di linfociti B, mentre la categoria dei corto sopravvivenenti mostrerebbe una maggiore presenza di neutrofili e macrofagi M1, M2 nel suo microambiente tumorale.

Per quello che ci risulta dai dati riportati in letteratura, è la prima volta che viene evidenziata la differente composizione del microambiente tumorale nel mesotelioma maligno pleurico associata ad una diversa sopravvivenza. Questo dato acquisisce maggiore importanza alla luce dei più recenti lavori in ambito immunologico che stanno evidenziando il ruolo significativo e del tutto sconosciuto finora delle cellule B in altre tipologie tumorali e che potrebbe aprire la strada allo sviluppo di nuove terapie.

Approccio e metodologia del sottoprogetto A

Lo studio che qui si propone ha due obiettivi strettamente correlati:

1. il primo è quello di validare e approfondire i dati trascrittomici prodotti nel progetto MATCH relativi al microambiente tumorale, integrandoli con dati prospettici, genomici, di immunohistochimica e di single cell sequencing;
2. il secondo, il cui razionale è basato sulle evidenze ottenute nello studio MATCH, è quello di identificare e sviluppare nuovi approcci terapeutici mirati a potenziare le immunoterapie basate sulla inibizione dei checkpoint immunologici e a contrastarne la resistenza.

Per quanto riguarda il primo obiettivo ci proponiamo di terminare l'arruolamento e l'analisi retrospettiva di 120 casi, terminare l'arruolamento e l'analisi della parte prospettica di 50 casi dello studio MATCH, approfondire la caratterizzazione morfologica e funzionale dell'infiltrato infiammatorio dei campioni tumorali e integrare l'analisi trascrittomica con l'analisi genomica.

A completamento dell'analisi del microambiente tumorale, per una definizione più accurata e mirata delle componenti che lo compongono verranno scelti quattro pazienti per i quali sarà reso disponibile il tessuto tumorale fresco. Il tessuto sarà analizzato tramite la tecnica del sequenziamento a singola cellula (single-cell sequencing) per effettuare la mappatura delle cellule immunitarie che lo compongono, approccio meglio noto come immune profiling. A tale scopo verrà utilizzata la piattaforma 10X Genomics per il sequenziamento a singola cellula usando la chimica denominata Single-Cell Immune Profiling v2. Saranno sequenziati 4 pazienti considerando almeno 100 milioni di read per biopsia e un totale di circa 4000 cellule per campione.

Dato che la nostra analisi trascrittomica ha chiaramente dimostrato un arricchimento di cellule immunitarie (linfociti B) nei pazienti lungo sopravvivenenti, e in considerazione del fatto che la letteratura scientifica ha riportato che aggregati di linfociti B organizzati in strutture simili ai linfonodi (tertiary lymphoid structures, TLS) sono associati a miglior prognosi in altre patologie tumorali è interessante verificare che anche nel mesotelioma i linfociti B nel tumore siano organizzati in TLS (7). Questa indagine verrà condotta su campioni tumorali in paraffina di pazienti con mesotelioma, già disponibili, mediante immunohistochimica con anticorpi specifici (anti-CD20 e anti-CD3).

Il secondo obiettivo è fondamentalmente indirizzato a contrastare le funzioni tumorali e immunosoppressive dei macrofagi infiltranti il tumore.

E' ormai stabilito che i macrofagi associati ai tumori (tumor-associated macrophages, TAMs) presentano un profilo funzionale immunosoppressivo che ostacola un'efficace risposta

antitumorale. I TAMs favoriscono anche la proliferazione delle cellule tumorali, producendo diversi fattori di crescita promuovendo quindi la progressione del tumore (8). Anche per quanto riguarda la risposta alla terapia oncologica, inclusa l'immunoterapia, la presenza di un numero elevato di macrofagi nel tumore correla con una resistenza alle terapie (8).

Pertanto esiste un forte razionale per contrastare le funzioni pro-tumorali e immunosoppressive dei TAMs, anche nel contesto di approcci terapeutici di immunoterapia. Tra le diverse strategie perseguite nel corso degli ultimi anni allo scopo di inibire l'attività immunosoppressiva dei TAMs, il gruppo di Paola Allavena in Humanitas ha recentemente messo a punto una combinazione di composti sintetici che attivano i macrofagi attraverso i loro recettori Toll-like receptor (TLRs). Questi recettori sono attivati quando è in corso una infezione virale e stimolano una risposta immunitaria mediata da Interferon, una delle citochine chiave della risposta immunitaria, importante anche nelle risposte anti-tumorali.

Studi precedenti dello stesso gruppo in modelli tumorali murini hanno dimostrato che il trattamento con la combinazione di Poly I:C e Resiquimod (ligandi dei TLR3, TLR7 e TLR8) riduce drasticamente la crescita tumorale *in vivo* e inibisce la formazione di metastasi.

In questo progetto ci si propone di associare la terapia con Poly I:C e Resiquimod con l'immunoterapia con anti-PD1. Verranno utilizzati dei modelli ortotopici di mesotelioma murino, rappresentativi dei mesoteliomi pleurici umani (una linea cellulare epitelioide e una linea sarcomatoide) (6).

Dati preliminari sottoprogetto B

La figura 1 mostra la sensibilità delle due linee cellulari sottoposte a trattamento continuo per 96 ore con TTFields a 150kHz di frequenza e 1.12 V/cm.

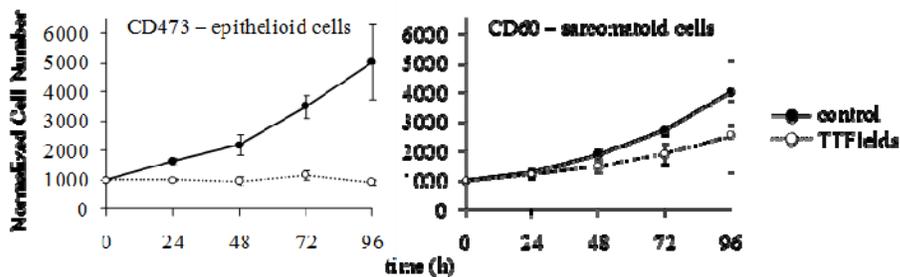


Figura 1 - Effetto dei TTFields sulla crescita cellulare. Ciascun punto rappresenta la media \pm deviazione standard di 6 campioni

Si nota come anche se le due linee cellulari hanno una simile velocità di crescita esse siano diversamente sensibili al trattamento. Si vede infatti che la linea CD473 (epitelioide) è molto sensibile con il totale blocco della crescita, mentre la linea CD60 (sarcomatoide) è solo leggermente rallentata. Il trattamento con TTFields causava nella linea CD473 un blocco in G2 con anche la formazione di una popolazione poliploide mentre nella linea CD60 non ha prodotto alcuna significativa perturbazione. Questi dati sono di grande interesse perché mostrano che l'effetto biologico dei campi elettrici è selettivo su alcuni tipi cellulari. La figura 2 mostra come a livello trascrizionale i campi elettrici abbiano effetti molto diversi nelle due linee cellulari. Si è osservata infatti la modulazione di un gran numero di geni nella linea CD473 mentre gli effetti erano molto limitati nella linea CD60.

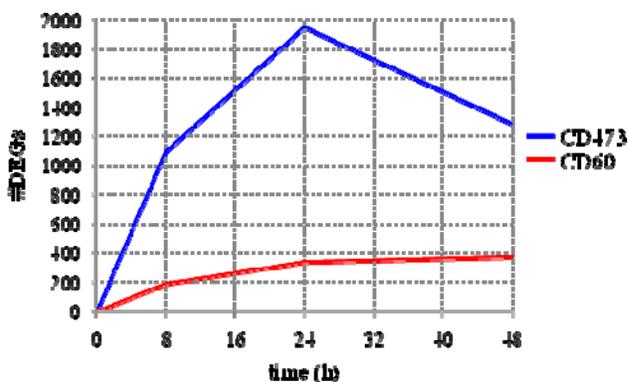


Figura 2 - Numero di "Differential express genes (DEG)" nella linea epitelioide CD473 e nella linea sarcomatoide CD60

Questi dati preliminari sostengono l'ipotesi che i TTFIELDS abbiano degli effetti biologici selettivi, dipendenti dal contesto cellulare. E' ipotizzabile che anche il sinergismo tra TTFIELDS e farmaci, osservato in clinica, possa dipendere da fattori biologici e farmacologici che ci si propone di studiare.

Approccio e metodologia

Ci si propone di completare i dati che riguardano la sensibilità ai TTFIELDS su altre linee cellulari per verificare se le alterazioni di pathways identificate sulle linee CD473 e CD60 siano confermate anche in altre linee rappresentative di mesoteliomi epitelioidei e sarcomatoidi rispettivamente. Lo studio trascrittomico servirà ad individuare potenziali farmaci che potrebbero avere un'azione sinergica in considerazione del loro meccanismo d'azione. Ci si propone di studiare la combinazione di TTFIELDS con diverse classi di farmaci: farmaci che causano danni al DNA, farmaci che agiscono su meccanismi di riparazione del DNA come inibitori di PARP o inibitori di DNA-PK (9), farmaci che interferiscono con i checkpoint del ciclo cellulare o sull'assemblaggio dei microtuboli, inoltre si studieranno dei farmaci che agiscono sulla regolazione della trascrizione come inibitori HDAC e inibitori del bromo domain (OTX015) (5) o di trabectedina, un farmaco studiato estesamente dal responsabile di questo progetto, che ha mostrato una moderata attività in uno studio clinico recente in pazienti con mesoteliomi (10). Si studierà se i sinergismi che si osserveranno saranno attribuibili a un cambiamento di farmaci indotti dai TTFIELDS attraverso l'impiego di tecniche analitiche (mediante HPLC-MS) sufficientemente specifiche e sensibili per l'analisi dell'uptake cellulare e ritenzione dei diversi farmaci (11-14). Le combinazioni più promettenti che saranno selezionate sulla base di studi in vitro saranno poi studiate in vivo in animali immunodeficienti trapiantati con le stesse linee di MPM. Gli studi in vivo saranno associati a dettagliati studi di farmacocinetica e farmacodinamica.

In vitro experiments:
 Human cell lines: CD47+ and CD44+ epithelial MPM; CD40 and CD47+ mesenchymal MPM; CD47+ and CD44- hepatic MPM.
 Murine cell lines: ABC2 - epithelial MPM; AB1 - mesenchymal MPM; AB12 - hepatic MPM.

Growth inhibition and cell proliferation assays		Transcriptomic and molecular assays		Pharmacokinetic studies	
Growth inhibition	Alcinate cell count	Transcriptomic modulation	RNA-Seq analysis and pathway analysis	Cellular drug uptake and efflux	Plasma drug absorption and HPLC MS analysis
Cell cycle effects	Flow cytometric analysis (e.g. DNA content; analysis of cell density; ACC/ESCC ⁺ and Propidium iodide staining; analysis of proliferation by 3' oligo 2' deoxyuridine (EdU) pulse-chase; cell metabolism; DNA damage repair assays...)	Molecular assay	Western blot and functional assays		
Analysis of combinations	Survival assays (e.g. Sulfinylamide B staining) and mechanistic analysis of synergism/antagonism				

Identification of new combinations of TTFelds and anticancer drugs for *in vivo* experiments

In vivo experiments:
 MPM xenograft models: immunodeficient mice bearing subcutaneous tumor derived from human MPM cell lines.
 MPM syngeneic models: human-compatibil mice bearing intraperitoneal tumor derived from murine MPM cell lines expressing hcdhfrca3.

Antitumor activity	Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies
Volume of tumor volume in subcutaneous tumors	Drug distribution in plasma, tumor and other tissues monitored by Atomic drug absorption or HPLC MS analysis
Monitoring tumor growth by non-invasive bioluminescence imaging (IVIS Lumina Series III XR3S)	Intratumor drug distribution monitored by MALDI mass spectrometry imaging
	<i>In vivo</i> molecular evaluation of specific effects

Impatto sul SSN

Identificare e validare i fattori biologici dell'MPM che possono avere un impatto sulla sopravvivenza e la risposta al trattamento è importante per impostare strategie terapeutiche più efficaci.

Gli studi proposti sono indirizzati ad individuare dei possibili target per nuovi approcci terapeutici personalizzati in base a caratteristiche molecolari e immunologiche specifiche per diversi sottotipi di MPM che potrebbero migliorare la sopravvivenza e la qualità della vita di pazienti affetti da questa malattia.

Gli studi proposti che riguardano i TTFelds sono di potenziale utilità per utilizzare in clinica questa terapia fisica (poco tossica e poco costosa) in modo razionale.

Data, 30/07/2021

Il Legale Rappresentante

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

Il Legale Rappresentante