



**ISTITUTO NAZIONALE
PER LO STUDIO
E LA CURA DEI TUMORI**

20133 milano - via venezian, 1 - tel. 2390 - telex 333290 tumist I - codice fiscale 80018230153 - partita i.v.a. 04376350155

**TAC SPIRALE, PET, BIOMARCATORI E ANALISI
PROTEOMICA, ASSOCIATE A UN PROGRAMMA DI
PREVENZIONE PRIMARIA, PER LA DIAGNOSI PRECOCE
DEL CARCINOMA POLMONARE: STUDIO
RANDOMIZZATO IN SOGGETTI AD ALTO RISCHIO**

“SINOSSI”

Il presente protocollo si articola in due parti:

Parte 1

PREVENZIONE PRIMARIA E CONFRONTO TRA DUE MODALITA' DI DIAGNOSI PRECOCE DEL CARCINOMA POLMONARE MEDIANTE TAC SPIRALE +/- PET.

Descrizione del Progetto

Il progetto è uno studio clinico randomizzato multicentrico, che confronta due diverse intensità di diagnosi precoce del carcinoma polmonare associato o meno ad altre metodiche diagnostiche d'avanguardia e ad un programma di prevenzione primaria per la disassuefazione da fumo, che unisce le tecniche di diagnostica per immagine più sensibili e più specifiche con i metodi più moderni di analisi patologica e di biologia molecolare in una grande coorte di individui ad alto rischio, che sarà mantenuta sotto controllo per dieci anni.

Il nuovo trial vuole raggiungere una serie di obiettivi: confronto tra due diverse modalità di diagnosi precoce; disegno di studio controllato e randomizzato; quesito di ricerca originale rispetto agli studi già in corso; braccio di controllo che protegga sufficientemente una popolazione di volontari ad alto rischio; reclutamento multicentrico, che garantisca una dimensione del campione adeguata per valutare la riduzione della mortalità specifica, o quantomeno della frequenza di tumori polmonari diagnosticati in fase avanzata; valutazione di alcuni test di biologia molecolare e analisi proteomica, sia per definire il rischio individuale di cancro che per identificare precocemente la neoplasia; monitoraggio della frequenza di trattamenti inutili o dannosi in soggetti senza malattia; calcolo dei costi umani ed economici del programma di diagnosi precoce.

Messa a punto di una rete nazionale per diagnosi precoce del carcinoma polmonare.

Lo studio sarà condotto in centri italiani altamente specializzati, che abbiano una formazione e una capacità sufficienti sia per garantire un rapido reclutamento della popolazione a rischio (entro dodici mesi) che per sostenere lo studio durante l'intero periodo di dieci anni.

Obiettivi primari:

- identificare e selezionare nelle principali aree geografiche del paese 20 centri italiani dotati delle risorse sufficienti e dell'esperienza necessaria;
- installare una rete nazionale per la visione delle immagini sospette alla TAC;
- facilitare lo scambio di informazioni;
- provvedere ad un'uniformità di organizzazione ;
- garantire il controllo della qualità per tutto il periodo dello studio.

Inserimento braccio di controllo

E' stato inserito un gruppo di controllo per rispondere alla richiesta dell'AIRC, principale ente finanziatore del progetto. L'inserimento di tale braccio di randomizzazione era stato già preso in considerazione nel protocollo precedentemente approvato dal Comitato Etico (Prot. INT 45/04)

Specifiche sul Gruppo di controllo

Dalla lista degli assistiti dei Medici di Medicina Generale (MMG) e in collaborazione con il Centro coordinatore, verranno selezionati circa 3000 soggetti ad alto rischio di età compresa tra 49 e 75 anni. Verranno esclusi i soggetti sicuramente non eleggibili in base ai criteri di esclusione previsti dal protocollo. Il Centro di prevenzione rilascerà ai soggetti una lettera che spiega l'iniziativa e li inviterà a compilare un modulo atto a verificare le condizioni di rischio e la presenza dei criteri di inclusione, con i loro dati anagrafici e recapiti tramite i quali i soggetti possono essere contattati. I volontari potranno restituire tale modulo ai MMG, oppure a spedirlo/consegnarlo al Centro coordinatore.

Il Centro raccoglierà i moduli, valuterà la disponibilità alla partecipazione, determinerà l'eleggibilità dei soggetti in base ai criteri di inclusione ed esclusione.

E' ben specificato che a tutti i soggetti a rischio eleggibili verrà proposta la randomizzazione in un gruppo di controllo che effettua solo un programma di prevenzione primaria attraverso la cessazione del fumo, e in un gruppo che associa la TAC spirale periodica alla prevenzione primaria. Quest'ultimo gruppo sarà ulteriormente randomizzato in TAC annuale verso TAC ogni 2 anni.

Tutti i soggetti eseguiranno una visita pneumologica con esecuzione di esame spirometrico presso il Centro di Prevenzione.

I soggetti eleggibili che non sono intenzionati ad eseguire gli esami strumentali eseguiranno esclusivamente l'intervento di disassuefazione da fumo e verranno inseriti in uno studio osservazionale di tipo epidemiologico.

E' da precisare comunque che tale intervento di prevenzione primaria è offerto a tutti i soggetti eleggibili, inseriti in tutti i bracci di randomizzazione previsti dallo studio (gruppo di controllo, gruppo che esegue TAC annuale, gruppo che esegue TAC ogni due anni).

Uso ottimale della TAC spirale +/- PET per la diagnosi precoce del carcinoma polmonare.

I soggetti arruolati nell'intervento attivo verranno randomizzati in due bracci per confrontare l'efficacia della TAC spirale (+-PET) eseguita con frequenza annuale (HFTC) verso la TAC eseguita ogni 2 anni (LFTC). In occasione di ogni esame TAC, e quindi con la stessa periodicità, verranno raccolti i campioni biologici (sangue) necessari per il dosaggio dei marcatori molecolari. La fase di intervento avrà una durata minima di 3 anni, ed un follow-up minimo di 10 anni.

Esami eseguiti dai soggetti a seconda del suo gruppo di randomizzazione:

Gruppo di controllo

- Visita pneumologica ogni anno con esecuzione di spirometria, un esame semplice e rapido che permette di misurare la quantità di aria che una persona può inspirare ed espirare soffiando in un tubo connesso ad un computer.
- Intervento di prevenzione primaria. Se Lei è ancora fumatore o fumatrice possiamo illustrarLe i vantaggi ottenibili con la cessazione del fumo, gli eventuali danni che sono stati dimostrati essere legati all'abitudine al fumo e se desidererà sottoporsi a programmi di disassuefazione da fumo riceverà un elenco di tutti i Presidi nei quali sono attivi programmi di prevenzione primaria.
- In occasione di ognuno di questi appuntamenti annuali dovrà riempire un questionario sul consumo di tabacco ed eventuali esami medici eseguiti nell'intervallo fra gli appuntamenti.

Gruppo TAC spirale

- eseguirà una TAC spirale ogni anno / ogni 2 anni presso l'Istituto Tumori di Milano per la durata dello studio (minimo 3 anni);
- in occasione di ognuno di questi appuntamenti annuali / biennali dovrà fornire un campione di sangue
- eseguirà una visita pneumologica, ogni anno / ogni 2 anni a seconda del gruppo di randomizzazione, con esecuzione di spirometria, un esame semplice e rapido che permette di misurare la quantità di aria che una persona può inspirare ed espirare soffiando in un tubo connesso ad un computer.
- Le verrà proposto un intervento di prevenzione primaria. Se Lei è ancora fumatore o fumatrice possiamo illustrarLe i vantaggi ottenibili con la cessazione del fumo, gli eventuali danni che sono stati dimostrati essere legati all'abitudine al fumo e se desidererà sottoporsi a programmi di disassuefazione da fumo riceverà un elenco di tutti i Presidi nei quali sono attivi programmi di prevenzione primaria.
- In occasione di ognuno di questi appuntamenti, annuali/biennali, dovrà compilare un questionario sul consumo di tabacco ed esibire eventuali esami medici eseguiti nell'intervallo fra gli appuntamenti.

Obiettivi principali:

- Ridurre la percentuale di soggetti fumatori
- Valutare se un programma di prevenzione primaria aumenti o meno la compliance dei soggetti reclutati in un programma di diagnosi precoce
- Ridurre la mortalità per carcinoma polmonare
- Valutare quale intensità di esecuzione della TAC del torace (TAC annuale vs TAC ogni due anni) sia più efficace nella riduzione della mortalità per carcinoma polmonare
- Valutare l'efficacia dell'impiego dei marcatori biomolecolari come potenziali indicatori precoci di carcinoma polmonare
- Definire all'interno della popolazione selezionata il rischio individuale sulla base di marcatori biomolecolari intesi come espressione di danno biologico

Gli obiettivi secondari dello studio sono:

- Definire l'incidenza annuale del carcinoma polmonare
- Definire la proporzione di carcinomi polmonari operabili di stadio I
- Definire l'accuratezza della PET in termini di diagnosi e prognosi
- Valutare l'impatto delle patologie fumo-correlate all'interno della coorte dei soggetti reclutati
- Valutare la correlazione tra prevenzione primaria e mortalità dovuta ad altre patologie che non siano il carcinoma polmonare

Metodologia

Attraverso i mezzi di informazione più diffusi (stampa e televisione) si provvederà a dare notizia dello studio su tutto il territorio nazionale indicando chiaramente i Centri di riferimento da contattare.

Verranno considerati ad alto rischio i soggetti con le seguenti caratteristiche:

- età compresa tra i 49 e i 75 anni;
- fumatori abituali o ex-fumatori che non abbiano smesso da più di dieci anni (dose totale ≥ 20 pacchetti/anno). Sono ammessi al reclutamento soggetti affetti da neoplasia del tratto aero-digestivo che abbiano smesso di fumare da più di 10 anni, salvo le specifiche del punto successivo;
- assenza di accertata o pregressa diagnosi di tumore (sono ammessi pazienti con tumori della pelle eccetto i melanomi) oppure pazienti affetti da neoplasia che abbiano una remissione totale da almeno 5 anni previa valutazione dello staff medico del Progetto. Sono da considerarsi eleggibili anche soggetti con un intervallo libero da malattia inferiore ai 5 anni ma comunque non meno di 2 purché siano stati trattati radicalmente per un tumore polmonare in stadio I.

Ai soggetti a rischio eleggibili verrà proposta la randomizzazione in un gruppo di controllo che effettua solo un programma di prevenzione primaria attraverso la cessazione del fumo, e in un gruppo che associa la TAC spirale periodica alla prevenzione primaria. Quest'ultimo gruppo sarà ulteriormente randomizzato in TAC annuale verso TAC ogni 2 anni, come previsto nel protocollo iniziale.

Tutti i soggetti eleggibili saranno sottoposti a visita pneumologica iniziale con esecuzione di esame spirometrico presso il Centro di Prevenzione.

Ai soggetti eleggibili che rifiutano il braccio di controllo, ma hanno espresso la volontà di partecipare al progetto MILD sulla diagnosi precoce, è concessa la randomizzazione nei due bracci di intervento diagnostico con TAC annuale vs TAC ogni due anni.

I soggetti eleggibili che non sono intenzionati ad eseguire gli esami strumentali eseguiranno esclusivamente l'intervento di disassuefazione da fumo e verranno inseriti in uno studio osservazionale di tipo epidemiologico.

E' da precisare comunque che l'intervento di prevenzione primaria è offerto a tutti i soggetti eleggibili, inseriti nello studio (gruppo di controllo, gruppo che esegue TAC annuale, gruppo che esegue TAC ogni due anni).

A tutti i volontari verrà richiesta la compilazione di un questionario la cui valutazione porterà all'inserimento o esclusione del soggetto dallo studio.

Una volta dichiarato eleggibile, il soggetto dovrà firmare un consenso informato e sarà invitato a presentarsi in Ospedale presso la "Early Detection Clinic" (EDC), cioè l'Ambulatorio appositamente organizzato per lo studio. Ove possibile, le visite e gli esami saranno effettuati il sabato mattina fra le 8.30 e le 14.30 per un totale di 20-30 appuntamenti/settimana. Nel gruppo di intervento attivo verranno inoltre raccolti campioni di sangue, al fine di eseguire gli esami per la definizione dei marcatori molecolari.

Modalità di esecuzione degli esami radiologici.

La tecnica di esecuzione della TAC spirale seguirà le linee guida messe a punto nello studio pilota per ottenere la minima esposizione del paziente (dose effettiva equivalente: 0.7 mSv) e la massima efficacia diagnostica: 140kV, 40mA, 1s, pitch 2, ricostruzione ad intervalli di 5 mm, con filtri "standard" e "lung". L'esame garantisce la visibilità di noduli polmonari del diametro di almeno 2 mm

con un'esposizione del paziente valutabile in 3-5 volte quella necessaria per un radiogramma del torace. L'esecuzione della TAC richiede in media 18 scansioni, per un tempo complessivo di 15 secondi circa. I risultati della TAC saranno valutati su monitor ad alta definizione da due radiologi indipendenti.

DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI DNA NEL PLASMA COME POTENZIALI INDICATORI PRECOCI DI CARCINOMA POLMONARE.

Obiettivi principali

- Determinare accuratezza e specificità dei livelli di DNA plasmatico attraverso la qPCR mediante il prelievo di campioni biologici effettuati in occasione di ogni TAC;
- determinare la combinazione ottimale di esecuzione della TAC spirale, della PET e dei livelli di qPCR DNA per ottimizzare la metodologia della diagnosi precoce del carcinoma del polmone;
- valutare l'efficacia dei livelli della suddetta qPCR nell'identificare soggetti ad alto rischio.

Popolazione

Si intende determinare i livelli di DNA plasmatici attraverso l'analisi della PCR quantitativa (qPCR) sui campioni biologici raccolti in occasione dell'esecuzione della TAC spirale, su un limitato campione di soggetti nei due bracci (1000 dal braccio HFCT e 1000 dal braccio LFCT).

Banca Dati Campioni Biologici

La raccolta e lo stoccaggio di campioni umani congelati raccolti dai volontari e dai casi chirurgici verrà organizzata centralmente al fine di ottenere una campionatura uniforme. I campioni saranno conservati a -80° in speciali congelatori biologici dedicati. I campioni saranno raccolti e depositati negli appositi congelatori immediatamente dopo la raccolta per evitare la morte di alcune cellule e quindi la perdita di alcune caratteristiche.

Sarà pianificata una raccolta di campioni sufficiente a permettere varie tipologie di ricerche, alcune delle quali non ancora pianificate in quanto le metodologie di laboratorio sono in continua evoluzione. Sarà inoltre necessario mantenere una costante gestione dei dati relativi ai campioni stoccati (in ogni freezer è possibile raccogliere migliaia di campioni) e correlare ogni campione alle informazioni cliniche relative.

Campioni chirurgici di carcinoma polmonare

- Se prima della toracotomia viene eseguita la mediastinoscopia (per analizzare i linfonodi mediastinici sospetti per il coinvolgimento di N2), fino a 2 campioni raccolti dalle biopsie di questi linfonodi vanno collocati in appositi contenitori separati e immediatamente congelati con carbone diossido solido prima dello stoccaggio definitivo nei freezer.
- Al momento della toracotomia per resezione polmonare occorre raccogliere, collocare in appositi contenitori e congelare immediatamente con carbone diossido solido prima dello stoccaggio definitivo in freezer a -140° i seguenti campioni:
 - due linfonodi, uno mediastinico e uno ilare;
 - due porzioni di parenchima polmonare microscopicamente normale;
 - due pezzi di bronchi apparentemente normali (lontano dal tumore);
 - due pezzi di tumore principale.

Campioni fissati in paraffina

Campioni di tessuto saranno raccolti in un laboratorio adiacente ad ogni banca dati di tessuti chirurgici. Questi saranno accuratamente etichettati e inviati al Dipartimento di Patologia per revisione patologica, per essere fissati in paraffina e conservati in modo permanente. Nel caso di linfonodi, una metà sarà congelata e l'altra metà sarà utilizzata per revisione patologica e fissata in paraffina.

Raccolta di campioni di sangue e identificazione del DNA

Sarà raccolto un campione di sangue periferico di 7.5 ml, al momento dell'esecuzione della TAC spirale, e stoccato a -80°. La separazione del plasma e l'estrazione del DNA avverranno come precedentemente descritto. Il DNA purificato da 1 ml di plasma sarà diluito in un volume finale di 50 ml di acqua. Il test del DNA plasmatico sarà effettuato senza essere a conoscenza dello stato

caso/controllo. Una volta stoccati i campioni saranno inviati all'Istituto Nazionale Tumori di Milano dove verranno eseguiti tutti gli esami di biologia molecolare.

Parte 2

DIAGNOSI PRECOCE DEL CARCINOMA POLMONARE MEDIANTE ANALISI PROTEOMICA DEL PLASMA

Introduzione

Il repertorio attualmente a disposizione di biomarcatori diagnostici in campo oncologico, di cui sono esempi paradigmatici il PSA per il cancro della prostata e il CA125 per il cancro ovarico, risulta complessivamente inadeguato, in particolar modo se ci riferiamo a lesioni tumorali preinvasive o tumori invasivi in stadio iniziale. Molto dipende dal fatto che l'analisi univariata relativa a singoli biomarcatori non è adatta per definire una malattia multiparametrica come quella tumorale. L'idea oggi è quella di trarre vantaggio dalla complessità e dall'eterogeneità tumorale che se opportunamente studiate possono fornire la chiave per una corretta valutazione della malattia. La strategia è individuare decine di differenti proteine o peptidi nel siero/plasma che siano il riflesso di uno stato di salute o di malattia ed estrapolare pannelli di biomarcatori significativi in analisi multiparametriche. Si è recentemente visto che proteine abbondanti come ad es. l'albumina possono svolgere un ruolo di salvataggio e di amplificazione di materiali proteici (proteine/peptidi) a basso peso molecolare che riescono a penetrare la barriera endoteliale e diffondere nel sangue (Liotta et al., Nature 425 2003; Metha et al., Disease markers, 2003). Si è dimostrato che l'albumina lega queste componenti e le mantiene in circolo fino a che essa stessa non è soggetta a distruzione. Questo fenomeno inevitabilmente determina un accumulo di componenti proteiche correlate alla presenza di una malattia, e, quindi, potenzialmente diagnostiche. Molti progetti di ricerca stanno puntando sulla decifrazione di queste componenti proteiche per la definizione di quadri associati a malattie neoplastiche. Da un punto di vista analitico cioè è reso possibile dall'utilizzo della spettrometria di massa, una tecnica che può essere sfruttata per l'analisi e la distinzione di migliaia di proteine e peptidi a basso peso molecolare. Basate sull'utilizzo della spettrometria di massa sono nate piattaforme tecnologiche complesse ma molto avanzate, per la scoperta di biomarcatori serici/plasmatici. Esse intersecano i campi della proteomica, della nanotecnologia e dell'intelligenza artificiale. Queste tecnologie operano tramite processi di sequestro delle proteine/peptidi a basso peso molecolare che poi sono analizzati con spettrometria di massa e interpretati con specifici e sempre più potenti algoritmi di classificazione e predizione per l'ottenimento di profili peptidici diagnostici.

L'integrazione di tutte queste nuove tecnologie permette di stabilire le differenze in espressione proteica, sia quantitative che qualitative, tra cellule normali e le loro controparti neoplastiche. Questo permetterà la classificazione dei tumori sulla base dei loro proteomi e permetterà di stabilire una correlazione tra proteine della cellula neoplastica e prognosi, tra proteoma neoplastico e decorso clinico e tra proteoma e risposta alla terapia.

Obiettivi

Questo studio si propone di identificare nel plasma pattern proteici di riconoscimento dei tumori polmonari attraverso l'utilizzo della spettrometria di massa del tipo "Surface-Enhanced Laser Desorption-Ionization-Time of Flight" (SELDI-TOF) in soggetti forti fumatori già inseriti in un programma di diagnosi precoce con TAC spirale +/- PET.

L'obiettivo principale è la validazione ed il trasferimento della tecnologia per l'analisi proteomica sul plasma finalizzata alla diagnosi precoce dei tumori polmonari mediante l'identificazione di profili proteici e di molecole coinvolte nella patogenesi, progressione e sensibilità a specifiche terapie.

Disegno dello studio

Il progetto si articola in due fasi: durante la prima fase verranno effettuati gli studi per la validazione e selezione della piattaforma ottimale per l'analisi proteomica dei tumori polmonari. In questa fase, verrà utilizzato il materiale biologico già presente nella banca di tessuti dell'Istituto Nazionale Tumori di Milano, mentre l'analisi dei pattern proteomici e l'elaborazione bio-informatica dei risultati si avvarrà anche della collaborazione con diversi laboratori di ricerca in Italia e negli Stati Uniti (IFOM, NCI Bethesda, Vanderbilt Nashville).

Questa fase prevede il trasferimento / integrazione degli elementi tecnologici essenziali all'analisi proteomica presso i laboratori dell'Istituto Tumori di Milano, e l'attivazione di programmi di interscambio di personale finalizzato alla realizzazione del progetto.

Contemporaneamente, si darà inizio allo studio prospettico randomizzato per la diagnosi precoce dei tumori polmonari con metodiche per immagini (TAC spirale, PET) su 10,000 soggetti a rischio, che dovrà fornire il materiale biologico per l'analisi proteomica definitiva.

Nella seconda fase verranno condotti studi combinati di proteomica e diagnostica per immagini, per valutare l'efficacia diagnostica dell'analisi del plasma ed identificare eventuali target terapeutici molecolari.

Questa fase della ricerca deve determinare se l'analisi proteomica del plasma sia in grado di aumentare la sensibilità e specificità diagnostica della TAC / PET e/o caratterizzare il profilo di rischio individuale nei forti fumatori, utilizzando la tecnologia rivelatasi più idonea nella fase preliminare di validazione (Fase 1).

Se l'analisi proteomica si dimostrasse capace di aumentare l'accuratezza diagnostica della TAC / PET, sarebbe possibile in futuro pianificare programmi di screening di massa del tumore polmonare più efficaci e selettivi, sulla base di una definizione del rischio biologico individuale molto più elevato. Inoltre, le informazioni sul profilo proteico plasmatico potrebbero influenzare la scelta del trattamento chirurgico e definire la sensibilità verso specifici farmaci antitumorali. Tutto questo potrebbe ridurre significativamente la mortalità per tumore polmonare nella popolazione sottoposta a diagnosi precoce.