



Direzione Scientifica

Responsabile del procedimento: *Dr.ssa Silvia Franceschi*

Referente per la pratica: *Sara Fort*

☎ +39.0434.659183

✉ dirscienti@cro.it - sfort@cro.it

Mod. G

RELAZIONE FINALE DELLE ATTIVITA'

Obiettivo generale

Descrivere come l'obiettivo generale di progetto sia stato raggiunto.

PerMiD aveva l'obiettivo di definire l'assetto molecolare dei tumori della testa e del collo (TeC) in Friuli Venezia Giulia al fine di stabilire la miglior terapia personalizzata possibile per ogni nostro paziente nell'ambito di un PTDA condiviso, esplorando al contempo nuove terapie mirate contro TP53 facilmente trasferibili in clinica. Questo obiettivo è stato completamente raggiunto ed abbiamo prodotto una serie di dati che potranno migliorare la personalizzazione delle terapie nei tumori TeC come di seguito specificato.

I nostri studi in parte pubblicati ed in parte ancora non pubblicati (manoscritto in preparazione) hanno infatti dimostrato che nei tumori TeC con mutazioni del gene TP53 è possibile immaginare nuove terapie specifiche basate sull'uso di terapia epigenetica (anti-miR) associata a Radioterapia e/o all'inibizione della via di EGFR con molecole a bersaglio specifico (e.g. Cetuzimab, Gefinitib) già in uso clinico. I nostri studi dimostrano infatti che questo approccio è fattibile ed efficace non solo in vitro ma anche in modelli preclinici.

Questo dato è molto importante per i pazienti con TeC del Friuli Venezia Giulia in quanto abbiamo osservato analizzando i campioni di 154 pazienti curati nei nostri Istituti che il gene TP53 è mutato in oltre il 60% dei casi e quindi nella maggioranza dei nostri pazienti.

E' noto che la presenza di mutazioni del gene TP53 è associata a cattiva prognosi ed una minore risposta ai trattamenti disponibili per i pazienti TeC quindi i nostri dati suggeriscono che la valutazione del gene TP53 dovrebbe essere fatta di routine nei pazienti con tumori TeC per definirne la prognosi ed eventualmente il miglior tipo di terapia. Inoltre i nostri dati dimostrano che la via di segnalazione di PI3-Kinasi (i.e. i geni PIK3CA, PTEN ed AKT1) è nel complesso alterata nel 15% dei casi di tumori TeC della nostra Regione. Questo dato è rilevante visto che sono disponibili per il trattamento dei tumori umani inibitori specifici di PI3-Kinasi (e.g. Alpelisib) e quindi i nostri dati suggeriscono che la valutazione gli hot spot mutazionali di PIK3CA, PTEN ed AKT1 debba essere valutato di routine nei nostri pazienti.

Abbiamo quindi prodotto una serie di dati molecolari per migliorare la personalizzazione delle terapie nei tumori TeC per integrare nel prossimo futuro il PDTA regionale come da discussioni in corso fra i professionisti partecipanti al progetto.

Obiettivi specifici (SOLO Relazione finale)

Descrivere come gli obiettivi specifici siano raggiunti.

Per raggiungere l'obiettivo generale avevamo previsto una serie di obiettivi specifici come di seguito specificato:

1. Abbiamo innanzitutto raccolto e sequenziato 154 campioni tumorali di tumori TeC generando un database retrospettivo condiviso fra CRO-Aviano e ASFO.
2. Abbiamo selezionato 15 geni noti per essere frequentemente mutati nei tumori TeC mediante da ricerche bioinformatiche su database pubblici (e.g. COSMIC, TGCA, ICGC).
3. I campioni raccolti sono stati quindi sequenziati per l'intera sequenza codificante dei 15 geni. Quest'approccio ci ha permesso di definire le mutazioni hot spot nei 15 geni selezionati. A questo scopo abbiamo anche sviluppato uno script in linguaggio Python per il confronto di dataset.
4. Abbiamo disegnato uno studio clinico prospettico multicentrico per l'arruolamento di pazienti con tumore TeC (Studio CRO-2019-13 Approvazione CEUR Prot. 0009712/P/GEN/ARCS del 02/04/2019) per valutare le alterazioni e genomiche ed epigenomiche riscontrate in studi retrospettivi.
5. Abbiamo valutato l'associazione fra presenza di mutazioni/alterazioni epigenomiche e risposta a specifici trattamenti antitumorali. Abbiamo così identificato un biomarcatore predittivo di risposta al trattamento con radioterapia + anticorpo monoclonale Cetuximab (Citron et al. EMBO Mol. Med. 2021).
6. Abbiamo valutato l'effetto del trattamento con statine sulla risposta a terapie antitumorali ed abbiamo generato modelli preclinici di tumore TeC con mutazioni specifiche di TP53 per testare l'effetto di queste molecole. Abbiamo inoltre valutato il ruolo pro-metastatico di TP53
7. In base ai risultati raccolti abbiamo disegnato nuove combinazioni terapeutiche per pazienti TeC con mutazione di TP53 basate sull'utilizzo di anti-miR più radioterapia da sola o con Cetuximab ed abbiamo dimostrato l'efficacia dei nuovi trattamenti in vitro ed in vivo.
8. Abbiamo cominciato incontri inter-istituzionali per integrare il PDTA regionale con l'indicazione di specifiche analisi molecolari prognostiche e/o predittive di risposta alla terapia clinicamente utili.

Obiettivi intermedi raggiunti (Relazione intermedia)

Descrivere come sono stati raggiunti gli obiettivi intermedi

1. Terminare l'arruolamento dei pazienti nello studio retrospettivo

Abbiamo inserito in un database CRO 154 pazienti con un incremento di 54 pazienti rispetto ai 100 inizialmente ipotizzati

2. Completare la raccolta dei preparati istologici e loro revisione patologica

Abbiamo raccolto presso la Biobanca del CRO in Oncologia Molecolare i campioni dei 154 pazienti inseriti nel database. La revisione patologica è in corso

3. Preparare una CRF (Case Report Form) per la valutazione clinica dei pazienti inseriti nello studio

Abbiamo preparato un CRF in formato Excel per la valutazione clinica dei pazienti da inserire nello studio prospettico

4. Formulare database condiviso con le notizie necessarie ad un follow up ottimale dei pazienti

Il database condiviso fra le varie strutture della Regione deve ancora essere definito

5. Definire e validare un pannello NGS *home made* per la valutazione di mutazioni *Hot Spot* in 10 geni selezionati

Con studi di letteratura aggiornati abbiamo identificato 15 geni più frequentemente mutati nei tumori della testa e del collo. Questi sono i geni TP53, CASP8, FAT1, HRAS, NOTCH1, PIK3CA, FBXW7, CDKN2A, PTEN, AKT1, AJUBA, NSD1, KMT2D, KMT2C e KMT2B. Abbiamo sequenziato DNA tumorale estratto da campioni di 93 pazienti con tumore Testa Collo. Analisi di Bioinformatica sono in corso per valutare la frequenza delle mutazioni riscontrate.

6. Scrivere e presentare al comitato etico regionale un protocollo clinico traslazionale per l'arruolamento prospettico di pazienti TeC

È stato stilato un PDTA regionale condiviso per il trattamento dei tumori della testa e del collo. Stiamo scrivendo un protocollo clinico-

traslazionale che sarà presentato al CEUR appena le attività al punto 4 e 5 saranno completate.

7. Valutare l'espressione di TP53 e lo stato di attivazione di geni regolati da mutp53 in cellule di TeC trattate con statine e/o altri inibitori della sintesi del colesterolo

Metodiche e condizioni sperimentali sono state definite in via preliminare utilizzando linee di tumore della mammella

8. Valutare la sopravvivenza di cellule TeC trattate con statine e/o altri inibitori della sintesi del colesterolo

Metodiche e condizioni sperimentali sono state definite in via preliminare utilizzando linee di tumore della mammella

Risultati raggiunti nello stadio intermedio/finale di avanzamento progettuale, indicatori e fonti di verifica

Obiettivo Specifico	Risultato Raggiunto	Indicatore di valutazione	Fonte di Verifica
1. Generare un database retrospettivo	Abbiamo generato un database CRO che ad oggi include 154 pazienti di cui si conosce la storia clinica	Numero di pazienti inseriti = 154. Numero di pazienti attesi = 100	Data base CRO in Oncologia Molecolare, Radioterapia e Epidemiologia. Abstract presentato al AACR Annual Meeting 2019 che si è tenuto ad Atlanta (USA) dal 29/03 al 03/04/2019. (Citron et al. miR-9 expression regulates and predicts the response to EGFR inhibitors in Head & Neck Squamous Cell Carcinoma) Manoscritto pubblicato (Citron et al. EMBO Mol Med. 2021 Jun 1:e12872. doi: 10.15252/emmm.202012872.).
2. Completare la raccolta dei preparati istologici e loro revisione	Abbiamo raccolto i campioni di tutti i pazienti inseriti nel database	Numero di campioni raccolti = 154.	Data base CRO in Oncologia Molecolare Manoscritto in preparazione
3. Definire lo spettro di mutazioni hot spot in pazienti TeC arruolati nello studio	Abbiamo valutato la presenza di mutazioni in 15 geni selezionati	Sequenziati i campioni di DNA Tumorale provenienti da 154 pazienti con tumore Testa Collo per la presenza di mutazioni nei geni TP53, CASP8, FAT1, HRAS, NOTCH1, PIK3CA, FBXW7, CDKN2A, PTEN, AKT1, AJUBA, NSD1, KMT2D, KMT2C e KMT2B	Data base CRO in Oncologia Molecolare Manoscritto in preparazione
4. Pianificare l'arruolamento in un protocollo prospettico	Il protocollo è stato presentato ed approvato dal	Approvazione del Comitato Etico Unico Regionale	Studio CRO-2019-13 Approvazione CEUR Prot. 0009712/P/GEN/ARCS del 02/04/2019

	Comitato Etico Unico Regionale		
5. Valutare l'associazione fra presenza di mutazioni e risposta a specifici trattamenti	Abbiamo Valutato l'associazione fra l'espressione del miR-9 e la risposta a Radioterapia, Chemioterapia con Platino e terapia bersaglio specifica con Cetuximab	Abbiamo valutato 34 pazienti trattati con Cetuximab in Friuli e 147 inclusi nel database TCGA	Database CRO presso SOC Oncologia Molecolare e Epidemiologia. Poster presentato a Annual Meeting dell'SIC (Società Italiana Cancerologia) Poster presentato a Annual Meeting dell'AACR (American Association for Cancer Research) Manoscritto pubblicato (Citron et al. EMBO Mol Med. 2021 Jun 1:e12872. doi: 10.15252/emmm.202012872.).
6. Valutare l'effetto del trattamento con statine sulla risposta a terapie antitumorali	Abbiamo valutato l'effetto di statine in modelli derivati da pazienti	Numero di modelli preparati/testati	Manoscritto pubblicato (Campaner et al. Cancers (Basel). 2020 Dec 21;12(12):3869. doi: 10.3390/cancers12123869).
7. Valutare l'espressione di TP53 in cellule di TeC trattate	Esperimenti effettuati	Abbiamo valutato l'espressione di TP53 in cellule di TeC ed abbiamo modificato l'espressione di TP53 in alcune di queste linee cellulari	Database CRO presso SOC Oncologia Molecolare. Dati non ancora pubblicati
8. Valutare la sopravvivenza di cellule TeC trattate con statine e/o altri inibitori della sintesi del colesterolo	Studi preliminari di messa a punto in linee modello in presenza o assenza di statine	Valutazione della resistenza a farmaci chemioterapici standard e a farmaci che inducono i) danno al DNA; ii) stress del reticolo endoplasmatico, iii) stress ossidativo.	Database LNCIB dei risultati sperimentali. Manoscritto pubblicato (Campaner et al. Cancers (Basel). 2020 Dec 21;12(12):3869. doi: 10.3390/cancers12123869 e Capaci et al. Nat Commun. 2020 Aug 7;11(1):3945. doi: 10.1038/s41467-020-17596-5).
9. Disegnare nuove combinazioni terapeutiche	Abbiamo dimostrato che l'inibitore di miR-9 potenzia l'attività di Radioterapia e terapia bersaglio specifica con Cetuximab	Abbiamo Valutato l'effetto dell'inibitore di miR-9 da solo o associato a Radioterapia, Chemioterapia con Platino e terapia bersaglio specifica con Cetuximab	Database CRO presso SOC Oncologia Molecolare Manoscritto pubblicato (Citron et al. EMBO Mol Med. 2021 Jun 1:e12872. doi: 10.15252/emmm.202012872.).

10. Integrare il PDTA regionale	E' stato stilato un PDTA regionale	Abbiamo definito le mutazioni hot spot da analizzare nei pazienti con TeC del FVG.	Database CRO presso SOC Oncologia Molecolare Manoscritto in preparazione
---------------------------------	------------------------------------	--	---

Quadro delle attività svolte (dal tempo zero a fine progetto)

Descrivere sinteticamente i contenuti delle attività progettuali svolte, indicando la durata ed i soggetti coinvolti nell'implementazione					
Fase progettuale	Data prevista di inizio	Data prevista di fine	Attività svolta	Eventuali criticità riscontrate	Soggetti coinvolti nella fase progettuale
I Generare un database retrospettivo selezionando i pazienti trattati TeC presso CRO ASUI Trieste e ASUI Udine.	01.02.2018	01.07.2018	Abbiamo generato un database CRO che ad oggi include 154 pazienti di cui si conosce la storia clinica		Soggetto beneficiario: CRO, Gruppo Testa Collo Dr. Franchin Partners: Università Trieste ORL Prof. Tirelli ASUI Udine UO ORL Dr. Piemonte ASS5 Pordenone UO ORL Dr. Giacomarra
II Completare la raccolta dei preparati istologici e loro revisione	01.02.2018	31.01.2019	Abbiamo raccolto i campioni di tutti i pazienti inseriti nel database		Soggetto beneficiario: CRO, Gruppo Testa Collo Dr. Franchin Partners: Università Trieste ORL Prof. Tirelli ASUI Udine UO ORL Dr. Piemonte ASS5 Pordenone UO ORL Dr. Giacomarra
III Disegno di un protocollo clinico -molecolare prospettico	01.02.2018	31.01.2019	Abbiamo definito un PDTA Regionale che deve essere integrato con i dati molecolari ed identificato le mutazioni hot spot		Soggetto beneficiario: CRO, Gruppo Testa Collo Dr. Franchin Partners: Università Trieste ORL Prof. Tirelli ASUI Udine UO ORL Dr. Piemonte ASS5 Pordenone UO ORL Dr. Giacomarra
IV Definire lo spettro di mutazioni hot spot in pazienti TeC arruolati negli studi retrospettivo e prospettico	01.02.2018	31.01.2020	Abbiamo sequenziato 15 geni in 154 campioni di tumore TeC		Soggetto beneficiario: CRO, Oncologia Molecolare Dr. Baldassarre
V Valutare la risposta a terapie combinate con inibitori della	01.02.2018	31.01.2020	Abbiamo condotto studi preliminari di messa a punto delle possibili		Soggetto beneficiario: CRO, Oncologia Molecolare Dr. Baldassarre

via del colesterolo e trattamenti in uso nei pazienti TeC			combinazioni di farmaci e delle condizioni sperimentali	Partner: CIB Prof. Del Sal
VI Integrare il PDTA regionale	01.03.2019	31.01.2020	Abbiamo stilato un PDTA regionale che potrà essere integrato con dati molecolari	Soggetto beneficiario: CRO, Gruppo Testa Collo Dr. Franchin CRO, Oncologia Molecolare Dr. Baldassarre Partners: Università Trieste ORL Prof. Tirelli ASUI Udine UO ORL Dr. Piemonte ASS5 Pordenone UO ORL Dr. Giacomarra

Diffusione dei Risultati, trasferimento delle conoscenze

Descrivere come la ricerca è stata divulgata e con quali mezzi
 Compilare la parte sottostante non superando i 2000 caratteri

Abbiamo preparato un Poster che descrive la ricerca che è stato esposto all'ingresso dell'Istituto ed è anche scaricabile dal sito del CRO all'indirizzo:
<https://www.cro.it/export/sites/cro/it/ricercatori/documenti/PerMiD.pdf>

ASS5 Pordenone UO ORL Dr. Giacomarra e CRO, Gruppo Testa Collo Dr. Franchin hanno organizzato un congresso dal titolo "ASPETTI INNOVATIVI NELLA GESTIONE MULTIDISCIPLINARE DEL CARCINOMA SQUAMOSO DELL'OROFARINGE" che si è tenuto presso il Campus del Centro di Riferimento Oncologico di Aviano il 9 Marzo 2019 e in cui sono stati presentati il progetto ed i progressi ottenuti (Vedi slides allegate).

Abbiamo presentato un poster al meeting annuale dell'associazione italiana per la ricerca sul cancro (SIC) che si è tenuto ad ottobre 2018 a Milano
 Abbiamo sottomesso un poster al meeting annuale dell'associazione americana per la ricerca sul cancro (AACR) che si è tenuto ad Aprile 2019 ad Atlanta (USA)
 Abbiamo pubblicato tre lavori scientifici che riportano parte dei dati ottenuti finora (Citron et al. EMBO Mol Med. 2021 Jun 1:e12872. doi: 10.15252/emmm.202012872; Campaner et al. Cancers (Basel). 2020 Dec 21;12(12):3869. doi: 10.3390/cancers12123869; Capaci et al. Nat Commun. 2020 Aug 7;11(1):3945. doi: 10.1038/s41467-020-17596-5).

Il lavoro di Citron et al. è stato pubblicizzato sul sito del CRO alla pagina: <https://www.cro.it/it/news/2021/marcatore-tumori-testa-collo.html>
 Inoltre è stato pubblicizzato via Twitter: <https://twitter.com/CroAviano/status/1404708020697894913> e <https://twitter.com/gusbald/status/1402973607081431043>
 E via Facebook https://m.facebook.com/story.php?story_fbid=2261991077266710&id=358431844289319
 Il PDTA Regionale è stato presentato in una giornata di presentazione dedicata intitolata "LA GESTIONE DEI TUMORI TESTA COLLO IN REGIONE FRIULI VENEZIA GIULIA" che si è tenuta a Palazzo della Regione, Udine il 18 settembre 2018.

Trasferibilità dei risultati e sostenibilità (SOLO relazione finale)

Descrivere come i risultati siano trasferibili e le caratteristiche di sostenibilità del progetto

Trasferibilità

I risultati raggiunti sono potenzialmente trasferibili come segue:

L'identificazione di un biomarcatore predittivo di attività per la terapia con Cetuximab + Radioterapia può essere trasferito alla pratica clinica per una personalizzazione delle cure dei pazienti con tumori TeC facendo così risparmiare tossicità inutili ai pazienti e risorse al sistema sanitario regionale.

L'identificazione di mutazioni Hot Spot dei pazienti con tumori TeC può essere trasferita alla pratica clinica includendo la valutazione di selezionate alterazioni prognostiche e/o predittive nei percorsi diagnostici dei pazienti per un migliore caratterizzazione biomolecolare della malattia che si può tradurre in un miglioramento delle cure.

L'identificazione di nuovi schemi terapeutici per i pazienti con tumori che hanno mutazioni del gene TP53 potrebbero essere facilmente trasferite alla pratica clinica visto che si basano sull'uso di farmaci in uso per altre patologie (e.g. statine).

Sostenibilità e Valorizzazione.

Da un punto di vista di sostenibilità del trasferimento alla clinica dalle osservazioni fatte prevediamo che l'introduzione di un nuovo biomarcatore sia sostenibile economicamente visto che la sua valutazione si basa sull'utilizzo di una tecnica a basso costo (i.e. Droplet Digital PCR) e quindi inciderebbe sui costi di gestione dei pazienti in maniera complessivamente positiva evitando l'utilizzo di terapie inefficaci.

Per quanto riguarda l'introduzione di mutazioni Hot Spot nel percorso diagnostico dei tumori TeC anche in questo caso i costi del sequenziamento NGS inciderebbero in maniera positiva sulla gestione clinica dei pazienti affinando la prognosi e permettendo il trattamento con molecole a bersaglio specifico.

I risultati ottenuti in questo progetto potranno essere ulteriormente valorizzati come segue:

Pensiamo di applicare a bandi di ricerca di Alleanza Contro il Cancro / Ministero della Salute per validare in studi successivi il ruolo dei nostri biomarcatori usando casistiche indipendenti.

Inoltre pensiamo di applicare a grant di ricerca europei nell'ambito del programma Horizon 2021-2027 Conquer Cancer per sviluppare nuovi approcci terapeutici per i pazienti con tumori TeC che abbiamo definiti spettri mutazionali.