

Protocollo Studio Osservazionale

Gruppo Cooperativo Meet-Uro
(codice progressivo studio: 08)



Titolo dello studio	Studio traslazionale volto ad indagare fattori predittivi di risposta in pazienti affetti da carcinoma renale metastatico (mRCC) trattati con Nivolumab (studio I-RENE)
Razionale	<p>Nivolumab, un inibitore del checkpoint immunitario PD-1, ha dimostrato di conferire un beneficio clinico significativo, in termini di sopravvivenza, nei pazienti con carcinoma renale metastatico a fallimento di una precedente linea terapeutica con un agente anti-VEGF. Lo studio di confronto (Checkmate 025) ha documentato un incremento di sopravvivenza per i pazienti che ricevevano Nivolumab rispetto ai pazienti trattati con everolimus; tale studio ha portato alla registrazione del farmaco come trattamento di scelta dopo fallimento di una precedente terapia con inibitore tirosinchinasico.</p> <p>Tuttavia, circa 35% dei pazienti mostra una resistenza primaria a nivolumab e ad oggi non vi sono criteri clinici né molecolari che si siano dimostrati predittivi in termini positivi o negativi per l'efficacia del farmaco. Esistono dati contrastanti riguardo al ruolo dell'espressione di PDL1 quale unico possibile fattore predittivo di risposta ma non sono ad oggi validati e sono significativi solo nei pazienti che ricevono un trattamento immunoterapico combinato in prima linea (<u>studio Checkmate014, studio IMMotion151</u>)</p> <p>Sulla base delle evidenze derivanti dal tumore uroteliale, in cui è stato evidenziato come caratteristiche genomiche ed immunologiche contribuiscano alla risposta agli inibitori dei checkpoint immunitari, nonché sulla base della grande eterogeneità del tumore renale, ipotizziamo un possibile ruolo del carico mutazionale tumorale, dell'infiltrazione intra-tumorale dei linfociti T, delle cellule immunitarie circolanti e del profilo dei microRNA nella differenziazione dei pazienti con carcinoma renale metastatico che rispondono al trattamento con nivolumab rispetto a coloro che non rispondono.</p> <p>Oltre il 60% dei carcinomi renali a cellule chiare presentano mutazioni somatiche o alterazioni epigenetiche del gene VHL che correlano positivamente con l'espressione di PD-L1. Altri geni mutati nel carcinoma renale a cellule chiare (tutti coinvolti nella regolazione della cromatina) sono PBRM1, SETD2, KDM5C e BAP1 che rivestono al momento un ruolo prognostico. Anche alcuni geni della via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR sono frequentemente mutati nel carcinoma renale a cellule chiare. Inoltre, le analisi di espressione genica e dei miRNA circolanti ha permesso di identificare 4 sottogruppi di carcinoma renale a cellule chiare (m1-m4 e mi1-mi4) con prognosi differente. Tuttavia il loro ruolo predittivo non è stato ancora definito.</p> <p>A livello genomico, il carico mutazionale tumorale è risultato essere correlato alle risposte cliniche a farmaci anti-PD1 nel NSCLC, ma è ancora incerto come nel tumore del rene questo possa influenzare la risposta a nivolumab. Dall'altro</p>

	<p>lato, l'estensione dell'infiltrato di linfociti T intra-tumorali pre-trattamento e indotto dai trattamenti correla con la risposta a farmaci anti-PD1 nel melanoma, ma non è noto se ciò valga anche per il carcinoma renale.</p> <p>Ad oggi non esistono pertanto fattori predittivi di risposta né di resistenza per quanto riguarda il trattamento con inibitori degli immunocheckpoints nei pazienti affetti da carcinoma renale metastatico.</p> <p>Bibliografia</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Motzer, RJ et al. N Engl J Med. 2015 Nov 5; 373(19):1803-13 2) Rizvi, NA et al. Science. 2015 Apr 3; 348(6230):124-8 3) Cancer Genome Atlas Research Network. Nature. 2013 Jul 4; 499(7456):43-9 4) Messai, Y et al. Eur Urol. 2015 Dec 17. pii: S0302-2838(15)01200-2 5) Hakimi, AA et al. Clin Cancer Res. 2013 Jun 15; 19(12):3259-67 6) Peña-Llopis, S et al. Nat Genet. 2012 Jun 10; 44(7):751-9 7) Brooks, SA et al. Eur Urol. 2014 Jul; 66(1):77-84 8) Tumei, PC et al. Nature. 2014 Nov 27; 515(7528):568-71 9) Rosenberg, E. Lancet. 2016 Mar 4; 387:1909-20 10) Gerlinger, M et al. Nat Genet. 2014 Mar; 46(3):225-33 11) Filipazzi, P et al. J Clin Oncol. 2007 Jun 20; 25(18):2546-53 12) Walter, S et al. Nat Med. 2012 Aug; 18(8):1254-61 13) Verderio, P et al. Anal Biochem. 2014 Sep 15; 461:7-9 14) Verderio, P et al. Br J Cancer. 2016 Jun 28; 115(1) 15) Hugo, W et al. Cell. 2016 Mar 24; 165(1):35-44 16) Zhou, L et al. Oncogene. 2016 May; 35(21):2687-97 17) Gabrilovich, DI et al. Nat Rev Immunol. 2012 Mar 22; 12(4):253-68 18) Geissler, K et al. Oncoimmunology. 2015 Feb 3; 4(1):e985082 19) Gebhardt, C et al. Clin Cancer Res. 2015 Dec 15; 21(24):5453-9 20) Hammers HJ et al. J Clin Oncol. 2017 Dec 1; 35(34):3851-3858
<p>Obiettivi e Rilevanza clinica</p>	<p>Obiettivi principali:</p> <p>Obiettivo 1: Indagare il ruolo predittivo dei miRNA circolanti in pazienti che rispondono a nivolumab rispetto a coloro che non rispondono, prima del trattamento, dopo due infusioni (4 settimane), alla prima rivalutazione radiologica (12 settimane) ed al momento della progressione di malattia.</p> <p>Obiettivo 2: Valutare se il profilo immunologico del tessuto tumorale o delle cellule tumorali circolanti possa essere un potenziale marcatore predittivo di risposta clinica nei pazienti trattati con nivolumab.</p> <p>Obiettivo 3: Caratterizzare le alterazioni nei geni e nelle vie di trasmissione del segnale e identificare differenze di carico mutazionale tra tumori di pazienti con carcinoma renale metastatico che rispondono o meno a nivolumab.</p>

Endpoints e metodologia degli obiettivi principali:

Obiettivo sperimentale 1:

I miRNA circolanti associati con la risposta a nivolumab verranno studiati con tecnologia OpenArray (OA, Thermo Fisher) in campioni di plasma di 60 pazienti raccolti utilizzando un protocollo di doppia centrifugazione al fine di minimizzare l'emolisi (che può alterare il profilo dei miRNA circolanti). Inizialmente l'espressione dei miRNA sarà valutata in campioni di plasma raccolti prima del trattamento e correlata con la risposta. Sarà inoltre analizzato allo stesso tempo (prelievo basale), come braccio di controllo, un campione di plasma raccolto da un gruppo di 30 pazienti trattati con TKI. Al fine di identificare miRNA predittivi sarà condotta un'analisi esplorativa durante il trattamento: dopo due infusioni di nivolumab (4 settimane), alla prima rivalutazione radiologica (12 settimane) ed al momento della progressione di malattia, per permettere l'identificazione di miRNA che possano riflettere la risposta tumorale. I miRNA che risultano modulati alla progressione di malattia potrebbero risultare modulati in momenti precedenti, rappresentando quindi potenziali marcatori di monitoraggio della malattia in grado di anticiparne l'esito. L'RNA verrà estratto dal plasma utilizzando il kit miRNeasy e l'RNA del batteriofago MS2 come "carrier". L'espressione di un miRNA esogeno aggiunto al campione di plasma prima dell'estrazione ("spike-in") e il numero di miRNA rilevati in ciascun campione analizzato verranno utilizzati come criterio di filtraggio dei dati. La migliore combinazione dei miRNA di riferimento per la normalizzazione dei dati sarà identificata attraverso un algoritmo NqA.

Per identificare il miglior sottogruppo di miRNA da combinare in "signatures" verranno analizzate strategie di regressione "penalizzata". Infine, sarà sviluppato un algoritmo ad hoc per predire la risposta.

Obiettivo sperimentale 2:

I linfociti T attivati/esausti che esprimono PD-1 e l'espressione del ligando PD-L1 nelle cellule tumorali o nello stroma sono associati alla risposta clinica al blocco di PD-1. Le lesioni tumorali che presentano una iperespressione di geni coinvolti nella chemiotassi delle cellule infiammatorie, nell'angiogenesi, nella cicatrizzazione, nella transizione mesenchimale e nel rimodellamento della matrice extracellulare, sono resistenti a inibitori dei check-points immunitari e agli inibitori tirosin-chinasici (TKIs). I principali mediatori di questo effetto immunosoppressivo sono le cellule infiammatorie di origine mieloide, reclutate nel sito tumorale dalla stimolazione cronica del sistema immunitario che contribuisce a creare un terreno ostile per i linfociti T infiltranti. Le cellule mieloidi all'interno dello stroma rappresentano un fattore prognostico negativo in numerosi tipi di tumore, incluso il carcinoma renale. L'obiettivo è analizzare l'infiltrato immunitario in campioni tumorali paraffinati al basale da 60 pazienti con CRM trattati con nivolumab rispetto al braccio di controllo. Usando Multiplexed Biomarker Imaging (MBI), caratterizzeremo le lesioni tumorali in base alla frequenza dei linfociti T, insieme alle cellule mieloidi e cellule tumorali associate alla transizione mesenchimale. I dati riguardanti il fenotipo immunitario delle cellule tumorali sarà correlato con la risposta clinica, al fine di valutare il possibile valore predittivo. La frequenza delle cellule mieloidi, rilevate da esami ematici o quantificate tramite immunofluorescenza come MDSC, sembrano essere un marcatore predittivo di resistenza agli inibitori dei check-point immunitari nei pazienti affetti da melanoma. A tale scopo, verranno raccolti campioni ematici al basale per ogni paziente. La citofluorimetria

multiparametrica valuterà la frequenza e le caratteristiche funzionali del sottogruppo di cellule mieloidi circolanti, insieme alle sottopopolazioni di linfociti T. I risultati saranno incrociati con i dati clinici in termini di tasso di risposte, per valutare il ruolo predittivo del profilo delle cellule immunitarie durante il trattamento (week 4, week 12 (prima rivalutazione radiologica) e alla progressione di malattia), con lo scopo di identificare marcatori precoci di risposta, o profili di cellule immunitarie associate a signature di miRNA evidenziati nell'obiettivo 1. Saranno inoltre analizzati campioni tumorali paraffinati di carcinoma renale di tutti i pazienti inclusi nello studio per valutare l'espressione di marcatori immunitari linfocitari (CD3, 4, 8, 25, PD-1, FoxP3, CXCR3, CCR6), mieloidi (CD14, 15, 33, HLA-DR, PD-L1, STAT3) e per i marcatori mesenchimali AXL e MET tramite immunistochimica. Sarà anche quantificato PD-L1 tramite il test validato DAKO. L'algoritmo inForm fornirà la lettura dei risultati. I dati saranno incrociati con le risposte cliniche per eventuali correlazioni nell'analisi univariata e multivariata. Sarà inoltre effettuato un incrocio con i pathway d'espressione di geni immuno-relati specifici per i diversi sottogruppi di cellule immunitarie infiltranti. Tramite citofluorimetria a 10 colori saranno analizzate le cellule mononucleate periferiche (PBMC) al basale ed in differenti momenti del trattamento con inibitori del checkpoint immunitario per quantificare differenti sottogruppi di cellule. I dati al basale saranno correlati con le risposte, tramite un metodo Adaptive Index Model, basato su un modello di dati di sopravvivenza a rischio proporzionale.

Obiettivo sperimentale 3:

Per individuare mutazioni somatiche non sinonime (nsSMs) e inserzioni/delezioni nelle regioni codificanti, verrà effettuata un'analisi di sequenziamento esomico (Next Generation Sequencing, NGS) sul tumore e sul tessuto normale al basale, in entrambi i bracci dello studio. I diversi geni mutati tra pazienti che rispondono e quelli che non rispondono saranno associati a funzioni o vie di trasmissione del segnale note mediante il database "Molecular Signatures". Eventuali geni mutati in maniera significativamente differente nei due gruppi saranno confermati, nel campione di origine o in una analoga casistica di validazione, impiegando tecnologie alternative quali sequenziamento Sanger o analisi NGS dei gruppi di geni più interessanti.

I dati clinici ritenuti necessari verranno raccolti attraverso la compilazione di un apposito database informatico.

Analisi statistica e metodi

Poiché lo studio è osservazionale, solo i pazienti senza alcuna violazione dei maggiori criteri di eleggibilità saranno inclusi nell'analisi statistica dello studio. L'analisi primaria dello studio sarà suddivisa in 2 fasi. Nella prima fase gruppi di biomarcatori strettamente correlati alla baseline verranno identificati tramite tecniche di clusterizzazione (i.e. la procedura PROC VARCLUS del SAS software verrà applicata). Per meglio comprendere i meccanismi biologici, la clusterizzazione verrà applicata separatamente per tipo biologico di marcatori identificati tramite Next Generation Sequencing (i.e. espressione di miRNA circolante e parametri immunologici). Ciascun cluster sarà riassunto da uno score. Lo score sarà utilizzato per rilevare l'associazione statistica tra il cluster e la risposta immunitaria (irRC) nei pazienti trattati con Nivolumab. Il modello di regressione logistica sarà utilizzato per rilevare tale associazione. Un p-value a due code di 0.05 sarà utilizzato per rilevare l'associazione statistica e screenare i cluster di marcatori interessanti. Poiché questo studio è esplorativo, nessuna correzione per molteplicità di test statistici svolti sarà applicata. Se un cluster

statisticamente interessante di biomarcatori conterrà un numero elevato di singoli biomarcatori, esso sarà semplificato nel seguente modo: lo score del cluster verrà predetto da un sottoinsieme dei biomarcatori che lo definiscono usando una regressione lineare o un modello di regressione non parametrica quale CART, implementato nell' R software package "rpart". Lo score del cluster ottenuto dal sottogruppo dei biomarcatori selezionati verrà ricalcolato e introdotto nel modello di regressione per confermare l'associazione statistica. La definizione del cluster semplificato e del suo score avverrà 'in cieco' rispetto alla valutazione dell'associazione statistica con l'outcome (i.e. irRC). Per ogni cluster interessante da un punto di vista statistico, oltre ad una sua semplificazione, verranno individuati i singoli biomarcatori più rappresentativi tramite matrice di correlazione intra-tra clusters e la loro associazione statistica sarà rilevata. Di nuovo, la scelta dei singoli biomarcatori interessanti sarà effettuata 'in cieco' rispetto alla valutazione della loro associazione statistica con l'outcome (i.e. irRC). Nella seconda fase dell'analisi primaria l'interazione della risposta al trattamento con Nivolumab verrà testata e stimata in un modello di regressione multivariato a cui contribuiranno anche i pazienti del gruppo di controllo non trattati con Nivolumab.

Come analisi secondaria, modelli lineari generalizzati verranno usati per stimare il rischio di progressione di malattia sulla base dei valori tempo-dipendenti dei biomarcatori e cluster individuati alla baseline. Il comportamento di altri endpoints (i.e. PFS, OS) saranno valutati rispetto ai cluster e singoli marcatori identificati nell'analisi primaria. Statistiche non parametriche (i.e. frequenze assolute e relative per variabili categoriche e mediana, range interquartile e min-max per variabili continue) saranno usate per descrivere le caratteristiche alla baseline dei pazienti analizzati e dei trattamenti somministrati.

Rilevanza clinica

Lo studio proposto favorirà la nostra conoscenza del valore predittivo di alcuni marcatori, valutando se i geni e le signatures immunologiche sono associate a risposta o resistenza in pazienti con carcinoma renale trattati con nivolumab. La ricerca proposta è innovativa perché fattori tissutali e circolanti potrebbero rappresentare una signature paziente-specifica in grado di orientare verso un trattamento personalizzato. Queste analisi descriveranno un legame esistente tra la risposta all'inibizione di PD-1 ed uno specifico sottotipo di carcinoma renale così come un fenotipo immunologico associato ad ogni sottotipo.

L'identificazione di fattori predittivi molecolari di risposta permetterebbe di massimizzare gli outcomes delle terapie con inibitori del checkpoint immunitario PD-1, al fine di trattare soltanto quei pazienti che realmente ne possono beneficiare. Questo potrebbe permettere:

- 1) di risparmiare (evitando di spendere risorse per i pazienti che non hanno possibilità di risposta)
- 2) di adattare il trattamento ad ogni singolo paziente in base a caratteristiche biologiche proprie del tumore;
- 3) di creare nuovi algoritmi e modelli predittivi per poter scegliere accuratamente tra i farmaci disponibili per i pazienti con mRCC che sviluppano resistenza al trattamento di prima linea con TKIs.

Lo sviluppo di metodi non invasivi per diagnosticare e monitorare i tumori rappresenta ancora una grande sfida. I marcatori tumorali circolanti rappresentano surrogati real-time non invasivi dei marcatori tissutali per la prognosi, la risposta al trattamento o il monitoraggio della resistenza e rappresentano anche uno strumento per valutare e superare l'eterogeneità intratumorale.

<p>Popolazione in studio</p>	<p><u>Criteri di Inclusione principali:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Consenso informato scritto • Carcinoma renale metastatico (a cellule chiare/non cellule a cellule chiare) • Progressione a precedente trattamento con Inibitori tirosinchinasici • Pazienti candidati a terapia di II linea con Nivolumab (o inibitori tirosinchinasici-nel braccio di controllo)
<p>Periodo di osservazione</p>	<p>I pazienti che decideranno di prendere parte a questo studio verranno seguiti come da normale pratica clinica in relazione alla loro patologia e alla migliore scelta terapeutica proponibile per la loro condizione clinica. Non sono previste visite o esami strumentali aggiuntivi per lo studio stesso. La partecipazione a questo studio non influenzerà le decisioni sulle specifiche procedure diagnostiche e/o terapeutiche a cui sottoporre i pazienti.</p> <p>Nei casi eleggibili, <u>previa acquisizione del consenso informato verranno raccolti:</u></p> <p>- campioni ematici (timepoints previsti: prima dell'inizio della cura/settimana 4/mese 3 o comunque in concomitanza alla prima rivalutazione strumentale di malattia/alla fine del trattamento per progressione)</p> <p>I campioni ematici saranno raccolti in forma di sangue venoso periferico, plasma e siero saranno ottenuti utilizzando un'aliquota aggiuntiva di sangue prelevate in occasione delle normali visite previste da pratica clinica.</p> <p>Sara prelevato un totale di 32.5 ml di sangue per ogni timepoint.</p> <p>I prelievi saranno eseguiti al centro prelievi o in sala terapia e successivamente processati e stoccati presso il laboratorio di farmacologia dell'Oncologia Medica 1 e presso le Unità coinvolte nel progetto (SS. Immunoterapia dei Tumori Umani-S.C. Farmacologia Molecolare)</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Prelievi per analisi miRNA (plasma):</u> <ul style="list-style-type: none"> - 1 provetta da 10 ml di sangue intero (provetta con tappo viola – BD Vacuteiner K2E (EDTA), prima centrifugata a 1250g per 10 minuti a 4°C, recupero del surnatante (plasma) che viene messo in una provetta Falcon e centrifugato nuovamente a 1250g per 10 minuti a 4°C. Si separa il surnatante (plasma) e lo si conserva in provetta Nalgene a -80°C fino al momento della processazione. • <u>Prelievi per profilo immunologico (PLASMA e PBMC):</u> <ul style="list-style-type: none"> - 2 provette da 10 ml (Vacutainer tappo viola con EDTA) - 1provetta Tube PAXgene Blood da 2.5 ml

	<p>- campioni di tessuto tumorale e tessuto sano adiacente di controllo (già prelevati in passato per la diagnosi o la terapia; al paziente non verrà chiesto di sottoporsi ad ulteriori biopsie)</p> <p><u>I campioni tissutali tumorali</u> (biopsie e/o pezzo operatorio del tumore primitivo o metastasi) già archiviati secondo comune pratica clinica nella forma di inclusi in paraffina (Formalin-fixed, paraffin Embedded, FFPE) saranno raccolti e saranno verificate adeguatezze e conservazione.</p> <p>Tutti i campioni, sia del centro coordinatore (INT) che dei centri satelliti verranno raccolti e analizzati presso l'Istituto Nazionale dei Tumori, dopo essere stati resi anonimi e consegnati ai laboratori deputati ad eseguire le analisi centralizzate previste dal protocollo (Dipartimento di Anatomia Patologica e Dipartimento di Ricerca Applicata e Sviluppo Tecnologico)</p> <p><u>Tempo previsto per l'arruolamento</u>: 24 mesi + 12 mesi di follow up</p> <p><u>Durata dello studio</u>: 36 mesi</p> <p>Per la parte retrospettiva dello studio verranno considerati includibili i pazienti trattati con Nivolumab o TKis dal 1 Novembre 2015 al 1 maggio 2018.</p>
<p>Dimensione del Campione</p>	<p>Il numero totale dei pazienti previsti è: 60 pazienti Braccio di controllo: 30 pazienti</p> <p>Assumendo un tasso di risposta, tra il 40% e il 60%, secondo criteri immuno-RECIST (irRR) per farmaci immunoterapici, 52 pazienti trattati con Nivolumab sono necessari per rilevare, tramite likelihood ratio test a due code al 5%, un incremento standardizzato di 0.8 (i.e. incremento di 0.8 su scala logaritmica della percentuale di risposta per deviazione standard dello score del cluster) con una potenza dell'80%. Siamo confidenti che i dati mancanti relativi allo score del cluster saranno limitati al più a 10% dei pazienti arruolati. Da cui il numero totale di pazienti da arruolare raggiunge la numerosità di 60 pazienti. Per valutare, in maniera del tutto esplorativa, il ruolo dei cluster o dei singoli marcatori che predicono l'effetto di Nivolumab, un gruppo di controllo di circa 30-35 pazienti consecutivi saranno arruolati. Il rapporto 2:1 tra trattati e controlli è stato definito in via pragmatica, al fine di rendere fattibile l'arruolamento dello studio nei tempi attesi da protocollo.</p> <p>Partecipano allo studio 9 centri (di cui si allega elenco)</p>
<p>Consenso Informato</p>	<p>I pazienti firmeranno un consenso informato scritto prima di essere sottoposti a qualunque procedura da studio (prelievi ematici).</p> <p>Nell'impossibilità di chiedere il consenso al trattamento dei dati ai pazienti inseriti in maniera retrospettiva, per motivi etico-amministrativi, lo studio rientra nell'ambito di applicazione e nelle finalità specificate dal Garante per la</p>

	Protezione dei Dati Personali (Autorizzazione generale al trattamento dei dati personali effettuato per scopi di ricerca scientifica e Autorizzazione generale al trattamento dei dati genetici – 15 dicembre 2016 - Gazzetta Ufficiale n. 303 del 29 dicembre 2016)
--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------