



Espressione di ABCB1/P-glycoprotein come fattore per la stratificazione biologica dell'osteosarcoma non metastatico delle estremità: Studio prospettico. (ISG/OS-2)

Codice EUDRACT: 2011-001659-36

Clinical Trial GOV: NCT01459484

Sponsor:

Italian Sarcoma Group

c/o Studio Commercialisti

Via Farini 31, 40124 Bologna

ISG/OS-2 Emendamento 1.1: Versione 16 Gennaio 2019

con il supporto di:

Alleanza Contro il Cancro, PROGRAMMA 2 "INTEGRAZIONE DELLE ATTIVITÀ DI RICERCA ATTRAVERSO LA COSTRUZIONE DI STRUTTURE E RETI DI COLLABORAZIONE INTERISTITUZIONALI" PROGETTO: 1.9 Rete Nazionale per la cura e la ricerca dei sarcomi muscolo scheletrici

Il protocollo è stato elaborato dal seguente un gruppo di lavoro:

Dott. Stefano Ferrari, Sezione di Chemioterapia dei Tumori dell' Apparato Locomotore Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

Dott. ssa Graziella Cefalo, Divisione di Oncoematologia Pediatrica Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano.

Dott.ssa Franca Fagioli Divisione di Oncoematologia Pediatrica -Azienda Ospedaliera O.I.R.M.-S. Anna. Torino.

Dott.ssa Angela Tamburini, Dipartimento di Oncoematologia Pediatrica e Cure domiciliari Azienda Ospedaliera Universitaria A. Meyer, Firenze.

Dott. ssa Rossella Bertulli, SS Trattamento Medico Sarcomi dell' Adulto, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

Dott. Enrico Grignani Divisione di Oncologia Medica, Istituto per la Ricerca sul Cancro, Candiolo Torino

Dott.ssa Amelia Tienghi, Dipartimento di Oncoematologia, Azienda Ospedaliera S. Maria delle Croci, Ravenna

Dott. Alessandro Comandone, Divisione di Oncologia Medica, Ospedale Gradenigo, Torino

Dott. Raffaele Cozza Divisione di Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Bambin Gesù, Roma

Dott.ssa Carla Manzitti Divisione di Oncologia ed Ematologia, Ospedale Pediatrico Gaslini, Genova

Dott.ssa Virginia Ferraresi Divisione di Oncologia Medica IFO, Roma

Dott. Claudio Favre Divisione di Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Santa Chiara, Pisa

Prof. Modesto Carli, Università di Padova, Divisione di Oncoematologia Pediatrica, Padova.

Prof. Mario Mercuri, Università di Bologna, V Divisione Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

Dott. Rodolfo Capanna, Reparto di Ortopedia Oncologica AOU Careggi-Firenze

Dott. Sergio Mapelli Centro di Chirurgia Ortopedica Oncologica Istituto Gaetano Pini, Milano

Dott. Roberto Biagini Reparto di Ortopedia Oncologica Istituto Regina Elena, Roma

Dott. Giancarlo Gino Reparto di Ortopedia Oncologica, Ospedale Maria Adelaide, Torino

Dott. Massimo Serra, Laboratorio di Oncologia Sperimentale, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

Dott. Piero Picci, Laboratorio di Oncologia Sperimentale, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

Dott. Marco Alberghini, Servizio di Anatomia Patologica, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

Dott.ssa Antonina Parafioriti Servizio di Anatomia Patologica, Istituto Gaetano Pini, Milano

Prof. Alessandro Franchi SOD di Istologia Patologica -Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi Firenze.

Dott.ssa Alessandra Linari Servizio di Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera O.I.R.M.-S. Anna. Torino.

Dott. Giancarlo Covello Servizio di Anatomia Patologica, IFO, Roma

Epidemiologo e Biostatistico: Dott.ssa Sandra Sottili, Dirigente statistico, Ricerca e Innovazione -Azienda Ospedaliera S. Orsola-Malpighi, Bologna.

Espressione di ABCB1/P-glycoprotein come fattore per la stratificazione biologica dell' osteosarcoma non metastatico delle estremità: Studio prospettico. (ISG/OS-2)

Coordinatore dello studio:

Dott. ssa Emanuela Palmerini, Sezione di Chemioterapia dei Tumori dell' Apparato Locomotore Istituto Ortopedico Rizzoli, via Pupilli 1 40136 Bologna

Tel: 051 6366199

Fax 051 6366277

e-mail: emanuela.palmerini@ior.it

ELENCO DEI CAMBIAMENTI INTRODOTTI CON L'EMENDAMENTO

Versione dell'emendamento	Data	Tipo di emendamento	Riassunto dell'emendamento	Pagine
1.1	16 Gen 2019	Sostanziale	Cambiamento dello sperimentatore del centro coordinator (da Dr. Stefano Ferrari a Dr. Palmerini)	3

INDICE

Introduzione	6
Bibliografia	13
Obiettivi	15
Razionale	15
Disegno dello studio	16
Statistica	17
Raccolta dati e monitoraggio dello studio	19
Eventi avversi e segnalazione	20
Comitato di coordinamento/Panel	21
Selezione dei pazienti	22
Inquadramento diagnostico e follow up	23
Chemioterapia	25
Modulistica	33
Linea guida per la determinazione di ABCB1/P- GLYCOPROTEIN	41

Introduzione

Nel gennaio 2007 si è concluso l'arruolamento nello studio condotto dall' Italian Sarcoma Group ISG-OS1 per l'osteosarcoma localizzato. Lo scopo dello studio era quello di valutare l' efficacia (in termini di EFS, MFS, DFS) e la tossicità di due protocolli chemioterapici che utilizzavano HDMTX, CDP, ADM e IFO. Un braccio prevedeva l'utilizzo dei quattro farmaci in tutti i soggetti e sin dalla fase preoperatoria (braccio B); nell'altro erano somministrati solo HDMTX, CDP e ADM, mentre IFO veniva aggiunto nella fase post operatoria nei soli pazienti che presentano una necrosi tumorale, indotta dalla chemioterapia primaria, inferiore al 90% (braccio A). A partire dall'aprile 2001 sono stati inseriti 246 pazienti, l' arruolamento annuale è stato di 43 pazienti.

In occasione del Congresso ASCO del 2010 sono stati riportati i risultati dello studio. Non è stata evidenziata differenza di sopravvivenza in funzione dei diversi schemi terapeutici adottati mentre è stata documentata una maggiore tossicità per i pazienti che ricevettero ifosfamide (Braccio B) sin dalla fase preoperatoria.

I risultati ottenuti con ISG OS 1 riportano percentuali di sopravvivenza libera da eventi a 5 anni del 61% (IC 95% 54-67) e sopravvivenza globale del 74% (IC 95% 69-80).

Tali dati non hanno mostrato differenze rispetto a precedenti protocolli condotti all' Istituto Ortopedico Rizzoli e rispetto ad altri studi riportati in letteratura (1-7).

In considerazione dei dati ottenuti con ISG-OS 1 e nell' attesa di un nuovo protocollo di studio basato su nuovi farmaci e approcci innovativi, è stato successivamente attivato uno studio clinico osservazionale per i pazienti con osteosarcoma non metastatico delle estremità basato sul braccio A del protocollo ISG-OS 1. Tale studio ha arruolato 138 pazienti dal Febbraio 2007 al Luglio 2010 confermando una capacità di arruolamento annuale da parte dell' ISG superiore ai 40 pazienti di età inferiore ai 40 anni e portatori di osteosarcoma non metastatico delle estremità.

Nel dicembre 2012 sono maturati i dati dello studio osservazionale per l' osteosarcoma non metastatico delle estremità attivato dall' Italian sarcoma Group nel febbraio 2007 (ISG Oss/Os/A). Dall' analisi dei dati emerge una probabilità di sopravvivenza libera da eventi inferiore rispetto a quella osservata nello studio ISG/OS-1 (braccio A) che adottava un regime ed una strategia terapeutica analoga a quella prevista nello studio osservazionale. Unica differenza fra ISG/OS-1 e lo studio osservazionale ISG Oss/Os/A il numero di cicli di methotrexate, 5 nello studio osservazionale e 10 nel braccio A di ISG/OS-1. Caratteristiche dei pazienti, tipo di trattamento locale, percentuale di pazienti con buona risposta istologica erano assolutamente sovrapponibili nei due studi. Da sottolineare inoltre come i centri che hanno arruolato pazienti in ISG Oss/Os/A erano i medesimi che parteciparono a ISG/OS-1. I risultati di ISG Oss/Os/A verranno presentati ufficialmente al prossimo congresso internazionale EMSOS (European Musculoskeletal Oncology Society, Goteborg 29-31 maggio 2013).

E' particolarmente sentita dalla comunità scientifica la necessità di poter identificare fattori biologici in grado di distinguere gruppi di pazienti aventi fattori di rischio diversi in base ai quali definire il trattamento chemioterapico. La terapia attuale dell'osteosarcoma ad alto grado si basa sul trattamento chirurgico associato a schemi di trattamento polichemioterapico pre- e post-operatori in larga misura basati sui classici 4 farmaci MTX, CDP, ADM e IFO.

Numerosi studi, in genere retrospettivi, sono stati condotti, ma i risultati raggiunti non sono mai stati considerate di rilevanza tale da suggerirne il loro utilizzo per la stratificazione dei pazienti. La risposta istologica alla chemioterapia primaria è

considerata un fattore predittivo di sopravvivenza, tuttavia studi mirati a trattamenti differenziati (o di salvataggio) sulla base della risposta patologica alla chemioterapia primaria hanno dato risultati di non univoca interpretazione.

Il Laboratorio di Oncologia Sperimentale dell' Istituto Ortopedico Rizzoli ha da tempo concentrato la propria attenzione sull' identificazione di fattori biologici che potessero avere un significato prognostico in pazienti con osteosarcoma.

Numerose nostre pubblicazioni hanno enfatizzato il significato prognostico dell'espressione della proteina ABCB1/P-glycoprotein valutata sulla biopsia diagnostica.

La funzione di ABCB1/P-glycoprotein è stata a lungo legata ai processi di resistenza all' adriamicina, farmaco cardine nel trattamento dell' osteosarcoma. Peraltro, valutazioni effettuate su centinaia di pazienti con osteosarcoma non metastatico delle estremità hanno mostrato come il significato prognostico di ABCB1/P-glycoprotein si mantenga anche in protocolli chemioterapici a diverso contenuto di adriamicina (Serra JCO 2003 e Serra Int J Oncol 2006).

Pazienti che non sovraesprimono ABCB1/P-glycoprotein hanno un rischio minore di ricaduta con una attesa probabilità di EFS a 5 anni che oscilla fra il 76% e l' 82% (Serra JCO 2003 e Serra Int J Oncol 2006). In caso di sovra espressione di ABCB1/P-glycoprotein le probabilità di sopravvivenza sono inferiori al 50 % (dal 40% al 49%).

E' interessante sottolineare che nei pazienti che non sovraesprimono ABCB1/P-glycoprotein, la sopravvivenza non sia influenzata dalla risposta istologica alla chemioterapia primaria. Al contrario, nei pazienti che sovraesprimono ABCB1/P-glycoprotein e che sono stati trattati con una chemioterapia a tre farmaci (MTX-CDP-ADM), la probabilità di sopravvivenza libera da eventi differisce significativamente essendo del 50% in caso di buona risposta istologica e solamente del 15% in caso di scarsa risposta patologica (Serra JCO 2003).

Questi dati forniscono forti indicazioni per una valutazione prospettica di trattamenti chemioterapici modulati in funzione dell' espressione di ABCB1/P-glycoprotein e della risposta istologica alla chemioterapia primaria.

In aggiunta a tali elementi che supportano la possibilità di un approccio stratificato al trattamento chemioterapico dell' osteosarcoma, è stato recentemente reso disponibile un nuovo farmaco.

In data 6 marzo 2009 l' Agenzia Europea per il Farmaco ha autorizzato l' immissione in commercio di Mepact@ (mifamurtide (liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidyl ethanolamine [MTP-PE]). L' Agenzia Italiana per il Farmaco (AIFA) con determinazione del 9 Dicembre 2010 pubblicata in Gazzetta Ufficiale n. 297 del 12 Dicembre 2010 ha ammesso il Mepact in regime di rimborsabilità in Italia da parte del Servizio Sanitario Nazionale.

Mepact@ è un farmaco in grado di sviluppare una risposta infiammatoria ed immunitaria verso l' osteosarcoma consentendo un uso combinato di chemioterapia e immunoterapia.

MTP-PE è un derivato di sintesi del muramyl dipeptide (MDP) che è un componente ad azione immunostimolante della parete di batteri Gram+ e Gram-. Le caratteristiche lipofile di MTP ne consentono l' incapsulamento all' interno di liposomi. I liposomi vengono rapidamente fagocitati dal sistema macrofagico in particolare a livello epatico e splenico.

Studi in vitro e in vivo hanno mostrato come l' esposizione di monociti a MTP sia in grado di provocarne l' attivazione ed a stimolarne l' attività citotossica antitumorale in colture cellulari di tumori del colon, rene, melanoma ed ovaio. In uno studio clinico coinvolgente pazienti con sarcomi venne riscontrato un significativo incremento, rispetto ai valori basali, dell' attività monocitica dopo trattamento con MTP.

L' interazione fra MTP e sistema monocitico/macrofagico si esprime attraverso l' aumentata produzione di citochine pro infiammatorie quali TNF- α , IL-6, IL-8 sia in vitro che in studi in vivo includenti pazienti con osteosarcoma metastatico.

La somministrazione di Mifamurtide ha mostrato attività in modelli animali. L'uso adiuvante di MTP ha aumentato la sopravvivenza in cani con osteosarcoma, tuttavia l'uso di MTP in animali (cani, gatti) in presenza di malattia macroscopica non ha impattato sulla sopravvivenza indicando come la massa tumorale sia un fattore condizionante l'efficacia di MTP.

La somministrazione di chemioterapia non modifica l'efficacia di stimolazione monocitaria propria del farmaco.

MTP è stato valutato clinicamente in una serie di studi clinici di fase I che hanno coinvolto approssimativamente 150 pazienti con neoplasie in fase avanzata. In tali studi la dose massima tollerata è stata fissata in 4-6 mg/m²

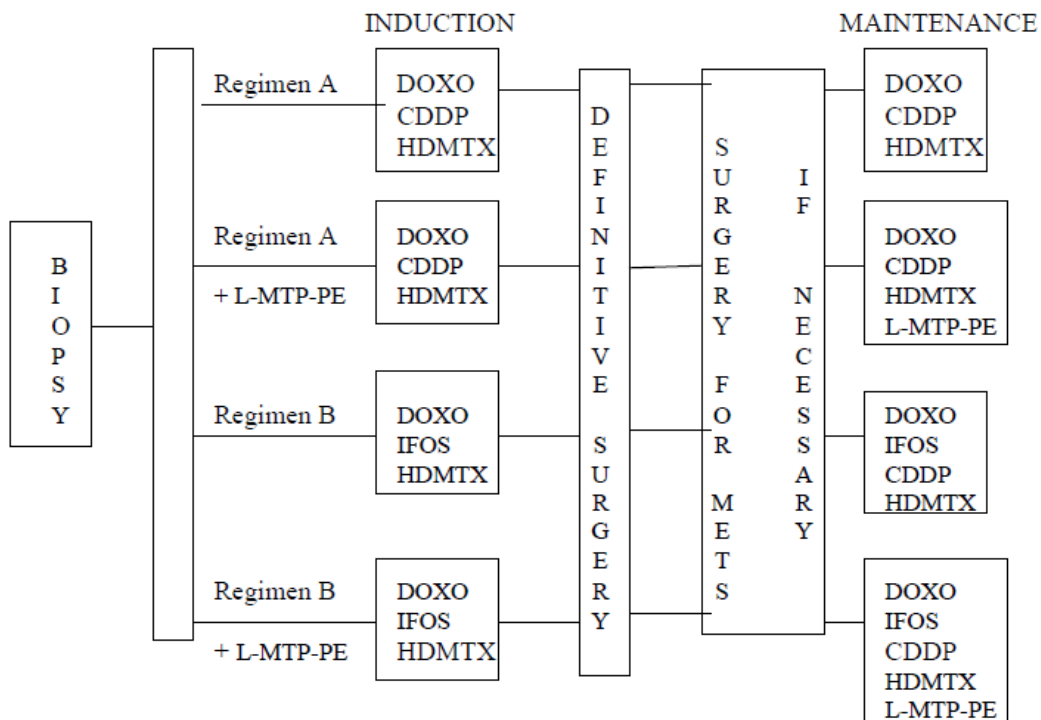
In una fase successiva il farmaco è stato valutato in uno studio di fase II in pazienti con osteosarcoma in ricaduta con metastasi polmonari.

Di particolare interesse la dimostrazione di un intenso infiltrato infiammatorio a carico delle lesioni polmonari resecate dopo trattamento con MTP (6 pazienti) con conservazione di tessuto vitale al centro della lesione, contrariamente a quanto osservato in noduli polmonari di pazienti non precedentemente trattati con il farmaco, ma con la sola chemioterapia che presentavano necrosi centrale con cellule vitali periferiche. Tale osservazione venne interpretata come un segno di attività del farmaco nei confronti dei noduli tumorali. In termini di sopravvivenza la mediana di sopravvivenza libera da malattia fu di 9 mesi rispetto ai controlli storici. Un gruppo di pazienti ricevette MTP per 12 settimane, un altro gruppo per 24 settimane. In termini di sopravvivenza, il 56% dei pazienti trattati per 24 settimane sopravvisse a 5 anni, rispetto al 25% di quanti vennero trattati per 12 settimane. Di quanti ricevettero chemioterapia solo 2 dei 21 pazienti sopravvissero a 5 anni.

Questi dati confortarono i ricercatori inducendoli a valutare il farmaco nell'ambito di uno studio di fase III. L'osservazione di una apparente relazione fra durata del trattamento e sopravvivenza indusse i ricercatori a prolungare a 36 settimane la durata del trattamento con MTP. Il dosaggio di MTP, fissato a 2mg/m² veniva incrementato di 1 mg/m² fino a 4mg/m² nei pazienti in cui non venivano riscontrati segni clinici sistemici di attività biologica del farmaco.

Fra il novembre 1993 e il novembre 1997 venne attivato uno studio fra Children Cancer Group e Pediatric Oncology Group (INT 0133). Lo studio venne disegnato per confrontare due differenti schemi di trattamento, uno (braccio A) basato su una combinazione a tre farmaci (methotrexate, cisplatino, Adriamicina), l'altro (braccio B) basato su una combinazione a quattro farmaci (methotrexate, cisplatino, Adriamicina e ifosfamida). I pazienti, in funzione del braccio di trattamento, venivano ulteriormente randomizzati per ricevere MTP in aggiunta alla chemioterapia.

Studio INT 0133: Schema di trattamento e randomizzazione



Studio INT 0133: Schema di trattamento e dosaggio

	Braccio A		Braccio B	
Farmaco (dose)	Induzione	Mantenimento	Induzione	Mantenimento
MTX (12g/m ²)	4 cicli	8 cicli	4 cicli	8 cicli
ADM (75mg/m ²)	2 cicli	4 cicli	2 cicli	4 cicli
CDP (120mg/m ²)	2 cicli	2 cicli		4 cicli
IFO (9g/m ²)			2 cicli	3 cicli

MTP veniva somministrato a partire da una settimana successivamente all' intervento chirurgico per una durata complessiva di 36 settimane. MTP veniva infuso EV ad un dosaggio di 2 mg/m² due volte la settimana nelle prime 12 settimane e successivamente una volta la settimana per 24 somministrazioni. In assenza di segni clinici di attività biologica (elevazione di PCR, febbre, sindrome similinfluenzale) il dosaggio del farmaco veniva incrementato di 1 mg/m² fino ad un dosaggio di 4 mg/m².

La fase di induzione metteva a confronto due schemi, l' uno (braccio A) con methotrexate, cisplatino, Adriamicina, l' altro (braccio B) con methotrexate, ifosfamide, Adriamicina. Postoperatoriamente nel braccio A si continuava con i medesimi farmaci, mentre nel braccio B veniva aggiunto cisplatino.

Lo studio constava dunque di 4 bracci di trattamento A- (methotrexate, cisplatino, Adriamicina senza MTP), A+ (methotrexate, cisplatino, Adriamicina con MTP), B- (methotrexate, cisplatino, Adriamicina, ifosfamide senza MTP), B+ (methotrexate, cisplatino, Adriamicina, ifosfamide con MTP).

Nello studio vennero inclusi pazienti di età ≤ ai 30 anni con diagnosi di osteosarcoma ad alto grado. Anche pazienti con metastasi sincrone vennero inseriti e randomizzati nello studio. Fra il Novembre del 1993 il Novembre 1997 vennero arruolati 793 pazienti. Di questi 16 risultarono non eleggibili. Dei 777 eleggibili, 662 risultarono avere malattia resecabile e non metastatica, 113 pazienti erano metastatici (solo CCG inseriva pazienti metastatici nello studio), 22 presentavano malattia non resecabile. Le caratteristiche cliniche dei pazienti erano ben bilanciate nei diversi regimi di trattamento.

La sopravvivenza globale per l' intera popolazione dei pazienti localizzati fu dell' 81% e 74% a 4 e 6 anni rispettivamente, la sopravvivenza libera da eventi del 66% e 64%.

In tabella sono riportati i dati di sopravvivenza nei 4 gruppi di trattamento.

Braccio	Chemio±MTP	% EFS		% OS	
		4 anni	6 anni	4 anni	6 anni
A+	MAP+MTP	65	63	82	75
A-	MAP	66	64	78	71
B+	MAPI+MTP	74	71	86	81
B-	MAPI	60	58	77	70
A+ e A-	MAP±MTP	65	63	80	73
B+ e B-	MAPI±MTP	67	64	82	75

A+ e B+	MAP/MAPI+MTP	69	67	84	78*
A- e B-	MAP/MAPI	63	61	78	70

Legenda: MAP: methotrexate, Adriamicina, cisplatino; MAPI : methotrexate, Adriamicina, cisplatino, ifosfamide; EFS sopravvivenza libera da eventi, OS sopravvivenza, + con MTP, - senza MTP

* Differenza significativa ($p=0.03$) rispetto ai pazienti trattati senza MTP

Lo studio è stato oggetto di due successive pubblicazioni. Nella prima, risalente al 2005, emerse una interazione positiva fra il trattamento con MTP e l'uso dell'ifosfamide. Tale interazione precluse la possibilità di un'analisi secondo il disegno fattoriale originale. In una successiva pubblicazione riportata nel 2008 vennero aggiornati i dati alla luce di un prolungato follow-up. Nella seconda analisi non emerse la precedente interazione positiva fra braccio B e MTP e questo consentì un'analisi sulla base dell'originario studio fattoriale.

I dati maturi, successivamente elaborati sulla base di un più prolungato periodo di osservazione (la durata media del follow up 89 mesi) posero in evidenza un significativo vantaggio in termini di sopravvivenza globale ed un trend positivo in termini di sopravvivenza libera da eventi in favore dei pazienti che ricevettero MTP.

Indubbiamente si tratta del primo farmaco registrato per l'osteosarcoma dopo decenni.

Il profilo di tossicità più che accettabile ha rappresentato senz'ombra di dubbio un elemento importante in favore della registrazione del farmaco.

I dati della seconda analisi dello studio INT 0133 hanno dimostrato un vantaggio in termini di sopravvivenza globale in favore dei pazienti che ricevettero l'associazione chemioterapia e MTP, mentre relativamente alla sopravvivenza libera da eventi è stato evidenziato solo un trend nei confronti di quanti ricevettero anche MTP.

A fronte di tale vantaggio è necessario aggiungere altri elementi che possono condizionare la scelta di un utilizzo del farmaco nei pazienti con osteosarcoma ad alto grado. Un recente editoriale ha puntualizzato in particolare sul problema dei costi del farmaco. Un altro elemento di non secondaria importanza è rappresentato dall'aumento della durata del trattamento farmacologico rispetto agli attuali tempi ed alla necessità di ripetuti accessi ospedalieri, a cadenza quantomeno settimanale nella seconda fase del trattamento. Considerando la fascia di età in cui maggiormente incide la malattia e la ben nota problematicità del rapporto con la malattia ed il trattamento propria degli adolescenti e giovani adulti, si pongono problemi di compliance con il trattamento non marginali.

In quest'ottica sforzi ulteriori debbono essere prodotti al fine di identificare i pazienti che maggiormente possono beneficiare di questo tipo di trattamento.

Considerando dunque durata e complessità del trattamento ed i costi relativi è ragionevole pensare ad un utilizzo selettivo del farmaco mirato ad aumentare le probabilità di sopravvivenza in pazienti a maggior rischio di ricaduta.

Nelle recenti linee guida europee della European Society for Medical Oncology è stato ribadito come l' utilizzo di MTP rappresenti una possibile opzione nell' ambito di una decisione che deve essere condivisa con il paziente.

Il Comitato sarcomi ossei dell' Italian Sarcoma Group e il CSS sarcomi ossei dell' Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica (AIEOP) ritengono che sia compito preciso delle società scientifiche indirizzare i clinici verso un meditato uso dei nuovi farmaci e che tenga conto della perdurante incertezza circa i pazienti che maggiormente possano trarne beneficio da Mepact@.

A tal fine si è ritenuto di riservare il farmaco per i pazienti che, sulla base delle sopracitate considerazioni, presentano un maggior rischio di ricaduta (pazienti che sovra esprimono ABCB1/P-glycoprotein).

Per i pazienti che non sovra esprimono ABCB1/P-glycoprotein gli attuali schemi chemioterapici neoadiuvanti basati sulla combinazione MTX-CDP-ADM possono infatti offrire probabilità di sopravvivenza libera da eventi superiore al 75% a 5 anni senza differenze in funzione della risposta istologica alla chemioterapia primaria.

Ben diversa è l' aspettativa di sopravvivenza nei pazienti che sovra esprimono ABCB1/P-glycoprotein. La sopravvivenza attesa per questi pazienti giustifica l' associazione con un trattamento immunostimolante con Mepact@. Inoltre, in tale gruppo di pazienti appare necessario modificare l' approccio terapeutico con particolare attenzione per i pazienti scarsamente responsivi alla chemioterapia preoperatoria. In questi ultimi, per i quali la sopravvivenza libera da eventi attesa è del 15% si ritiene giustificato completamente modificare lo schema chemioterapico. A tal proposito le alte dosi di Ifosfamide rappresentano una valida opzione terapeutica già utilizzata nei pazienti con osteosarcoma in recidiva. Il loro uso, in combinazione con etoposide, è inoltre previsto nei pazienti scarsamente responsivi ad una chemioterapia a tre farmaci (methotrexate, cisplatino, adriamicina) nello studio clinico EURAMOS attualmente in corso.

Bibliografia

Bacci G., Picci P., Ferrari S., Ruggieri P., Casadei R., Tienghi A., Brach Del Prever A., Gherlinzoni F., Mercuri M., Monti C.: Primary chemotherapy and delayed surgery for non metastatic osteosarcoma of the extremity. Results in 164 patients preoperatively treated with high doses of methotrexate, followed by cisplatin and doxorubicin. *Cancer*, 72: 1216-1226, 1993.

Bacci G, Mercuri M, Longhi A, Ferrari S, Bertoni F, Versari M, Picci P. Grade of chemotherapy-induced necrosis as a predictor of local and systemic control in 881 patients with non-metastatic osteosarcoma of the extremities treated with neoadjuvant chemotherapy in a single institution. *Eur J Cancer*. 2005 Sep;41(14):2079-85

Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Werner M, Winkelmann W, Zoubek A, Jürgens H, Winkler K. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol*. 2002 Feb 1;20(3):776-90

Bielack S, Carrle D, Casali PG. Osteosarcoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009; 20, Suppl 4: 137-9

Bramwell VHC, Burgers M, Sneath R, Souhami R, van Oosteron AT, Voüte PA, et al. A comparison of two short intensive adjuvant chemotherapy regimens in operable osteosarcoma of limbs in children and young adults: the first study of the European Osteosarcoma Intergroup. *J Clin Oncol* 1992; 10:1579-1591.

Campanacci M. Bone and soft tissue tumors, 2nd ed. 1999. High grade osteosarcomas 463-515. Springer-Verlag, Wien, New York.

Ferrari S, Palmerini E. Adjuvant and neoadjuvant combination chemotherapy for osteogenic sarcoma. *Curr Opin Oncol*. 2007 Jul;19(4):341-6. Review

Ferrari S, Smeland S, Mercuri M, Bertoni F, Longhi A, Ruggieri P, Alvegard TA, Picci P, Capanna R, Bernini G, Muller C, Tienghi A, Wiebe T, Comandone A, Bohling T, Del Prever AB, Brosjo O, Bacci G, Saeter G; Italian and Scandinavian Sarcoma Groups. Neoadjuvant chemotherapy with high-dose ifosfamide, high-dose methotrexate, cisplatin, and doxorubicin for patients with localized osteosarcoma of the extremity: a joint study by the Italian and Scandinavian Sarcoma Groups. *J Clin Oncol*. 2005; 23:8845-52.

S. Ferrari, G. Cefalo, A. Tamburini, A. Comandone, F. Fagioli, P. G. Casali, G. Bisogno, M. Mercuri, P. Picci, G. Bacci. Non-metastatic osteosarcoma of the extremity. neoadjuvant chemotherapy with methotrexate (MTX), cisplatin (CDP), doxorubicin (ADM) with or without ifosfamide (IFO). A randomized trial of the italian sarcoma group (ISG/OS-1). *J Clin Oncol*. Proceedings 46th ASCO Annual Meeting, Abstract #42388. Chicago, 2010

- Fuchs N, Bielack SS, Epler D, Bieling P, Delling G, Körholz D, Graf N, Heise U, Jürgens H, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Weinel P, Werner M, Winkler K. Long-term results of the co-operative German-Austrian-Swiss osteosarcoma study group's protocol COSS-86 of intensive multidrug chemotherapy and surgery for osteosarcoma of the limbs. *Ann Oncol.* 1998 Aug;9(8):893-9
- Le Deley MC, Guinebretière JM, Gentet JC, Pacquement H, Pichon F, Marec-Bérard P, Entz-Werlé N, Schmitt C, Brugières L, Vanel D, Dupouy N, Tabone MD, Kalifa C; Société Française d'Oncologie Pédiatrique (SFOP). SFOP OS94: a randomised trial comparing preoperative high-dose methotrexate plus doxorubicin to high-dose methotrexate plus etoposide and ifosfamide in osteosarcoma patients. *Eur J Cancer.* 2007 Mar;43(4):752-61.
- Linee guida per il trattamento dell' Osteosarcoma: <http://www.italiansarcomagroup.org>
- Meyers PA, Schwartz CL, Krailo M, Kleinerman ES, Betcher D, Bernstein ML, Conrad E, Ferguson W, Gebhardt M, Goorin AM, Harris MB, Healey J, Huvos A, Link M, Montebello J, Nadel H, Nieder M, Sato J, Siegal G, Weiner M, Wells R, Wold L, Womer R, Grier H. Osteosarcoma: a randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. *J Clin Oncol.* 2005 Mar 20;23(9):2004-11
- Meyers PA, Schwartz CL, Krailo MD, Healey JH, Bernstein ML, Betcher D, Ferguson WS, Gebhardt MC, Goorin AM, Harris M, Kleinerman E, Link MP, Nadel H, Nieder M, Siegal GP, Weiner MA, Wells RJ, Womer RB, Grier HE; Children's Oncology Group. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival--a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2008 Feb 1;26(4):633-8.
- Meyers P.A., Gorlick R., Heller G., Casper E., Lane J., Huvos A.G., Healey J.H.: Intensification of preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: results of the Memorial Sloan-Kettering (T-12) protocol. *J. Clin. Oncol.*, 16: 2452-2458, 1998.
- Rosen G, Caparros B, Huvos A, Kosloff C, Nirenberg A, Cacavio A, et al: Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: Selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. *Cancer* 1982; 49: 1221-1230
- Serra M, Scotlandi K, Reverter-Branchat G, Ferrari S, Manara MC, Benini S, Incaprera M, Bertoni F, Mercuri M, Briccoli A, Bacci G, Picci P. Value of P-glycoprotein and clinicopathologic factors as the basis for new treatment strategies in high-grade osteosarcoma of the extremities. *J Clin Oncol.* 2003 Feb 1;21(3):536-42.
- Serra M, Pasello M, Manara MC, Scotlandi K, Ferrari S, Bertoni F, Mercuri M, Alvegard TA, Picci P, Bacci G, Smeland S. May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol. *Int J Oncol.* 2006 Dec;29(6):1459-68
- Smeland S, Müller C, Alvegard TA, Wiklund T, Wiebe T, Björk O, Stenwig AE, Willén H, Holmström T, Follerås G, Brosjö O, Kivioja A, Jonsson K, Monge O, Saeter G. Scandinavian Sarcoma Group Osteosarcoma Study SSG VIII: prognostic factors for outcome and the role of replacement salvage chemotherapy for poor histological responders. *Eur J Cancer.* 2003 Mar;39(4):488-94
- Winkler K, Beron G, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Beck J, Beck W, et al. Neoadjuvant chemotherapy for osteogenic sarcoma: results of a cooperative German/Austrian study. *J Clin Oncol* 1984; 2: 617-624.
- Winkler K., Beron G., Delling G., Heise U., Kabish H., Purfurst C., Berger J., Ritter J., Jurgens H., Gerein V., Graf N., Russe W., Gruemayer E.R., Ertelt W., Kotz R., Preusser P., Prindull G., Brandeis W., Landbeck G. Neoadjuvant chemotherapy of osteosarcoma: results of a randomized cooperative trial (COSS-82) with salvage chemotherapy based on histological tumor response. *J. Clin. Oncol.*, 6: 328-337, 1988.

Obiettivi

Valutare l' impatto sulla sopravvivenza libera da eventi di un trattamento che utilizza tutti i farmaci attualmente registrati per il trattamento dell' osteosarcoma non metastatico delle estremità (methotrexate, cisplatino, Adriamicina, ifosfamide, MTP-PE) in pazienti che sovraesprimono ABCB1/P-glycoprotein.

Valutare l' impatto sulla sopravvivenza libera da eventi di un trattamento che utilizza methotrexate, cisplatino, Adriamicina, in pazienti con osteosarcoma non metastatico delle estremità che non sovraesprimono ABCB1/P-glycoprotein.

Valutare la sopravvivenza globale in una popolazione omogenea di pazienti portatori di osteosarcoma non metastatico delle estremità trattata secondo modalità chemioterapiche differenti in funzione dell' espressione di ABCB1/P-glycoprotein.

Valutare prospetticamente la qualità della vita nei pazienti arruolati nel presente protocollo.

Razionale

La terapia attuale dell'osteosarcoma ad alto grado si basa sulla combinazione di trattamento chirurgico locale e chemioterapia sistemica. Non vi è un consenso su quale sia lo schema terapeutico standard.

L' identificazione di fattori condizionanti la prognosi potrebbe consentire strategie terapeutiche differenziate che potrebbero portare ad un miglioramento della sopravvivenza globale.

Studi clinici e sperimentali hanno evidenziato che l'espressione della proteina ABCB1/P-glycoprotein al momento della diagnosi correla con la probabilità di sopravvivenza. La funzione di ABCB1/P-glycoprotein è stata a lungo legata ai processi di resistenza all' adriamicina, farmaco cardine nel trattamento dell' osteosarcoma. Peraltro, valutazioni retrospettive effettuate su centinaia di pazienti con osteosarcoma non metastatico delle estremità hanno mostrato come il significato prognostico di ABCB1/P-glycoprotein si mantenga anche in protocolli chemioterapici a diverso contenuto di adriamicina. Pazienti che sovraesprimono ABCB1/P-glycoprotein dunque hanno un rischio maggiore di ricaduta.

Un altro fattore prognostico universalmente riconosciuto è la necrosi indotta dalla chemioterapia primaria. E' prassi comune sottoporre i pazienti con osteosarcoma a chemioterapia primaria seguita da trattamento chemioterapico post operatorio. I pazienti che presentano una scarsa necrosi tumorale hanno una probabilità di sopravvivenza inferiore rispetto a quanti hanno una buona risposta patologica.

In una valutazione effettuata in pazienti trattati presso l' Istituto Ortopedico Rizzoli con una chemioterapia a 4 farmaci è stato evidenziato come non solo l' espressione di ABCB1/P-glycoprotein condizionasse la prognosi, ma che combinando l' espressione di ABCB1/P-glycoprotein e la necrosi chemio indotta fosse possibile identificare un gruppo di pazienti a diversa prognosi. La probabilità di sopravvivenza libera da eventi attesa è del 75% nei pazienti che non sovra esprimono ABCB1/P-glycoprotein, scende al 40% nei pazienti che sovraesprimono ABCB1/P-glycoprotein con una forte differenza in funzione della risposta istologica alla chemioterapia primaria. I pazienti ABCB1/P-glycoprotein+ che presentano una buona risposta alla chemioterapia preoperatoria hanno una attesa di EFS a 5 anni del 50%, mentre nei pazienti che presentano una scarsa risposta alla chemioterapia preoperatoria l' EFS a 5 anni è del solo 15%.

Questi dati indicano che l' espressione tissutale di ABCB1/P-glycoprotein rappresenta un fattore prognostico in grado di distinguere pazienti con osteosarcoma non metastatico delle estremità aventi diversa probabilità di sopravvivenza.

Da qui l'ipotesi di modulare il trattamento chemioterapico in funzione dell'espressione di ABCB1/P-glycoprotein e, in quanti sovra esprimono ABCB1/P-glycoprotein, della risposta istologica alla chemioterapia primaria.

La popolazione che non sovra esprime ABCB1/P-glycoprotein, rappresenta una popolazione a prognosi favorevole per la quale è attesa una probabilità di sopravvivenza libera da eventi del 75% a 5 anni con una sopravvivenza globale attesa a cinque anni dell'85%.

Per tale popolazione il protocollo applica un trattamento chemioterapico basato su methotrexate-cisplatino-adriamicina da cui è attesa la conferma dei buoni dati di sopravvivenza retrospettivamente riscontrati.

La popolazione che sovraesprime ABCB1/P-glycoprotein, rappresenta una popolazione a prognosi sfavorevole per la quale è attesa una probabilità di sopravvivenza libera da eventi del 40% (95% IC 26 a 54%) a 5 anni. In tale coorte ci ripromettiamo di migliorare i dati registrati in precedenti casistiche in popolazioni con caratteristiche sovrapponibili.

Per tale popolazione il protocollo applica un trattamento chemioterapico basato su tutti i farmaci attualmente disponibili per il trattamento dell'osteosarcoma (methotrexate-cisplatino-adriamicina-Ifosfamide-MTP-PE). Tale scelta è legata alla inferiore probabilità di sopravvivenza attesa in questo gruppo di pazienti. Per tale motivo, inoltre, è stato deciso di intensificare il trattamento integrandolo con Mepact®. Nella perdurante incertezza circa il ruolo di Mepact® nell'osteosarcoma e circa la popolazione che maggiormente può trarre beneficio da un suo uso, il Comitato sarcomi ossei dell'Italian Sarcoma Group e il GdL sarcomi ossei dell'Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica (AIEOP) ritenendo che sia compito preciso delle società scientifiche indirizzare i clinici verso un meditato uso dei nuovi farmaci hanno ritenuto di riservare il farmaco per i pazienti che, sulla base delle sopracitate considerazioni, presentano un maggior rischio di ricaduta (pazienti che sovra esprimono ABCB1/P-glycoprotein).

Disegno dello studio

Tutti i pazienti di età uguale o inferiore a 40 anni, con diagnosi di osteosarcoma ad alto grado verranno considerati per il presente studio e verranno arruolati coloro che rientrano nei criteri di eleggibilità.

Sulla biopsia diagnostica verrà effettuata la valutazione immunoistochimica dell'espressione di ABCB1/P-glycoprotein.

La valutazione dell'espressione di ABCB1/P-glycoprotein verrà effettuata secondo una metodica standardizzata (vedi procedura allegata) presso il Centro responsabile della revisione centralizzata: Servizio di Anatomia Patologica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli.

Materiale istologico per revisione centralizzata dovrà essere inviato a cura del patologo del Centro interessato al Dott. Marco Alberghini SSD Anatomia Patologica, Istituto Ortopedico Rizzoli, Via di Barbiano 1/10, 40136 Bologna. Entro 30 giorni dal ricevimento del materiale verrà inviato il referto relativo alla revisione.

Tutti i pazienti inseriti nello studio riceveranno la medesima terapia primaria che consiste di due blocchi con methotrexate, cisplatino e adriamicina.

Successivamente al trattamento chirurgico, verrà effettuata valutazione della risposta istologica alla chemioterapia primaria. La risposta istologica alla chemioterapia primaria verrà espressa in percentuale di necrosi tumorale. In caso di necrosi tumorale uguale o superiore al 90% il paziente è definito un "good responder" in caso di percentuale inferiore un "poor responder".

I pazienti che non sovra esprimono ABCB1/P-glycoprotein riceveranno un trattamento a tre farmaci (methotrexate, cisplatino e adriamicina) della complessiva durata di 27 settimane.

Tutti i pazienti che sovraesprimono ABCB1/P-glycoprotein assoceranno, nella fase post operatoria, trattamento con Mepact@. In caso di buona risposta istologica (necrosi tumorale uguale o superiore al 90%), il trattamento chemioterapico post operatorio consisterà di methotrexate, cisplatino, adriamicina e Mepact@ per una durata complessiva di 48 settimane. I pazienti che presentano una risposta istologica scarsa (necrosi tumorale inferiore al 90%) modificheranno completamente il trattamento postoperatorio. I tre farmaci preoperatori verranno sostituiti da 4 cicli di alte dosi di ifosfamide e Mepact@ per una durata complessiva di 48 settimane.

Qualora per qualsiasi ragione non possa essere valutata l'espressione di ABCB1/P-glycoprotein, il Centro Raccolta Dati ISG invierà comunicazione al Centro che ha registrato il paziente.

Il paziente in oggetto risulterà registrato, ma non eleggibile per il presente studio. Il paziente potrà essere inserito nello studio ISG/OS/Oss (<http://www.italiansarcomagroup.org/protocolli/ISG.Oss.OS.A.pdf>) e trattato secondo quanto da esso previsto.

In analogia con i precedenti protocolli ISG per l'osteosarcoma non metastatico delle estremità, vengono inseriti in ISG/OS-2 pazienti fino all'età di 40 anni. In relazione a ciò gli estensori del presente studio hanno ritenuto che non sussistano, alla luce dei dati riportati in letteratura, elementi che controindichino l'uso del Mepact@ nella popolazione di età compresa fra i 30 e i 40 anni.

In tale fascia di età non è peraltro prevista la rimborsabilità del farmaco. A tale proposito, con formale lettera (vedi allegato), Takeda si è impegnata a distribuire gratuitamente il farmaco ai pazienti inseriti in ISG/OS-2, di età compresa fra i 31 e i 40 anni e che sovra esprimono ABCB1/P-glycoprotein.

Statistica

Sulla base dei dati di arruolamento registrati nei precedenti protocolli ISG/AIEOP per osteosarcoma non metastatico delle estremità, si prevede un arruolamento annuo di 45 pazienti all'anno.

La durata prevista dello studio è di 5 anni di arruolamento e di due anni di osservazione dall'inserimento dell'ultimo paziente. Sono attesi 225 pazienti.

Sulla base dei dati di precedenti studi si stima che la percentuale di pazienti che sovra esprimono ABCB1/P-glycoprotein sia del 45% (20 pazienti all'anno).

A fronte di un arruolamento globale di 225 pazienti, si stima che 101 presenteranno sovra espressione di ABCB1/P-glycoprotein.

La popolazione in studio si compone di due coorti distinte in funzione dell'espressione tissutale di ABCB1/P-glycoprotein.

La popolazione che non sovra esprime ABCB1/P-glycoprotein, sulla base di osservazioni retrospettive, rappresenta una popolazione a prognosi favorevole per la quale è attesa una probabilità di sopravvivenza libera da eventi del 75% a 5 anni con una sopravvivenza globale attesa a cinque anni dell'85%. Per tale popolazione il protocollo applica un trattamento chemioterapico standard basato sulla classica combinazione methotrexate-cisplatino-adriamicina. In tale coorte ci ripromettiamo di confermare i dati registrati in precedenti casistiche in popolazioni con caratteristiche sovrapponibili.

I dati di sopravvivenza libera da eventi verranno strettamente monitorati e verranno effettuate analisi ad interim a 2 e 3 anni. Il gruppo di coordinamento dello studio valuterà un'eventuale interruzione/modifica dello studio qualora i dati registrati risultino inferiori a quelli riscontrati in precedenti studi retrospettivi (vedi tabella) o qualora il numero di eventi correlati alla malattia nel gruppo ABCB1/P-GLYCOPROTEIN- sia superiore a 8 e a 16 rispettivamente a 24 e 36 mesi (per un arruolamento annuo di 25 pazienti).

TABELLA: % di sopravvivenza libera da eventi e limite di confidenza al 95% in pazienti con osteosarcoma non metastatico delle estremità con normale espressione tissutale di ABCB1/P-glycoprotein (Serra JCO 2003).

	% Sopravvivenza libera da eventi	Intervallo di confidenza 95%
Tempo 0	100	100-100
12 mesi	96,2	92,6-99,9
24 mesi	84,8	77,9-91,7
36 mesi	79,1	71,3-86,9
48 mesi	76,2	68,1-84,4

La popolazione che sovra esprime ABCB1/P-glycoprotein, sulla base di osservazioni retrospettive, rappresenta una popolazione a prognosi sfavorevole per la quale è attesa una probabilità di sopravvivenza libera da eventi del 40% (95% IC 26 a 54%) a 5 anni con una sopravvivenza globale attesa a cinque anni del 50%.

Per tale popolazione il protocollo applica un trattamento chemioterapico basato su tutti i farmaci attualmente disponibili per il trattamento dell'osteosarcoma (methotrexate-cisplatino-adriamicina-Ifosfamide-MTP-PE). Inoltre i pazienti di tale coorte scarsamente responsivi al trattamento preoperatorio con methotrexate-cisplatino-adriamicina riceveranno un trattamento post operatorio che prevede l'esclusione dei farmaci utilizzati preoperatoriamente e la loro sostituzione con ifosfamide somministrato ad alte dosi.

In tale coorte ci ripromettiamo di migliorare i dati registrati in precedenti casistiche in popolazioni con caratteristiche sovrapponibili.

A fronte di dati storici che riportano una probabilità di sopravvivenza libera da eventi a 5 anni del 40% è necessario un campione di 96 pazienti per dimostrare la significatività di un incremento del 20% rispetto allo storico (Alfa = 0.05, Beta = 0.2).

Sulla base dei dati storici di reclutamento e di incidenza di sovra espressione di ABCB1/P-glycoprotein si prevede di arruolare 20 pazienti all'anno con sovraespressione di ABCB1/P-glycoprotein per un totale di 100 pazienti nell'arco dello studio.

La durata dello studio viene aumentata di 18 mesi al fine di ottenere una numerosità campionaria dei pazienti in studio e trattati secondo quanto previsto in questo emendamento pari a quella prevista nella prima versione del protocollo.

I pazienti già arruolati nello studio prima dell'approvazione del presente emendamento e che hanno completato il programma chemioterapico verranno sottoposti a valutazione separata.

I pazienti già arruolati nello studio prima dell'approvazione del presente emendamento e che hanno in corso la fase post operatoria completano il piano di cura secondo la versione precedente e verranno sottoposti a valutazione separata.

I pazienti arruolati prima dell'approvazione dell'emendamento e che non hanno ancora iniziato il trattamento post-operatorio, completeranno il trattamento secondo quanto previsto nel presente emendamento.

Raccolta Dati e monitoraggio dello studio

Raccolta dati

I dati richiesti verranno raccolti mediante accesso remoto al Database dell' Italian Sarcoma Group: www.isg-area-riservata.org/dh/.

Attivazione del Centro

I Centri interessati allo studio inviano richiesta di partecipazione allo studio al Centro Coordinatore.

Il Centro Coordinatore verifica l' adesione a quanto previsto nella richiesta di partecipazione e provvede ad inviare quanto necessario per la sottomissione al Comitato Etico locale.

Una volta acquisita l' approvazione del Comitato Etico, il Centro interessato ne invia copia al Centro Coordinatore.

Il Centro Coordinatore provvede ad attribuire il Codice del Centro.

Una volta in possesso del Codice, il Centro può attivamente partecipare allo studio

Registrazione dei pazienti

I pazienti eleggibili, dopo acquisizione di consenso informato, verranno registrati mediante invio della apposita scheda (Scheda Registrazione) via FAX al Centro Raccolta Dati ISG. Compatibilmente con le esigenze organizzative e comunque entro tre settimane dalla registrazione, verranno inviate a cura dell' UO di Anatomia Patologica del Centro che ha registrato il paziente, sezioni istologiche per la valutazione centralizzata dell' espressione di ABCB1/P-glycoprotein. Via FAX verrà data comunicazione di invio al Centro Raccolta Dati ISG (Scheda di invio di materiale istologico)

Una volta ricevuta scheda di registrazione, il Centro Raccolta Dati ISG provvederà alla registrazione del paziente nello studio comunicandolo via FAX (Scheda di conferma della registrazione) al Centro e contemporaneamente invierà comunicazione della registrazione del nuovo caso all' UO di Anatomia Patologica dell' Istituto Ortopedico Rizzoli responsabile della valutazione centralizzata dell' espressione di ABCB1/P-glycoprotein.

Il centro responsabile della valutazione della espressione della ABCB1/P-glycoprotein (Servizio di Anatomia Patologica dell' Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna) invierà entro un mese dal ricevimento del materiale istologico al Centro di Raccolta Dati ISG e all' Anatomia Patologica che ha inviato il materiale via FAX il modulo di valutazione ABCB1/P-glycoprotein (Scheda di refertazione). Sarà cura del Centro Raccolta Dati ISG inviarne immediatamente copia via FAX al Centro oncologico presso cui il paziente è in trattamento.

E' responsabilità del ricercatore principale del Centro assicurare l' eleggibilità del paziente ed il corretto invio della documentazione necessaria e dei dati richiesti ai fini dello studio

Ai fini della registrazione tutti i campi presenti nella scheda di registrazione debbono essere correttamente completati

Il campo "codice del centro" deve riportare il codice assegnato al Centro da parte del Centro Coordinatore al momento della attivazione del centro (Vedi attivazione del Centro)

La data di acquisizione del consenso deve essere precedente a quella di richiesta di registrazione.

Il FAX di registrazione deve essere inviato prima dell' inizio del trattamento chemioterapico

La richiesta di registrazione deve essere firmata da uno dei ricercatori del centro abilitati per tale procedura.

La registrazione può essere inviata al Centro Raccolta Dati ISG a qualsiasi ora della giornata.

Nel FAX di conferma il campo "codice paziente" includerà un codice composto dalle iniziali del paziente seguito dal numero progressivo di arruolamento del Centro e dal codice del centro (ad esempio, il paziente Mario Rossi, primo paziente inserito dal Centro avente codice 004, avrà un codice MR1004).

Il FAX di conferma della registrazione verrà inviato al numero di FAX che il ricercatore indicherà nella registrazione.

Una volta in possesso della conferma della registrazione e del codice paziente, il Centro potrà iniziare ad inserire i dati nel Database dell' Italian Sarcoma Group www.isg-area-riservata.org/dh/.

Audits

Per assicurare la qualità dei dati verranno previste dal Centro Raccolta Dati ISG delle visite di monitoraggio. I ricercatori, nel momento in cui richiederanno la partecipazione al protocollo accetteranno di ricevere le visite di monitoraggio e di collaborare attivamente con gli incaricati delle visite mettendo loro a disposizione cartelle cliniche e qualsivoglia documentazione utile.

Il Centro Raccolta Dati ISG sarà responsabile della raccolta dei dati e della verifica della qualità degli stessi.

Il Centro Raccolta Dati ISG appronterà report che a cadenza semestrale verranno inviati al Comitato di Coordinamento.

Le segnalazioni di eventi avversi severi (SAE vedi) attesi ed inaspettati verranno raccolti dall' Unità per la sicurezza dello studio che provvederà a notificare ai responsabili del Centri partecipanti e alle autorità preposte se necessario. Un report semestrale di tale eventi sarà redatto e inviato per discussione al Comitato Indipendente per il Monitoraggio dello studio e al Comitato di Coordinamento.

Eventi avversi e modalità di segnalazione

Evento avverso. Si definisce avverso un qualsiasi evento con negative conseguenze cliniche che occorra in un paziente in protocollo. Evento è un segno clinico, un sintomo o un alterato parametro di laboratorio o di diagnostica per immagini.

Gli eventi avversi attesi sono codificati nel form di raccolta dati di tossicità del protocollo. Ciascun sperimentatore li riporterà nel form di raccolta dati di tossicità di norma entro il mese successivo il loro riscontro.

Evento avverso inatteso. In caso di evento inatteso (non compreso cioè negli eventi avversi codificati) sarà compito dello sperimentatore la segnalazione mediante apposito modulo (vedi) al centro raccolta dati ISG.

Evento avverso severo. Un evento avverso è considerato severo (SAE) qualora si associ a morte, a condizione che metta a rischio la vita del paziente, determini protratta ospedalizzazione o prolunghi una programmata ospedalizzazione..

Per le caratteristiche del protocollo ricoveri ospedalieri per trasfusioni o per neutropenia febbrile non debbono essere considerati alla stregua di eventi avversi severi, ma semplicemente riportati nel form di raccolta dati di tossicità.

In caso di SAE essi dovranno essere notificati tramite FAX utilizzando lo specifico modulo allegato.

Il FAX deve essere inviato entro 24 ore dalla avvenuta conoscenza dell' evento

Il FAX deve essere inviato a

ISG/OS-2

Centro Raccolta Dati ISG

Fax: 051 6366107

Sarà cura del Centro Raccolta Dati ISG notificare l' evento alle autorità competenti, al Centro coordinatore e ai responsabili dello studio nei centri partecipanti.

Comitato di Coordinamento

Il comitato di coordinamento è composto dal coordinatore dello studio e da rappresentanti dei centri che hanno attivamente partecipato alla stesura del presente studio. Altri centri potranno far parte del coordinamento dopo aver arruolato almeno 5 pazienti.

Il comitato di coordinamento si riunisce di norma a cadenza semestrale e valuta i dati relativi alla progressione, efficacia e sicurezza dello studio. Alle riunioni sono invitati i membri del panel dei patologi e dei radiologi. Discute i dati relativi all' attività dei panel dei patologi e dei radiologi.

A cadenza annuale predisporre un report che verrà inviato a tutti i centri che hanno inserito pazienti nello studio.

Panel dei patologi

Il panel dei patologi è costituito da rappresentanti dei centri ISG/AIEOP che aderiscono al protocollo:

Servizio di Anatomia Patologica, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna.

Servizio di Anatomia Patologica, Istituto Gaetano Pini, Milano

SOD di Istologia Patologica -Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi Firenze.

Servizio di Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera O.I.R.M.-S. Anna. Torino.

Servizio di Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera di Padova

Servizio di Anatomia Patologica, IFO, Roma

Servizio di Anatomia Patologica, Ospedale Pediatrico Gaslini, Genova

Ha il compito di rivedere le diagnosi istologiche e le risposte istologiche alla chemioterapia. Il panel, di norma, si riunirà almeno due volte all' anno.

Panel dei Chirurghi ortopedici

Il panel dei **Chirurghi ortopedici** è costituito da rappresentanti dei seguenti centri:

Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna.

Istituto Gaetano Pini, Milano

Azienda Ospedaliera Careggi Firenze.

Azienda Ospedaliera ASO CTO-ICORMA Torino.

Istituto Regina Elena, Roma

Azienda Ospedaliera di Padova

Ha il compito di esaminare gli aspetti chirurgici connessi con il presente protocollo di studio.

Valutazione della Qualità di Vita

Un programma di valutazione della qualità della vita sarà formulato in un addendum al presente protocollo.

Selezione dei pazienti

Criteri di inclusione:

Diagnosi, istologicamente confermata, di osteosarcoma ad alto grado delle estremità

Età ≤ 40 anni

Malattia localizzata o eventuale presenza di skip metastasis

Normale funzione epatica, renale e midollare

Frazione di Eiezione ventricolare sin > 50%

Assenza di precedenti trattamenti chirurgici e/o chemioterapici per osteosarcoma

Intervallo fra la diagnosi istologica e l' inizio della chemioterapia non superiore a 4 settimane

Sottoscrizione del modulo di consenso alla partecipazione allo studio da parte del soggetto interessato a da chi esercita la potestà

Invio al Centro raccolta dati di adeguata documentazione istologica per valutazione centralizzata dell' espressione di ABCB1/P-glycoprotein e possibilità di determinare l' espressione di ABCB1/P-glycoprotein secondo quanto previsto nella allegata procedura.

Criteri di esclusione:

Presenza di metastasi polmonari alla TC del torace, presenza di metastasi in altre sedi

Osteosarcoma periosteo, parostale, osteosarcoma secondario

Controindicazioni mediche all' uso dei farmaci previsti dal protocollo

Stato di gravidanza e/o allattamento in atto

Condizioni mentali o sociali che non garantiscano una adeguata adesione al protocollo, una corretta gestione domiciliare della tossicità, una adeguata comprensione della partecipazione allo studio

Inquadramento diagnostico e follow up

Base:

Obbligatori

Rilevazione anamnestica di segni e sintomi d' esordio, esame fisico generale e locale

Emocromo completo con formula; Fosfatasi alcalina, LDH; transaminasi, bilirubinemia, creatininemia e clearance della creatinina. Test di gravidanza nelle donne in età fertile.

ECG

Ecocardiogramma con valutazione della frazione di eiezione

Rx segmento osseo interessato

RMN del segmento osseo interessato con mdc

TC segmento osseo interessato con mdc

Scintigrafia scheletrica con Tc99 MDP

TC torace senza mdc

Facoltativi/suggeriti

Raccolta dello sperma nei pazienti postpuberi

Esame audiometrico

Pre trattamento
chirurgico

Esame fisico generale e locale

Emocromo completo con formula; Fosfatasi alcalina, LDH; transaminasi, bilirubinemia, creatininemia e clearance della creatinina.

ECG

Rx segmento osseo interessato

RMN del segmento osseo interessato

TC segmento osseo interessato

TC torace senza mdc

A termine di
trattamento

Esame fisico generale e locale

Emocromo completo con formula; Fosfatasi alcalina, LDH; transaminasi, bilirubinemia, creatininemia e clearance della creatinina.

ECG

Rx segmento osseo interessato

TC torace senza mdc

Ecocardiogramma con valutazione della frazione di eiezione

Esame audiometrico (SUGGERITO)

Esame dello sperma nei pazienti postpuberi (SUGGERITO)

Nei controlli di follow up	<p>I controlli di follow up avvengono con frequenza trimestrale nel primo anno post chemioterapia, quadrimestrale nel 2° e 3° anno, semestralmente fino al decimo anno.</p> <p>Esame fisico generale e locale</p> <p>Emocromo completo con formula; Fosfatasi alcalina, LDH; transaminasi, creatininemia (nei primi tre anni)</p> <p>Rx segmento osseo interessato (nei primi tre anni, quindi secondo valutazione ortopedica)</p> <p>TC torace senza mdc (a partire dal 5° anno può essere sostituita da Rx Torace)</p> <p>Ecocardiogramma con valutazione della frazione di eiezione (con frequenza annuale nei primi tre anni)</p> <p>Esame audiometrico (se patologico al controllo a termine di trattamento)</p> <p>Scintigrafia scheletrica in caso di sospetto clinico di ripresa scheletrica di malattia.</p>
----------------------------	--

Chemioterapia

a) Considerazioni generali

Funzione midollare	<p>I cicli a base di cisplatino, Adriamicina e ifosfamide richiedono un numero di neutrofili ≥ 1000 e di piastrine ≥ 100.000. I cicli a base di methotrexate richiedono un numero di neutrofili ≥ 1000 e di piastrine ≥ 80.000.</p>
Funzione renale	<p>I cicli a base di cisplatino, ifosfamide e methotrexate richiedono una creatininemia entro limiti di norma. In caso di precedente ritardata eliminazione di methotrexate con o senza nefrotossicità, o in caso di precedente nefrotossicità è necessario controllare la clearance della creatinina che deve essere superiore a 75 ml/min. Nei casi dubbi è necessario contattare il centro coordinatore.</p>

Funzione cardiaca	<p>Prima di eseguire Adriamicina è necessario eseguire controllo ECG; un controllo ecocardiografico è richiesto una volta raggiunta una dose cumulativa di 240 mg/m². In presenza di alterazioni ECG, segni/sintomi che possono essere ricondotti a deficit di pompa non si somministra Adriamicina. In tale caso l'assistito viene sottoposto ad accertamenti funzionali cardiologici. In assenza di rilievi patologici si somministra Adriamicina. Una riduzione della frazione di eiezione superiore al 10% rispetto ai valori basali controindica la somministrazione di Adriamicina salvo un ripristino della funzione ai controlli evolutivi.</p>
Funzione epatica	<p>Valori di transaminasi uguali o superiori a 5 volte i valori massimi normali controindicano la somministrazione di methotrexate.</p> <p>In presenza di valori di transaminasi non adeguati, si posticiperà la somministrazione di methotrexate fino al rientro dei valori. In caso di mancato rientro delle transaminasi entro 2 settimane dal tempo previsto per la somministrazione, il previsto ciclo di methotrexate viene omesso ed il trattamento prosegue con il ciclo successivo. Alla ripresa del MTX il dosaggio di MTX viene ridotto a 10g/m²</p> <p>In caso di Transaminasi > 20 volte il valore massimo della norma, il ciclo successivo viene scalato a 10g/m², in caso di ulteriore episodio di ipertransaminasemia G4 il ciclo successivo viene somministrato a 8g/m².</p>
Trattamento antiemetico	<p>Il trattamento antiemetico sarà somministrato secondo modalità proprie dei centri partecipanti, tuttavia nei cicli a base di cisplatino, Adriamicina e ifosfamide si richiede almeno l'uso di un farmaco inibitore 5HT₃ associato a desametasone.</p>
Monitoraggio della tossicità ematologica	<p>I cicli a base di cisplatino, Adriamicina e ifosfamide richiedono un controllo dell'emocromo da eseguirsi a giorni alterni a partire dalla settima giornata dall'inizio della somministrazione del chemioterapico. Si suggerisce di fornire ai partecipanti allo studio o ai loro genitori una scheda di registrazione della tossicità riscontrata a domicilio.</p>
Uso di G-CSF	<p>L'uso di G-CSF viene prescritto nel caso di conta neutrofili < 500 o in caso di precedente neutropenia G4 riscontrata in un precedente, analogo ciclo. Il trattamento con G-CSF viene interrotto con conta neutrofili > 10.000. La chemioterapia può essere cominciata solo dopo 48 ore dall'ultima somministrazione. L'uso della forma pegilata è consentito a giudizio clinico</p>

b) Somministrazione dei chemioterapici

Methotrexate (MTX)

Dose: 12g/m²

Infusione: endovena in 4 ore (T0-T4)

Soluzione base: 1 litro di soluzione base per MTX contiene soluzione fisiologica, KCl 20 mEq, Sodio Bicarbonato 60 mEq.

Preidratazione/prealcalinizzazione: Nelle 2 ore precedenti l'infusione del farmaco (T0) somministrare 500 ml/m² di soluzione base.

Il farmaco viene disciolto in soluzione base

Idratazione/alcalinizzazione nelle 20 ore successive (T4-T24) al termine della somministrazione del farmaco: 2 litri/m² di soluzione base

Idratazione T0-T24: 2,5 litri/m²

Alcalinizzazione T0-T24: bicarbonato 4 mEq/kg

Nelle 24 ore successive (T24-T48) idratazione endovenosa con 2 litri/m² di soluzione base

Lederfolin: A partire da T24 somministrare 1 compressa ogni 6 ore per undici somministrazioni (fino a T84)

MTXemia: La MTXemia deve essere determinata, ai tempi T24, T48, o comunque fino a MTXemia < 0.2µM. E' suggerita la determinazione della MTXemia al tempo T4. Per T4 è raccomandato l'uso di una vena periferica, per le ulteriori determinazioni può essere utilizzato il catetere venoso centrale.

pH urine: si consiglia controllo del pH urinario a T0-T12 e T24. Con valori inferiori a 7 si somministra sodio bicarbonato 1 mEq/kg in 30' EV.

Ematochimici: Controllare giornalmente emocromo, creatinina, elettroliti, transaminasi, es. urine.

Cisplatino (CDP)

Dose: 120 mg/m²

Infusione: endovena in 48 ore, disciolto in soluzione base.

Soluzione base: Soluzione fisiologica con 15 mEq KCl/L e 3 mEq/L Mg .

Preidratazione: 500 ml/m² di soluzione base in 2 ore

Idratazione: 2 L/m²/die per due giorni in infusione continua

Postinfusione: 500 ml/m² di soluzione base in 2 ore

Adriamicina (ADM)

Dose: fase preoperatoria: 75 mg/m²

fase postoperatoria: 90 mg/m²

Infusione: ~~In caso di uso di Cardioxane, esso viene utilizzato in un rapporto 10:1 rispetto alla quantità di Adriamicina infusa. La somministrazione di Cardioxane avviene per,~~ l' Adriamicina, in analogia con le modalità adottate da protocolli internazionali (<http://www.ctu.mrc.ac.uk/euramos/default.asp>), viene somministrata per infusione continua per una durata di 48 ore.

Ifosfamide (IFO)

Viene utilizzata i pazienti con sovra espressione di ABCB1/P-glycoprotein e necrosi tumorale < 90%:

Dose:

15g/m² (3g/m²/die giorni 1,2,3,4,5)

Infusione:

Infusione continua endovenosa di 24 ore disciolto nella soluzione di infusione insieme a MESNA

Preinfusione:

endovena, 500 cc soluzione fisiologica con MESNA 400 mg/m² in 1 ora (250 cc con la medesima dose di MESNA nei pazienti pediatrici)

Infusione:

2 L/m²/die soluzione base (vedi MTX).

MESNA 100% della dose di ifosfamide somministrata.

Postinfusione:

1 L/m²/die soluzione base

MESNA 1500 mg/m² da assumere nelle 12 ore successive il termine dell' infusione di ifosfamide. (3/5 EV nella sacca di postinfusione e 2/5 per os. Se non assunto per os somministrare MESNA EV.

Ematochimici:

Emocromo, creatinina, elettroliti, es urine giorni 1, 3 e 5. Determinazione dei bicarbonati plasmatici se clinicamente indicato.

Mifamurtide (Mepact@)

Dose: 2 mg/m²

Infusione: Infusione E.V. per 60 min. Il prodotto è fornito in fiale da 4 mg con un filtro e le istruzioni per la preparazione della

sospensione.

Premedicazione con paracetamolo 10 mg/kg fino ad un massimo di 1000 mg.

MEPACT: 2 mg/m² 2 volte la settimana per i primi tre mesi (sett 9-20), 1 volta la settimana per i sei mesi successivi (sett 21-44)

Chemioterapia


Pazienti ABCB1/P-GLYCOPROTEIN negativi

MTX CDP/ADM MTX CDP/ADM Chirurgia ADM* MTX MTX CDP ADM* MTX MTX CDP ADM* MTX MTX CDP MTX MTX
 0 1 4 5 8 9 12 13 14 17 20 21 22 25 28 29 30 33 34 settimane

MTX 12g/m2 CDP 120mg/m2 ADM 75mg/m2 ADM*90mg/m2

Durata	34 settimane
ADM	420 mg/m2
MTX	120g/m2
CDP	600 mg/m2

Pazienti ABCB1/P-GLYCOPROTEIN positivi e buona risposta istologica (GR)

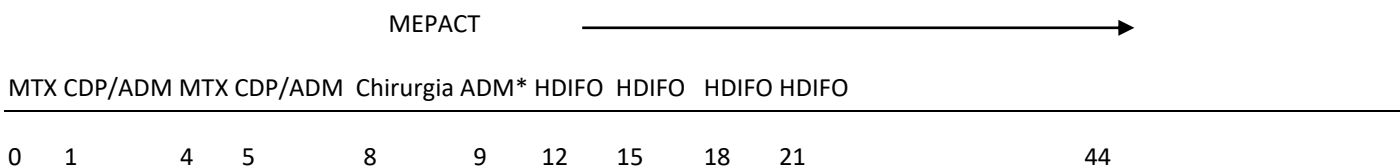
MEPACT 

MTX CDP/ADM MTX CDP/ADM Chirurgia ADM* MTX MTX CDP ADM* MTX MTX CDP ADM* MTX MTX CDP MTX MTX
 0 1 4 5 8 9 12 13 14 17 20 21 22 25 28 29 30 33 34 44

MTX 12g/m2 CDP 120mg/m2 ADM 75mg/m2 ADM*90mg/m2 MEPACT 2 mg/m² 2 volte la settimana per i primi tre mesi (sett 9-20), 1 volta la settimana per i sei mesi successivi (sett 21-44)

Durata	44 settimane
ADM	420 mg/m2
MTX	120g/m2
CDP	600 mg/m2
MEPACT	2 mg/m ² x 48 somministrazioni

Pazienti ABCB1/P-GLYCOPROTEIN positivi e scarsa risposta istologica (PR)



MTX 12g/m² CDP 120mg/m² ADM 75mg/m² ADM*90mg/m² HDIFO 15g/m² la settimana MEPACT 2 mg/m² 2 volte la settimana per i primi tre mesi (sett 9-20), 1 volta la settimana per i sei mesi successivi (sett 21-44)

Durata	44 sett
ADM	240 mg/m ²
MTX	24g/m ²
CDP	240mg/m ²
IFO	60g/m ²
MEPACT	2 mg/m ² x 48 somministrazioni

Moduli

Modulo di richiesta di registrazione

Espressione di ABCB1/P-glycoprotein come fattore per la stratificazione biologica dell' osteosarcoma non metastatico delle estremità: Studio prospettico. (ISG/OS-2)

Centro	
Data di nascita del paziente	
Sesso	
Iniziali	
Sede del Tumore	
Data di acquisizione del consenso	
Data prevista per inizio chemioterapia	
Numero di FAX cui inviare la registrazione	
Data	
Compilatore	

NB: PER LA VALUTAZIONE DI ABCB1/P-glycoprotein INVIARE ALL'ANATOMIA PATOLOGICA dell'Istituto Ortopedico Rizzoli ALMENO 5 SEZIONI IN BIANCO PIU' UNA SEZIONE COLORATA CON EMATOSSILINA/EOSINA

Da inviare a:

Dott.ssa Emanuela Marchesi

Centro Raccolta Dati ISG

Via di Barbiano 1/10

40136 Bologna.

Modulo di registrazione

Espressione di ABCB1/P-glycoprotein come fattore per la stratificazione biologica dell' osteosarcoma non metastatico delle estremità: Studio prospettico. (ISG/OS-2)

Centro	
Data di nascita del paziente	
Sesso	
Sede del Tumore	
Data di acquisizione del consenso	
Codice Paziente	
Data	
Compilatore	

Modulo di invio di materiale istologico per la valutazione dell' espressione di ABCB1/P-glycoprotein

Espressione di ABCB1/P-glycoprotein come fattore per la stratificazione biologica dell' osteosarcoma non metastatico delle estremità: Studio prospettico. (ISG/OS-2)

Centro	
Codice paziente	
Numero di FAX cui inviare il referto	
Data	
Compilatore	

Da inviare a:

Dott.ssa Emanuela Marchesi

Centro Raccolta Dati ISG

c/o Laboratorio di Ricerca Oncologica

Via di Barbiano 1/10

40136 Bologna.

Modulo di invio di referto centralizzato di espressione di ABCB1/P-glycoprotein

Espressione di ABCB1/P-glycoprotein come fattore per la stratificazione biologica dell' osteosarcoma non metastatico delle estremità: Studio prospettico. (ISG/OS-2)

Referto Centralizzato	
Codice paziente	
Espressione di ABCB1/P-glycoprotein	
Data	
Firma del Refertatore	



ISG/OS-2

SCHEDA DI EVENTO AVVERSO SEVERO

Medico:	Istituto	Indirizzo
---------	----------	-----------

Nome paziente:	Rapporto Iniziale	Follow up	Data
Diagnosi	Sesso	Età	

<p>Evento:</p> <p>Descrizione dell' evento (dati clinici e di laboratorio)</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>Continua pag 2.</p>	<p>Categoria dell' evento:</p> <p><input type="checkbox"/> Morte</p> <p><input type="checkbox"/> Pericolo di vita</p>
---	---

Ciclo di chemioterapia	Data di somministrazione		Dose/m2
------------------------	--------------------------	--	---------

Terapie concomitanti:

Trattamento per l' evento



SCHEDA DI EVENTO AVVERSO SEVERO

Medico:	Istituto	Indirizzo
---------	----------	-----------

Nome paziente:	Rapporto Iniziale	Follow up	Data
----------------	-------------------	-----------	------

Descrizione dell' evento (continua):

Firma del medico:

Nome (stampatello).....FirmaData.....

La scheda viene inviata a:

Centro Raccolta Dati ISG

FAX 051 6366 107

Allegato 1

LINEE GUIDA PER L'ANALISI IN IMMUNOISTOCHEMICA DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLA PROTEINA ABCB1/P-GLYCOPROTEIN IN SEZIONI ISTOLOGICHE DI OSTEOSARCOMA UMANO

Premessa

La storia naturale dell'osteosarcoma ad alto grado è caratterizzata da un decorso clinico generalmente rapido e, spesso, infausto. La crescita locale del tumore è, in genere, piuttosto veloce, anche se esistono casi di osteosarcoma ad accrescimento relativamente lento. L'osteosarcoma ad alto grado tende inoltre a metastatizzare piuttosto precocemente per via ematica soprattutto ai polmoni e, in fasi in genere successive, anche allo scheletro. Le metastasi scheletriche infatti, quando presenti, sono quasi sempre associate alla presenza di pregresse metastasi polmonari.

La terapia attuale dell'osteosarcoma ad alto grado si basa su un trattamento chirurgico, volto alla rimozione del tumore, associato a schemi di trattamento polichemioterapico pre- e post-operatori. Studi clinici e sperimentali volti ad identificare i parametri dotati di maggiore valore prognostico nell'osteosarcoma ad alto grado hanno evidenziato nella necrosi chemioindotta dal trattamento pre-operatorio, nel volume del tumore, nell'età del paziente e, soprattutto, nell'espressione della proteina ABCB1/P-GLYCOPROTEIN al momento della diagnosi fattori in grado di predire la risposta clinica del tumore al trattamento farmacologico e/o la prognosi del singolo paziente. La valutazione immunohistochemica dei livelli di ABCB1/P-GLYCOPROTEIN al momento della diagnosi può quindi costituire la base per l'identificazione di pazienti affetti da osteosarcoma ad alto grado potenzialmente non-responsivi al trattamento chemioterapico.

Metodologia: PROCESSAZIONE DEI CAMPIONI

- **Fissare il campione di tessuto in formalina tamponata o paraformaldeide tamponata per 6-24 ore a temperatura ambiente** (*tempi di fissazione più lunghi possono alterare la struttura della proteina con conseguente alterazione delle sue caratteristiche di immunoreattività*)
- **Possibilmente, non decalcificare il campione tissutale oppure utilizzare un metodo di decalcificazione blando** (*una forte decalcificazione può compromettere irrimediabilmente la struttura della proteina con conseguente perdita delle sue caratteristiche di immunoreattività*)
- **Includere il campione di tessuto in paraffina secondo metodologie standard**
- **Tagliare al microtomo delle sezioni di tessuto dello spessore di 4-6 µm e apporle su vetrini portaoggetto, possibilmente trattati con silano, oppure su vetrini SUPERFROST o STARFROST**
- **Fare asciugare le sezioni a temperatura ambiente o a 37°C per 15-30 minuti** (*non operare in questa fase a temperature superiori a 37°-40°C: il riscaldamento ad alte temperature può alterare la struttura molecolare della proteina con grave compromissione delle sue caratteristiche antigeniche e, conseguentemente, di rilevanza con tecniche di immunostochimica*)
- **Conservare le sezioni al riparo dalla polvere e a temperatura ambiente e procedere alla determinazione immunostochimica entro 1-2 settimane** (*tempi di conservazione più lunghi possono ridurre significativamente le caratteristiche di immunoreattività del campione tissutale*)
- **Procedere all'analisi immunostochimica seguendo la seguente metodologia standardizzata presso il Laboratorio di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna.** (*vedere bibliografia*)

Metodologia: IMMUNOISTOCHEMICA

1) DEPARAFFINAZIONE E IDRATAZIONE

Deparaffinare e idratare le sezioni istologiche a temperatura ambiente attraverso passaggi sequenziali in:

XILOLO (2 passaggi da 30 minuti cadauno)

ETANOLO ASSOLUTO (3 passaggi da 5 minuti cadauno)

ETANOLO 95% (1 passaggio da 5 minuti)

ETANOLO 70% (1 passaggio da 5 minuti)

ACQUA DISTILLATA (1 passaggio da 5 minuti)

2) INIBIZIONE DELL'ATTIVITA' PEROSSIDASICA ENDOGENA

- Per inibire l'attività delle perossidasi presenti nel campione tissutale, incubare i campioni in una soluzione al 1% di PEROSSIDO DI IDROGENO (H₂O₂ 120 volumi, soluzione al 37%) in METANOLO a temperatura ambiente per 30 minuti.

- Eseguire 2 lavaggi di 5 minuti cadauno a temperatura ambiente in phosphate buffered solution (PBS) ed uno di 5 minuti a temperatura ambiente in ACQUA DISTILLATA

3) REAGENTI UTILIZZATI PER LA RILEVAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA

- La metodica è stata standardizzata utilizzando i seguenti reagenti:

VECTASTAIN ABC KIT MOUSE IgG (code PK-4002)

- Le diluizioni degli anticorpi riportate di seguito si riferiscono quindi alla specifica utilizzazione dei reagenti contenuti nel KIT sopra citato.

4) IMMUNORILEVAZIONE DELLA PROTEINA P170

1° Giorno

- Incubare i campioni per 15 minuti a temperatura ambiente con 100-300µl di HORSE NORMAL SERUM (presente nel Vectastain ABC kit Mouse) diluito 1:50 in PBS (pH 7,2)

- rimuovere il siero dai campioni senza operare nessun lavaggio addizionale

- Incubare i campioni con 100-300µl di anticorpo anti- ABCB1/P-GLYCOPROTEIN (*vedere NOTE*) diluito in PBS (pH 7,2) "overnight" (12-16 ore) a +4°C in una camera di incubazione umidificata

2° Giorno

- Eseguire 2 lavaggi di 5 minuti cadauno a temperatura ambiente in PBS ed uno di 5 minuti a temperatura ambiente in ACQUA DISTILLATA
- Incubare i campioni per 30 minuti a temperatura ambiente con 100-300µl di ANTICORPO ANTI-MOUSE BIOTINILATO (presente nel Vectastain ABC kit Mouse) diluito 1:300 in PBS (pH 7,2)
- Durante l'incubazione con l'anticorpo anti-mouse biotinilato, preparare il complesso Avidina-Biotina-Perossidasi (ABC) miscelando, a temperatura ambiente, i seguenti reagenti presenti nel Vectastain ABC kit Mouse:

9 µl di Avidina (reagente A) + 9 µl di Biotina (reagente B) + 1 ml di PBS (pH 7,2)

- Eseguire 2 lavaggi di 5 minuti cadauno a temperatura ambiente in PBS ed uno di 5 minuti a temperatura ambiente in ACQUA DISTILLATA
- Incubare i campioni per 30 minuti a temperatura ambiente con 100-300µl del complesso ABC preparato in precedenza
- Eseguire 2 lavaggi di 5 minuti cadauno a temperatura ambiente in PBS ed uno di 5 minuti a temperatura ambiente in ACQUA DISTILLATA

5) SVILUPPO DELL'IMMUNOREAZIONE

- Durante l'incubazione con il complesso ABC, scongelare un'aliquota di Diamino-Benzidina (DAB), conservata a -20°C come soluzione madre alla concentrazione di 50 mg/ml PBS (soluzione 100x)
- Diluire l'aliquota di DAB 100x aggiungendo 99 ml di PBS, al fine di ottenere una soluzione di DAB 0,5 mg/ml (soluzione 1x)
- Aggiungere alla soluzione di DAB 1x 50µl di PEROSSIDO DI IDROGENO (H₂O₂ 120 volumi, soluzione al 37%)
- Al termine dell'incubazione con il complesso ABC e dopo i lavaggi in PBS e acqua distillata (riportati sopra), incubare i campioni per 5-10 minuti a temperatura ambiente con la soluzione di DAB 1x / H₂O₂
- Incubare i campioni per 5-10 minuti a temperatura ambiente, controllando al microscopio l'entità dello sviluppo della colorazione prendendo come riferimento sezioni di tessuto di RENE NORMALE incubate con ognuno degli anticorpi anti-ABC1/P-GLYCOPROTEIN (*vedere NOTE*)
- Eseguire 1 lavaggio di 5 minuti a temperatura ambiente in ACQUA DISTILLATA
- Eseguire una colorazione di contrasto nucleare incubando i campioni per 30 secondi – 1 minuto in EMATOSSILINA
- Eseguire 1 lavaggio di 5 minuti a temperatura ambiente in ACQUA DISTILLATA

6) DISIDRATAZIONE DEI CAMPIONI

- Disidratare le sezioni istologiche a temperatura ambiente attraverso passaggi sequenziali in:

ETANOLO 70% (1 passaggio da 2 minuti)

ETANOLO 95% (1 passaggio da 2 minuti)

ETANOLO ASSOLUTO (3 passaggi da 5 minuti cadauno)

XILOLO (2 passaggi da 5 minuti cadauno)

- Apporre un vetrino coprioggetto su ogni campione utilizzando un comune mezzo di montaggio per istologia (ad esempio Entellan)

7) VALUTAZIONE DEI CAMPIONI

- I campioni vengono valutati al microscopio e classificati come segue in base all'intensità ed alla distribuzione della colorazione ottenuta dalla rilevazione degli immunocomplessi tramite DAB^(vedere bibliografia):

grado 0 assenza di colorazione (campione "negativo")

grado 1 debole colorazione in una percentuale di cellule tumorali inferiore al 10% (campione considerato ancora come "negativo")

grado 2 debole colorazione in una percentuale di cellule tumorali maggiore al 10%, in genere diffusa in tutto il campione (campione "positivo")

grado 3 intensa colorazione diffusa in tutto il campione (campione "positivo")

NOTE:

- Anticorpi utilizzati per la rilevazione immunostochimica di ABCB1/P-GLYCOPROTEIN:

JSB-1 (Sanbio, Uden, The Netherlands)

MRK16 (Kamiya Biomedical, Thousand Oaks, CA, USA)

C494 (Signet Laboratories, Dedham, MA)

L'utilizzazione di questi 3 anticorpi è giustificata dal fatto che essi reagiscono contro epitopi diversi e mutuamente esclusivi della proteina.

I tre anticorpi sopra citati, devono essere utilizzati alle seguenti concentrazioni:

12,5 µg/ml per JSB-1 (diluizione 1:20 della soluzione madre a 250 µg/ml)

1 µg/ml per MRK16 (diluizione 1:500 della soluzione madre a 500 µg/ml)

0,2 µg/ml per C494 (diluizione 1:500 della soluzione madre a 100 µg/ml)

- Per ogni campione, oltre alle sezioni incubate con gli anticorpi anti- ABCB1/P-GLYCOPROTEIN, è consigliabile aggiungere una sezione da incubare con un anticorpo anti-VIMENTINA ("controllo positivo"; serve per controllare che l'antigenicità del campione tissutale sia ancora presente) ed una sezione incubata con HORSE NORMAL SERUM ("controllo negativo"; serve per controllare l'effettiva inibizione dell'attività delle perossidasi endogene)

- Oltre alle sezioni istologiche dei campioni sui quali si vuole analizzare il livello di espressione della proteina ABCB1/P-GLYCOPROTEIN, è necessario predisporre sezioni di tessuto di RENE UMANO NORMALE incubate con ognuno degli anticorpi anti- ABCB1/P-GLYCOPROTEIN. Tali sezioni sono essenziali per calibrare l'entità della reazione di sviluppo con DAB e per controllare la specificità dell'immunoreazione (il rene infatti sovraesprime naturalmente la proteina ABCB1/P-GLYCOPROTEIN a livello dei tubuli ma non a livello dei glomeruli).

Bibliografia

M. Serra, K. Scotlandi, M.C. Manara, D. Maurici, S. Benini, M. Sarti, M. Campanacci, N. Baldini. *Analysis of P-glycoprotein expression in osteosarcoma*. European Journal of Cancer 12:1998-2002, 1995.

N. Baldini, K. Scotlandi, G. Barbanti-Brodano, M.C. Manara, D. Maurici, G. Bacci, F. Bertoni, P. Picci, S. Sottili, M. Campanacci, M. Serra. *Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome*. New England Journal of Medicine 333:1380-1385, 1995.

M. Serra, D. Maurici, K. Scotlandi, G. Barbanti-Brodano, M.C. Manara, S. Benini, P. Picci, F. Bertoni, G. Bacci, S. Sottili, N. Baldini. *Relationship between P-glycoprotein expression and p53 status in high-grade osteosarcoma*. International Journal of Oncology 14:301-307, 1999.

N. Baldini, K. Scotlandi, M. Serra, P. Picci, G. Bacci, S. Sottili, M. Campanacci. *P-glycoprotein expression in osteosarcoma: a basis for a risk-adapted chemotherapy*. Journal of Orthopaedic Research 17:629-632, 1999.

M. Serra, K. Scotlandi, G. Reverter-Branchat, S. Ferrari, M.C. Manara, S. Benini, M. Incaprera, F. Bertoni, M. Mercuri, A. Briccoli, G. Bacci, P. Picci. *Value of P-glycoprotein and clinicopathologic factors as basis for new treatment strategies in high-grade osteosarcoma of the extremities*. J Clin Oncol 21:536-542, 2003.

M. Serra, M. Pasello, M.C. Manara, K. Scotlandi, S. Ferrari, F. Bertoni, M. Mercuri, T.A. Alvegard, P. Picci, G. Bacci, S. Smeland. *May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol*. International Journal of Oncology 29:1459-1468, 2006.