

VERBALE RIUNIONE CONGIUNTA Gruppi di Lavoro (GdL) NUOVI FARMACI – BIOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE – ANATOMIA PATOLOGICA

Partecipanti:

per il **GdL Nuovi Farmaci**: Dott.ssa Silvia Sorbara (Padova); Dott.ssa Nicoletta Bertorello (Torino); Dott.ssa Maria Pia Cefalo (Roma); Dott. Luca Bergamaschi (Milano); Prof. Antonio Ruggiero (Roma); Dott.ssa Michela Casanova (Milano).

per il **GdL Biologia Molecolare e Cellulare**: Dott.ssa Martina Pigazzi (Padova); Dott.ssa Concetta Quintarelli (Roma); Dott.ssa Barbara Buldini (Padova); Dott. Giovanni Cazzaniga (Monza); Dott. Mario Capasso; Dott. Luca Lo Nigro (Catania).

per il **GdL Anatomia Patologica**: Prof. Gaetano Magro (Catania).

ospiti: Prof.ssa Alessandra Biffi (Padova); Dott. Elisa Tirtei (Torino); Dott.ssa Simona Affinita (Padova)

Assenti giustificati: Dott.ssa Lara Mussolin (Padova); Dott.ssa Rita Alaggio (Roma); Dott.ssa Daniela Montagna (Pavia); Dott.ssa Maria Ester Bernardo (Milano); Dott.ssa Giovanna D'Amico (Monza); Dott.ssa Irma Airoidi (Genova); Dott.ssa Marina Lanciotti (Genova); Dott. Carmelo Rizzari (Monza).

Inizio lavori Meeting ore 11:30.

Introduzione Dott. Luca Lo Nigro.

Viene puntualizzato l'obiettivo del meeting che nasce da una precisa mission che l'AIEOP si pone ovvero proporre la migliore terapia ai bambini affetti da patologie emato-oncologiche diagnosticate nei centri dell'associazione. Tale terapia non può non basarsi sulla migliore caratterizzazione della diagnosi, ove si possono identificare, se cercate in maniera sistematica, delle alterazioni genetiche "targettabili" mediante terapia specifica. Tale esigenza, sebbene non immediata al momento della diagnosi, diventa cruciale al momento della recidiva e vitale quando il paziente ha, come unica strada percorribile, quella di esser arruolato in protocolli sperimentali di Fase I o II disegnati per testare farmaci *versus* target molecolari.

L'incontro di oggi mette insieme chi si occupa delle terapie sperimentali (GdL Nuovi Farmaci), chi della diagnosi istologica (GdL Anatomia Patologica) e chi della caratterizzazione molecolare (GdL Biologia Molecolare). I rappresentanti dei tre GdL discuteranno sui percorsi diagnostici da implementare e sulle opportune collaborazioni da intraprendere per migliorare l'identificazione di attuali e potenziali target terapeutici, mettendo così i centri AIEOP nelle condizioni di offrire le migliori soluzioni terapeutiche ai bambini affetti da malattie emato-oncologiche.

Dott.ssa Michela CASANOVA

Espone il caso del farmaco Larotrectinib che ha come target molecolare le alterazioni del gene NTRK. Dai dati mostrati emerge la necessità di utilizzare profili comuni di studio e ricerca utilizzando indagini molecolari mediante *next-generation-sequencing* (NGS). Tale

gene risulta mutato in numerosi tumori infantili e pertanto viene proposta una terapia unica per più malattie.

Un altro esempio è l'identificazione di alterazioni nei geni ALK-ROS1-NTRK-MET nel 25% circa degli infanti affetti da Gliomi. Un altro esempio di target è il gene RET, oltre che nei tumori della tiroide, anche in rari sarcomi. Adesso è disponibile un farmaco.

Commenti: Dalla prima presentazione emerge la prima domanda: come organizzarci?

Dal momento che la Centralizzazione dei campioni della diagnosi e della successiva recidiva avviene nei laboratori di Anatomo-patologia, diventa oltremodo cruciale il ruolo degli stessi anatomopatologi.

Il prof Magro, pertanto, viene chiamato in causa per poter commentare quanto esposto e come poter proporre soluzioni organizzative. Si mette comunque in evidenza che *dal campione paraffinato si può eseguire una indagine molecolare mediante NGS.*

Proposte: Si propone una Survey sui Centri che centralizzano i pezzi bioptici per la revisione. Si propone di associare alla Centralizzazione un'analisi molecolare che identifichi alterazioni utili per la prognosi e la terapia.

Dott.ssa Concetta QUINTARELLI

Espone l'esperienza dell'OPBG su CAR-T vs GD2. La presenza del target non comporta l'immediata risposta. Pertanto, sorge spontanea la domanda: quali pathways vengono coinvolti dopo l'attivazione della proteina GD2?

Emerge anche un dato che mostra come i Linfociti T e la loro funzionalità differiscano da paziente a paziente; esattamente come l'*host* risponde in maniera diversa nei confronti della stessa chemioterapia. Viene messo in evidenza che *le CAR-T* funzionanti nei confronti di linee cellulari possono passare direttamente al paziente, secondo le indicazioni della linea regolatoria.

Dopo 6 settimane dall'infusione delle CAR-T la risposta è parziale o completa in base alla localizzazione della malattia: migliore se nel BM, meno nei linfonodi.

Poiché la proteina GD2 è sensibile al calore, nell'esecuzione dell'analisi immunoistochimica si potrebbero ottenere falsi negativi. Pertanto, è necessario un metodo di identificazione e caratterizzazione più sicuro e affidabile. Inoltre la proteina GD2 è presente anche nei casi di osteosarcoma e gliomi.

Proposte:

- Screening multicentrico per l'espressione di antigeni targets;
- Studiare eterogeneità Tumori solidi;
- Individuare i pathways da correlare alla resistenza all'Immunoterapia.

Dott.ssa Maria Pia CEFALO

La dott.ssa Cefalo esegue un excursus sulle principali terapie "nuove" nella Leucemia Acuta del bambino: dal Blinatumomab nella LLA, all'arsenico triossido nella APL, alla Midostaurina nei casi di FLT3-ITD nella LAM. Vengono mostrati i dati di efficacia del Blinatumomab nelle recidive precoci di LLA dove il Blincyto è stato inserito nel 3° blocco di terapia. Vengono fatti cenni all'uso del Bortezomib (adesso in 1° linea), dell'Inotuzumab e del Daratumumab (vs T-ALL).

Commenti:

- in relazione alla necessità di avere un unico laboratorio che possa rendere affidabile lo studio di un farmaco il dott. Cazzaniga mette in evidenza il fatto che per lo studio dell'MRD nei casi recidivati la centralizzazione delle recidive veniva fatta a Berlino per l'analisi MRD durante la terapia con Blincyto.
- Nel caso invece della Midostaurina la forza della centralizzazione in AIEOP ha convinto la Novartis (fornitrice del farmaco) ad affidarsi ai lab AIEOP per lo screening molecolare.

Proposta: in base a quest'ultimo aspetto si concretizza sempre più la proposta di individuare e perfezionare i percorsi di centralizzazione dei campioni biologici alla diagnosi affinché possano essere sottoposti ad analisi più approfondite e potenzialmente più utili per terapia target.

Dott. Mario CAPASSO

Presso il CEINGE di Napoli il dott. Mario Capasso è il responsabile dell' "NGS profiling delle recidive del Neuroblastoma". Poiché le recidive mostrano un pattern genetico diverso dall'esordio, diventa obbligatorio caratterizzarne il pattern genetico. Si tratta di un progetto definito PREcision Medicine for Neuroblastoma (PREME): prevede varie fasi compresa la costituzione di una Biobanca e di utilizzo di topi per PDX. Inoltre all'interno di questo progetto vengono anche eseguite analisi sui geni predisponenti. Finanziamento? Per partecipare al Progetto PREME si centralizza sempre a Genova.

Commenti:

- emerge un aspetto fondamentale sul Campionamento: bisogna stabilirne la qualità e i percorsi con delle Linee guida specifiche, generalmente presenti nei diversi protocolli di cura ma da ribadire e riproporre ai Centri ed agli operatori quotidiani (specializzandi?).
- Definire delle regole per: 1-) standard of care; 2-) utilizzo farmaci sperimentali.
- Scrivere Consensus per definire cosa comunicare le alterazioni identificate in NGS.

La dott.ssa Casanova interviene riferendo sul protocollo INFORM dopo richiesta di Biffi su quanto c'è in letteratura come Sequencing del NB.

Emerge un altro punto importante: Biobank di Modelli per PDX da condividere, dato che al momento sono patologia-specifici.

Dott. Luca BERGAMASCHI

MAPPYACTS (Precision medicine trials). Profilo molecolare completato: definito da IGR. Milano-Genova-Torino: Gustave Roussy + Curie.

L'8% dei casi con alterazioni genetiche trattabili con farmaci target disponibili.

Vedi Slide "Discussione" con limiti: alti costi; lungo tempo analisi; non sempre farmaci utilizzabili.

Protocollo ESMART ovvero Basket protocol con assegnazione del trattamento in relazione al profiling molecolare. Programma per INFORM e MAPPYACTS far passare il costo delle indagini al SSN.

Discussione: viene sollevata la proposta di presentare un progetto per la Ricerca Finalizzata Ministeriale 2020.

Dott.ssa Elisa TIRTEI

La dottoressa Tirtei presenta l'esperienza SAR-GEN_ITA che si pone l'obiettivo di eseguire uno studio multicentrico per l'analisi del profilo genomico dei sarcomi in pazienti pediatrici e giovani adulti al momento della diagnosi e/o alla recidiva o in caso di refrattarietà della malattia.

Criteri d'Inclusione: Osteosarcoma, Sarcoma di Ewing o Sarcoma sinoviale. L'obiettivo principale è quello di effettuare la sequenza del DNA tumorale mediante Whole Exome Sequencing (WES). Importante: non utilizzare formalina; coinvolgimento del patologo locale e poi di chi esegue la revisione ovvero il referente nazionale. Si tratterebbe di una evoluzione dello studio SAR-GEN 2016, dove sono stati messi in evidenza mutazioni non-silenti che possono essere utili per una potenziale terapia targeted. Numerosi pazienti esclusi per differente diagnosi rispetto all'Osteosarcoma, o al Sarcoma Sinoviale o Ewing.

Discussione: emergono tanti problemi: campionamento; referto; alterazioni genetiche druggable.

Dott.re Giovanni CAZZANIGA

Il dottore Cazzaniga presenta l'impatto delle analisi molecolari nella identificazione dei pazienti con LLA nel nuovo protocollo AIEOP-BFM ALL 2017. Si mette in evidenza come viene eseguita una sorta di Flow di casi particolari, con alterazioni genetiche che potrebbero beneficiare di una terapia target come i casi Ph-like ALL. Tale screening molecolare viene eseguito soprattutto nei casi che si dimostrano "resistenti" alle prime fasi del trattamento d'induzione. Emerge un dato fondamentale: i due laboratori di riferimento sono sempre in stretto contatto e insieme al centro che ha in carico il paziente dialogano continuamente nei casi dubbi e/o difficili da gestire.

Nota del redattore: Tale procedura dovrebbe essere obbligatoriamente eseguita su tutti i casi di tumore, liquido o solido, al momento della caratterizzazione diagnostica (tumore di difficile definizione isto-patologica) e in presenza di una "resistenza" alla terapia accertata all'inizio del trattamento, non solo clinicamente ma anche con metodiche radiologiche.

Commento: la Prof.ssa Biffi (Padova) ribadisce il ruolo dei due laboratori, Padova e Monza, nello sforzo diagnostico per il nuovo protocollo ed evidenzia il tema della sostenibilità economica delle spese.

Dott.ssa Martina PIGAZZI

La dottoressa Pigazzi offre un'ampia overview di un progetto di ricerca che identifica sostanze specificatamente attive verso alterazioni molecolari ben precise come AF6-MLL nel caso delle LAM t(6;11) positive, a prognosi quasi infausta. La progettualità prevede l'utilizzo di topi PDX per riprodurre le linee primarie, per effettuare test di farmaci per inibire AF6, con il ricorso a Library contenenti più di 1200 molecole.

E' stata individuata la Tioridazina che inibisce Mitocondri, incrementa Ca^{++} dentro la cellula; inibisce il citoscheletro e induce l'apoptosi. L'obiettivo è quello di produrre un analogo e testarlo su un "avatar" del paziente.

Ore 17:30 Si conclude la Riunione con alcuni punti fermi:

- 1-) Coinvolgimento attivo degli Anatomo-Patologi nella caratterizzazione completa (istologico+molecolare) dei tumori solidi;
- 2-) Individuazione di Laboratori di riferimento per le analisi molecolari da eseguire, fornendo massima disponibilità e informazioni a tutti i Centri AIEOP.
- 3-) Diretta conseguenza dei punti 1 e 2: identificazione precoce di quei casi che potrebbero beneficiare di una terapia "sperimentale mirata all'alterazione genetica identificata".
- 4-) Supportare le progettualità biologiche (Caratterizzazione dei Pathways coinvolti nell'attivazione della molecola GD2; NGS Neuroblastomi e Sarcomi; Identificazione di nuovi compounds farmacologicamente attivi nei confronti di target molecolari) che mirano a chiarire i fenomeni patogenetici dei tumori pediatrici con particolare riguardo verso le alterazioni genetiche che possono potenzialmente esser considerate "target terapeutici".
- 5-) Mantenere attiva la connection tra i GdL di Biologia, Nuovi Farmaci e Anatomia Patologica allo scopo di elevare gli standard diagnostico-terapeutici all'interno di AIEOP.
- 6-) Coinvolgere i giovani specializzandi del Gruppo Discovery per riprendere e ripetere sempre che le modalità del campionamento e della centralizzazione dei campioni diagnostici sono fondamentali per l'identificazione delle alterazioni molecolari malattia-specifiche.



Verbale redatto dal Dott. Luca Lo Nigro e approvato dalla Dott.ssa Michela Casanova.