



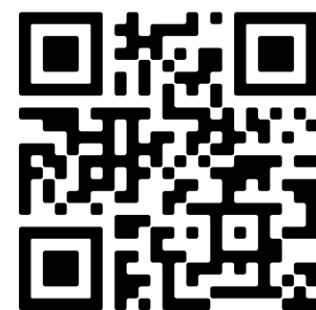
**XLIX**  
CONGRESSO  
NAZIONALE  
**AIEOP**

**Sessione V - Alterazioni Genomiche**

# **Analisi della RAF Pathway**

**Enrico Opocher**

UOC Oncoematologia pediatrica,  
Azienda Ospedaliera Università degli Studi di Padova



# Disclosures

*Il sottoscritto **Enrico Opocher**, ai sensi dell'art. 3.3 sul Conflitto di Interessi, pag. 17 del Reg. Applicativo dell'Accordo Stato-Regione del 5 novembre 2009, dichiara che negli ultimi due anni ha avuto rapporti diretti di finanziamento con i seguenti soggetti portatori di interessi commerciali in campo sanitario:*

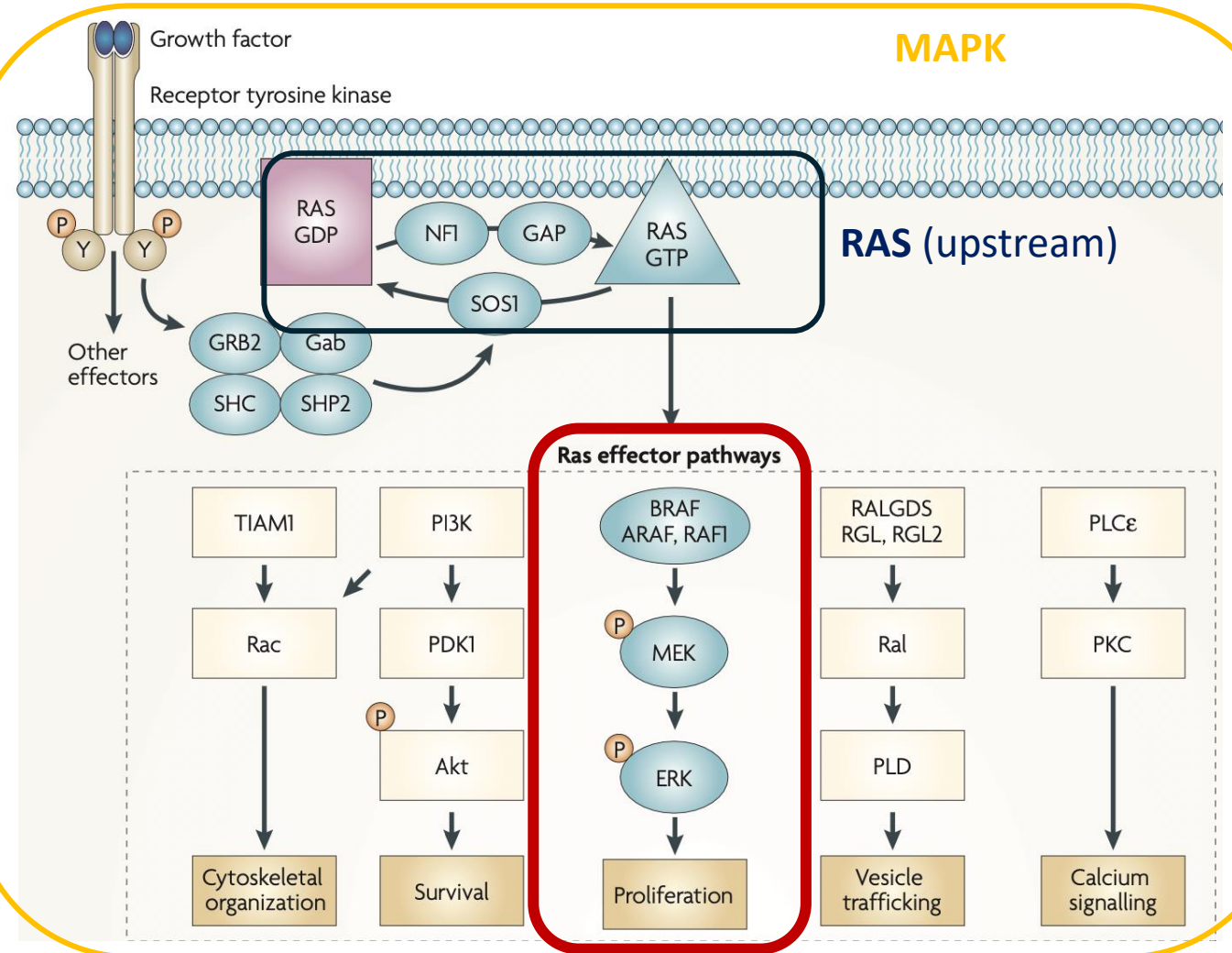
- ***Alexion** (Astra Zeneca Rare Disease): Advisory board, Attività educazionali, Speakers' bureau, Partecipazione Eventi Sponsorizzati (2018 - oggi)*
- *Alcune slides e materiale tratti/adattati dall'incontro ACCELERATE sui MAPKi (2022) ref Pearson A et Al, EJC 2023*

## Contenuti della presentazione

1. ***Knowing RAF*** - Attori e Ruolo della *Pathway* nei Tumori Pediatrici
2. ***Targeting RAF*** - Fallimenti, Successi e Lavori in corso
3. ***Deciphering RAF*** – Criticità e Meccanismi di Regolazione della *Pathway*

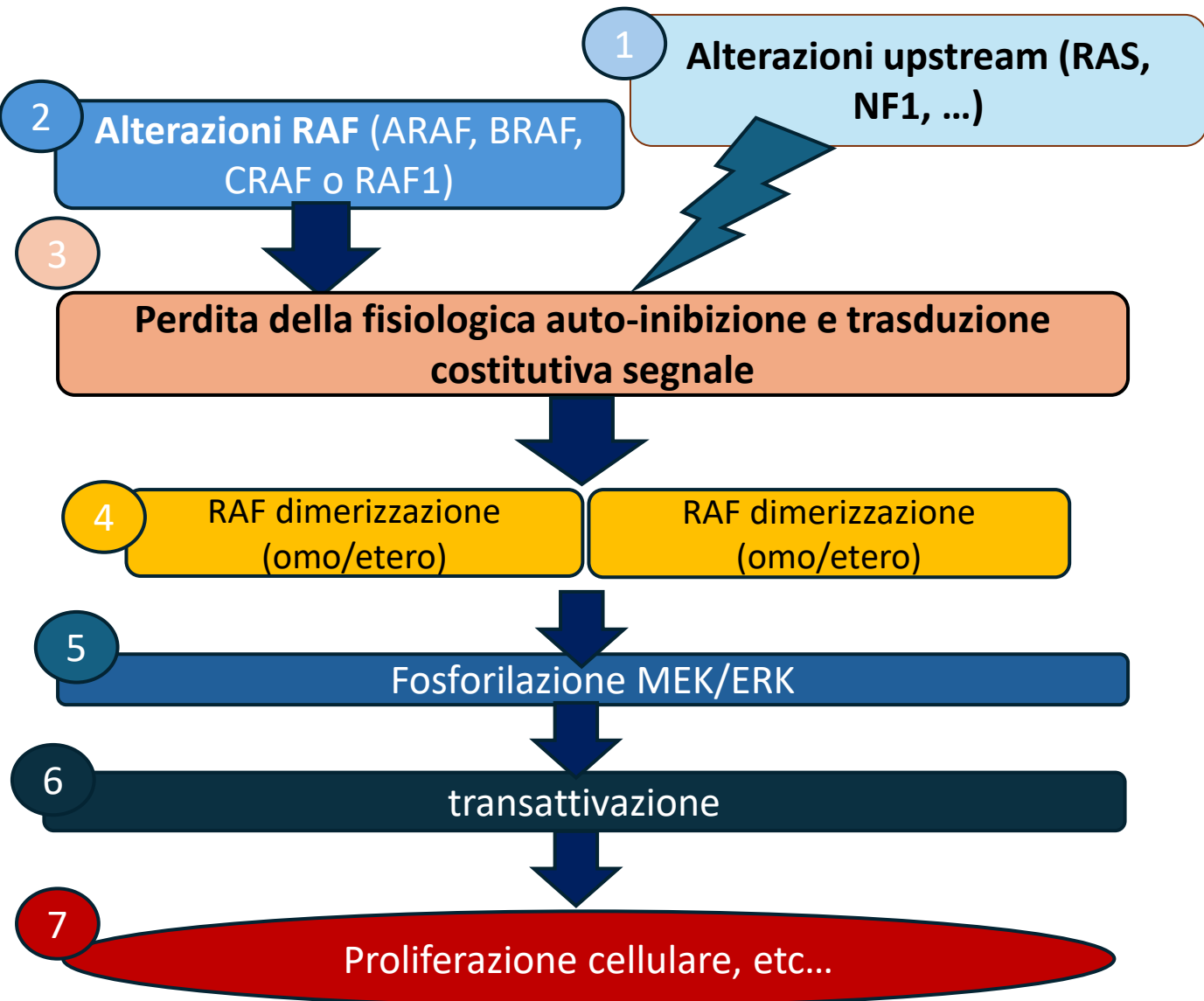
# Attori della RAF Pathway - Definizione e Rilevanza

- **Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (RAF)** è la componente *downstream* ed effettrice della via **MAPK** (**Mitogen-Activated Protein Kinase**)
- Composta da proteine ad attività serin/treonin chinasi (**A-RAF, B-RAF, C-RAF**), **MEK** ed **ERK**
- Ruolo altamente conservato nella regolazione di **proliferazione, differenziazione e sopravvivenza cellulare**

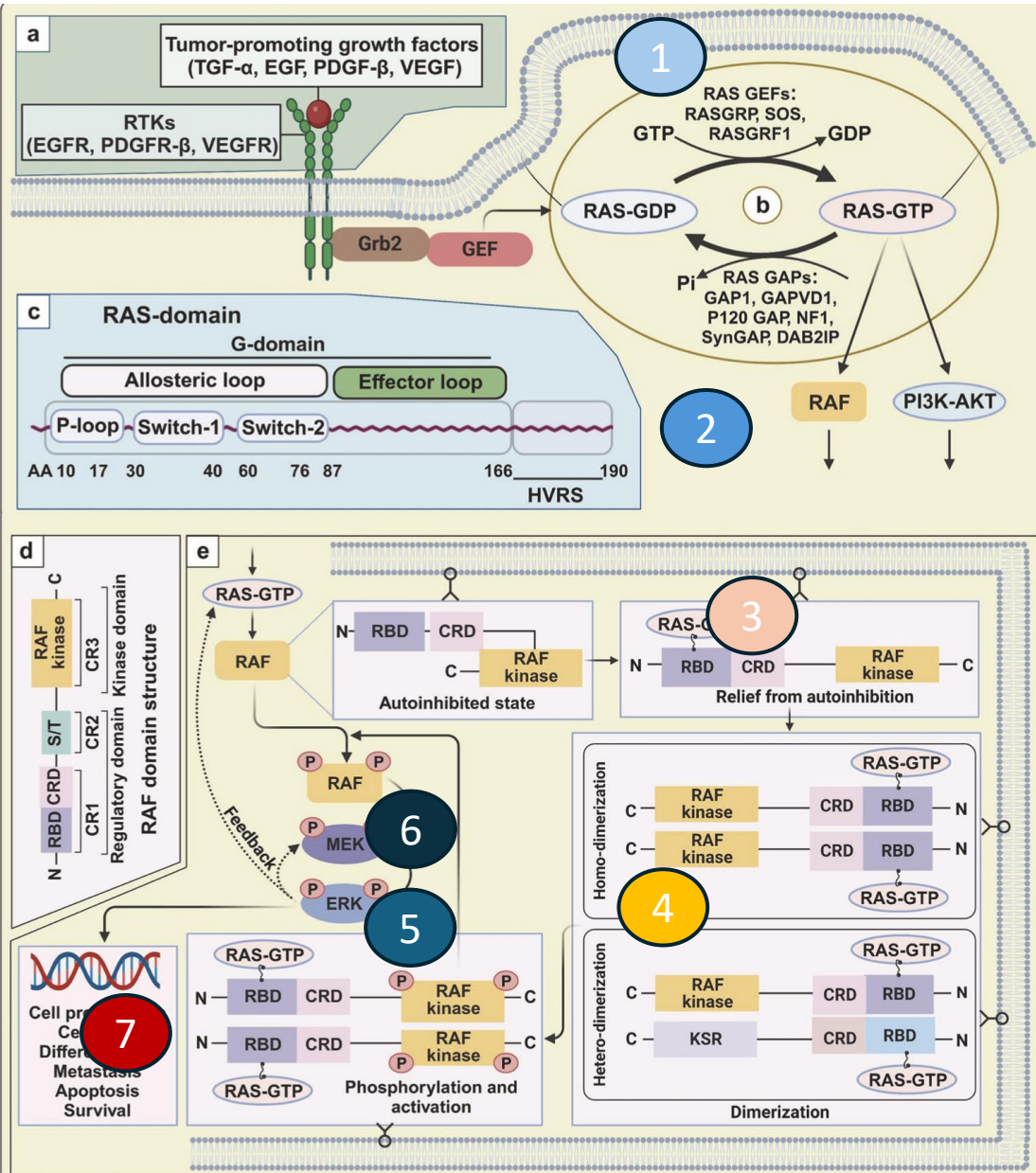




Meccanismi di attivazione costitutiva della via RAS/RAF/MEK/ERK

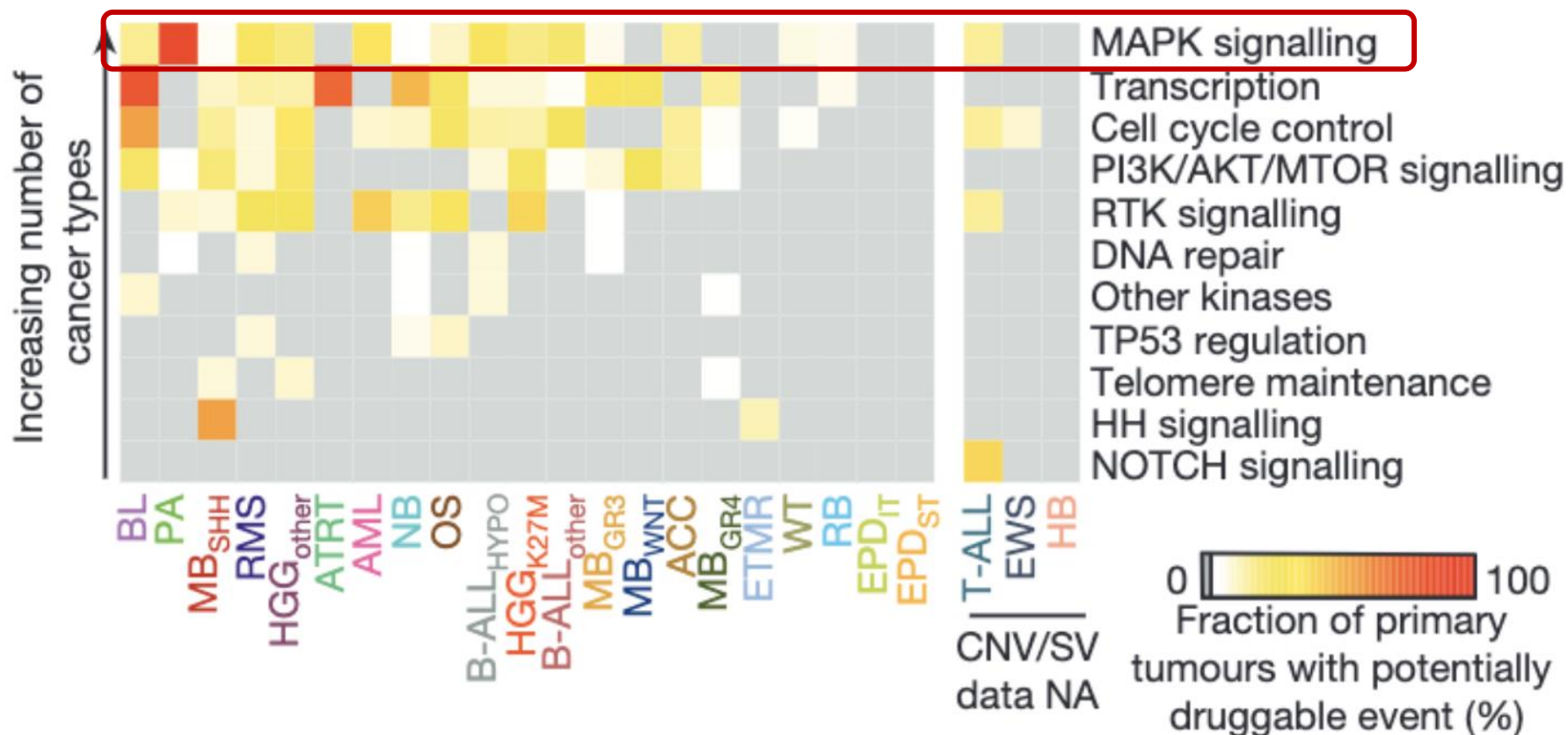


Bahar EM Signal Transduction and Targeted Therapy (2023)8:455



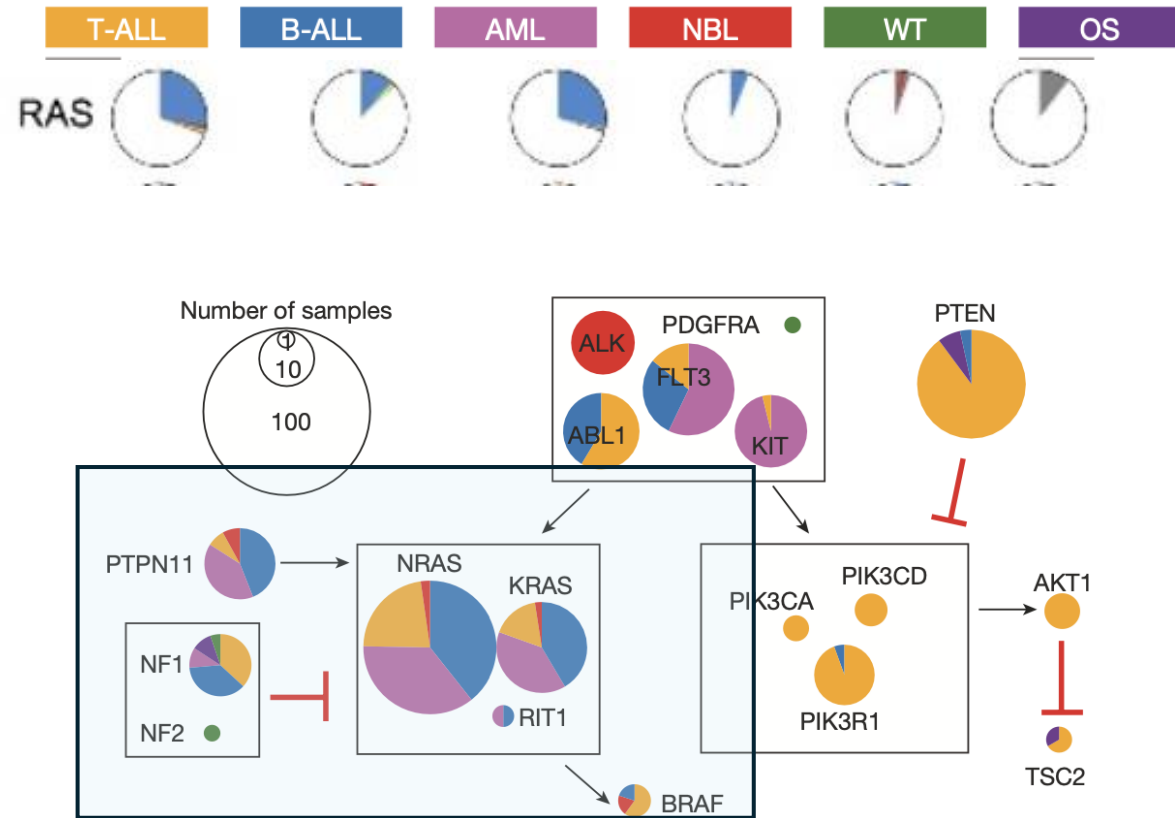
# Alterazioni MAPK sono frequenti in diversi tumori pediatrici

The landscape of genomic alterations across childhood cancers (n = 961)



# Alterazioni *upstream* (RAS) nei tumori ematologici e solidi

A pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours



## Neoplasie pediatriche freq. associate ad alterazioni RAS:

### Tu Ematologici

- LMA, LAL (T > B) ~25-35%
- JMML (>90%)

### Tu Solidi

- RMS Fusion negative (FN)~ 30%
- NB (5-15% diagnosi, ~ 30% alla ricaduta)
- Tumori *adult-type* (melanoma, CCR)
- Altri (rari)

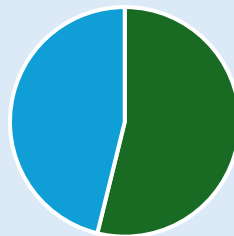
+ Alterazioni costituzionali (NF1, PTPN11, CBL) nel contesto di RASopatie – JMML, LGG, PN, RMS, NB, etc...

## Alterazioni *Downstream* (RAF) nei Tumori Pediatrici

A comprehensive genomic profiling on **3,633** pediatric cancer samples (Foundation medicine)

- Alterazioni di *RAF* (BRAF o *RAF1/CRAF*) in 6% (n= 221) dei casi analizzati

44.3% Riarrangiamenti BRAF (fusioni o in/del)



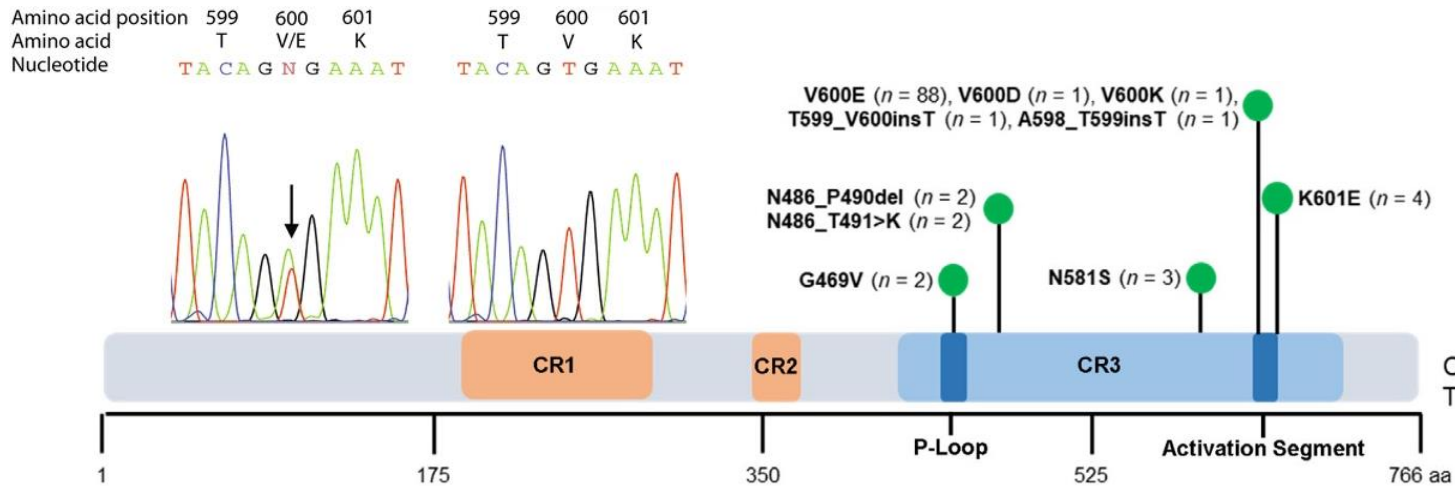
55.7% Variazioni a Singolo Nucleotide (SNV)

- Presenti in sei diverse categorie istologiche ...e molti sottotipi !
  - SNC Gliali (n= 131, **74.4%**) - Pilocitico, Gangliogliomi, PXA, eGBM, DNET,...
  - Adult-type*: Ca papillare tiroide (n= 19, **10.8%**), melanoma
  - Ematologici: LCH (n = 16, **9.1%**),
  - Sarcomi tessuti molli/mesenchimali (n =6, **3.4%**),
  - Altri tumori embrionari: Neuroblastoma, altri (n =4, **2.3%**)



# Variazioni a Singolo Nucleotide (SNV) BRAF (mutazioni)

> 80% valina per acido glutamico posiz 600 seq aminoacidica con T → A nucleotide 1799 (BRAF v600e)



## Neoplasie associate:

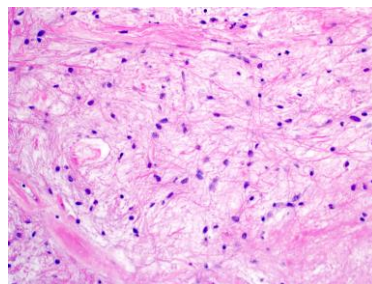
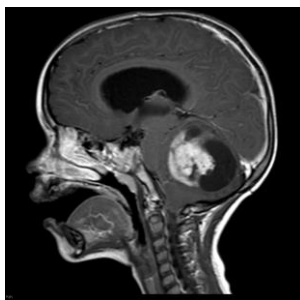
- LCH
- Gliomi (LGG/HGG)
- Melanomi
- Ca Papillare Tiroide
- ...

## Strumenti Diagnostici (DNA/FFPE)

- ICH (screening)
- RT-PCR, DD-PCR +/- NGS panels (conferma)



# Riarrangimenti BRAF nei Tumori SNC (ed altri...)

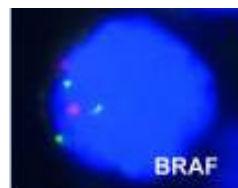
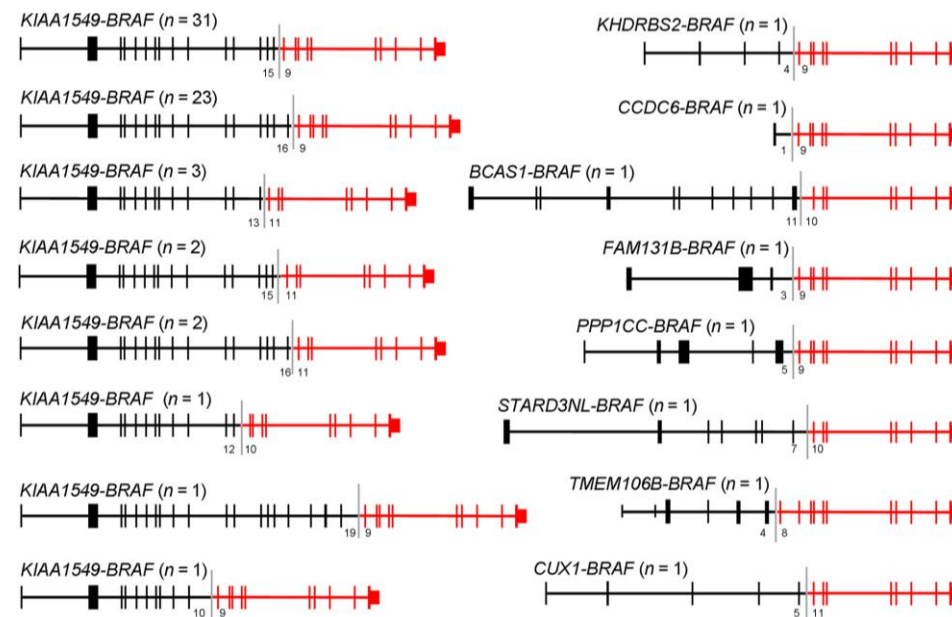
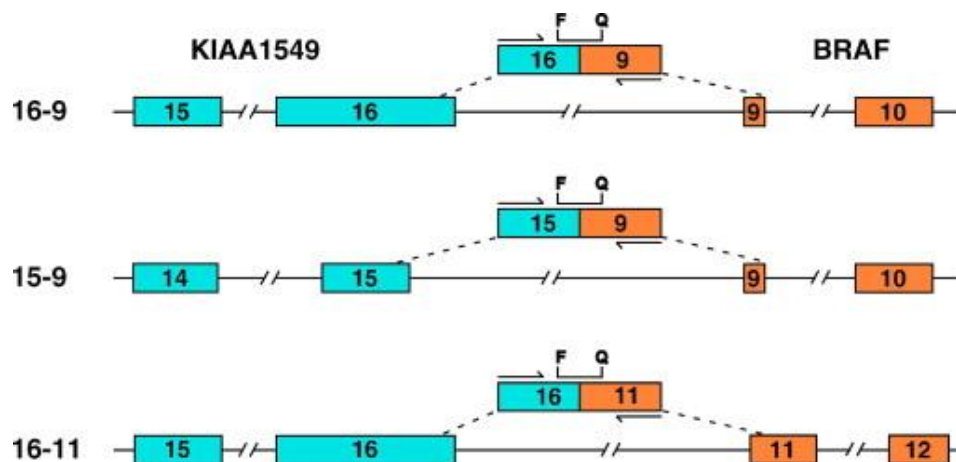


Internal Tandem Duplication (ITD) of 7q34 con trascritto di fusione ***KIAA1549:BRAF*** negli ***astrocitomi pilocitici (WHO grado 1)***

+

Tumori mesenchimali  
(IFS-like)

LCH

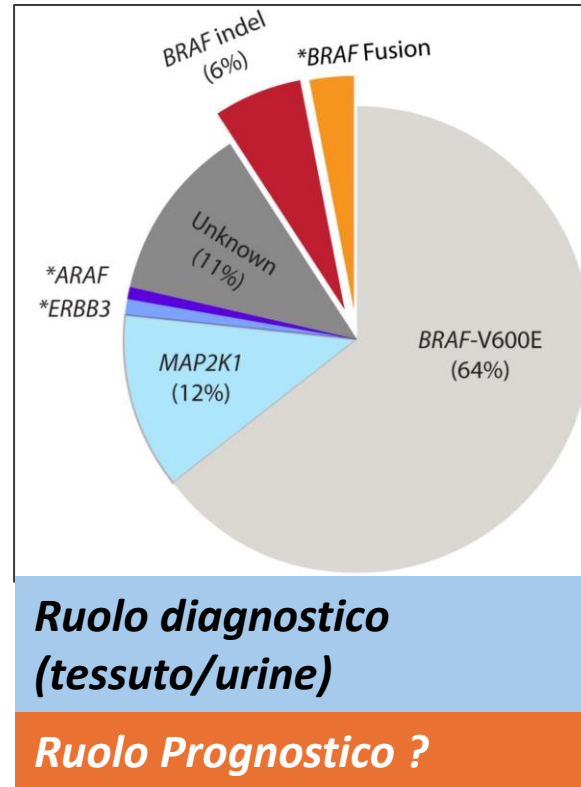


## Strumenti diagnostici

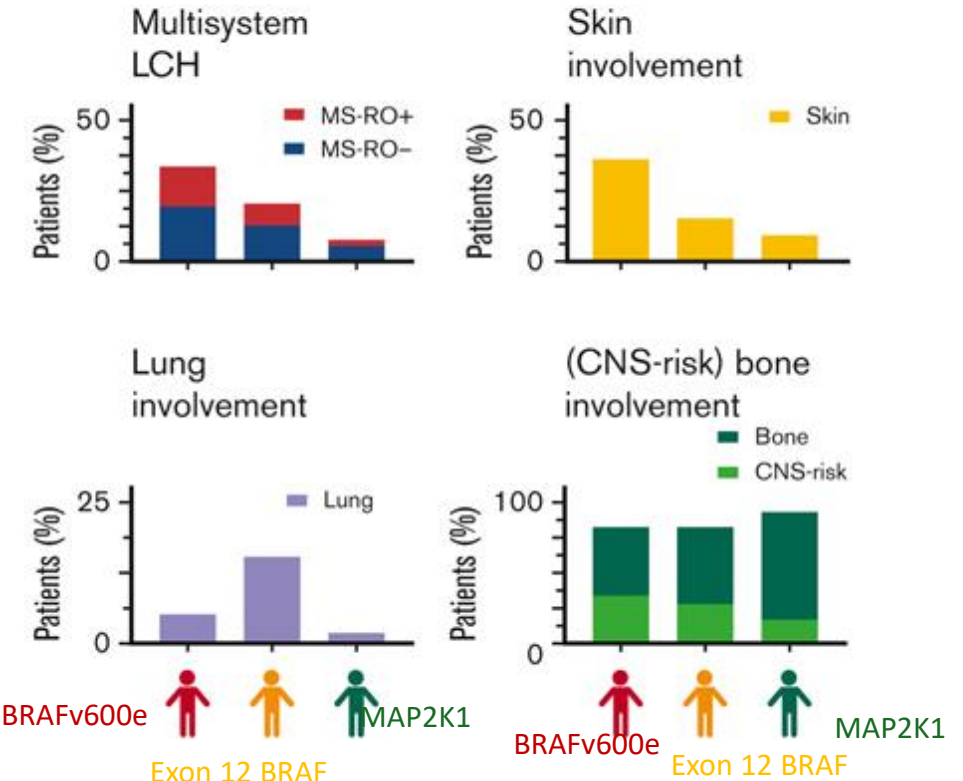
- FISH
- DD-PCR, nanostring, RNA-seq (per fusioni non note)

# Istiocitosi a Cellule di Langherans (LCH) – un caso di neoplasia *MAPK pathway-driven*

- **~90% LCH attivazione RAF**
  - >> Mutazioni (BRAFFv600e, exon 12, MAP2K1, ARAF)
  - Rare Fusioni o in/del BRAF
- **BRAF+ associato a forme più aggressive (e precoci) di LC**
  - MS,
  - Multifocal skin,
  - (SNC-risk) bone,
  - Lung (exon 12)
  - ND-LCH
  - GI

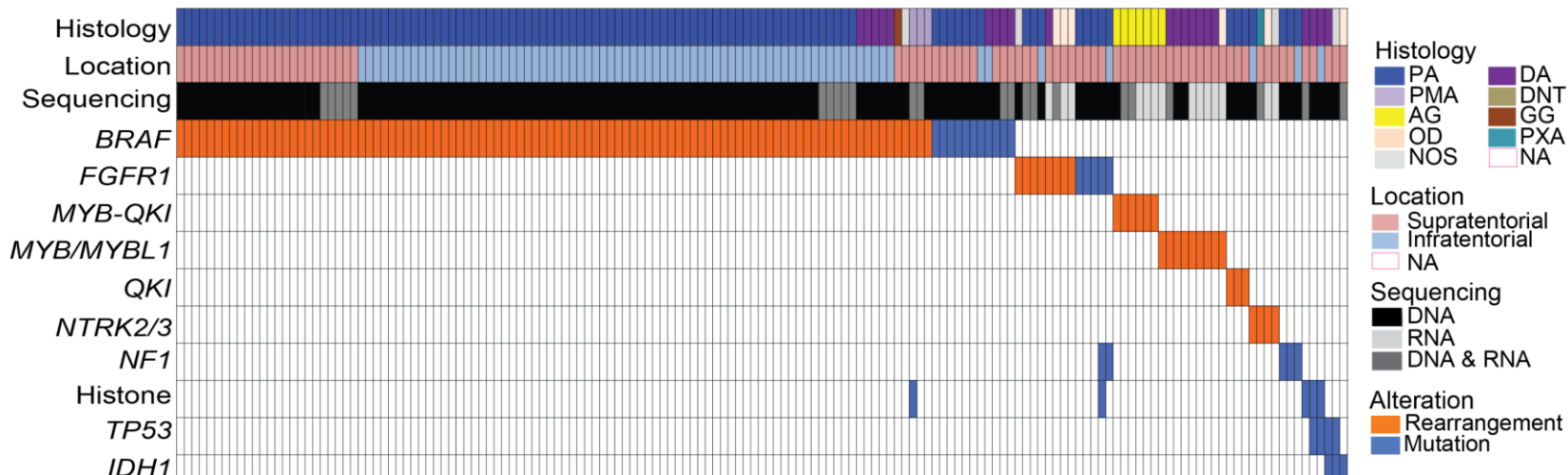


*BRAF* and *MAP2K1* mutations associated with distinct clinical features at presentation





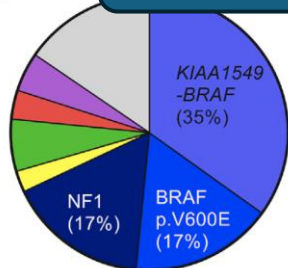
# Gliomi Low Grade (pLGG) – I più frequenti tumori SNC sono *MAPK-driven*



~2/3 alterazioni *mutually exclusive* di BRAF/MAPK

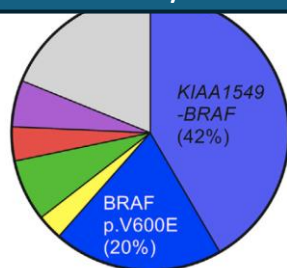
1/3 Non MAPK

Bandopadhyay et al, *Nature Genetics* 2016



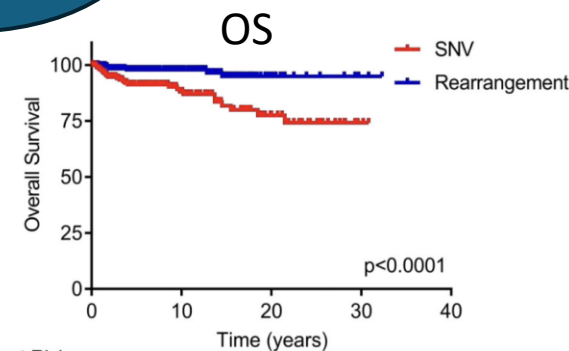
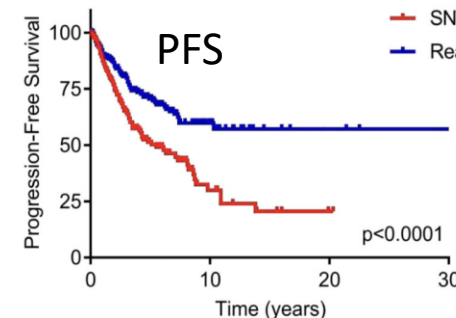
Including NF1

- Other MAPK Drivers (2.7%)
- FGF Receptors (6.1%)
- Non-MAPK Oncogenes (4.6%)
- Other Receptor Tyrosine Kinases (3.4%)
- Undetermined (16%)



Excluding NF1

- Other MAPK Drivers (3.3%)
- FGF Receptors (7.0%)
- Non-MAPK Oncogenes (5.5%)
- Other Receptor Tyrosine Kinases (4.0%)
- Undetermined (19%)



Ryall S et al *Cancer Cell* 2020



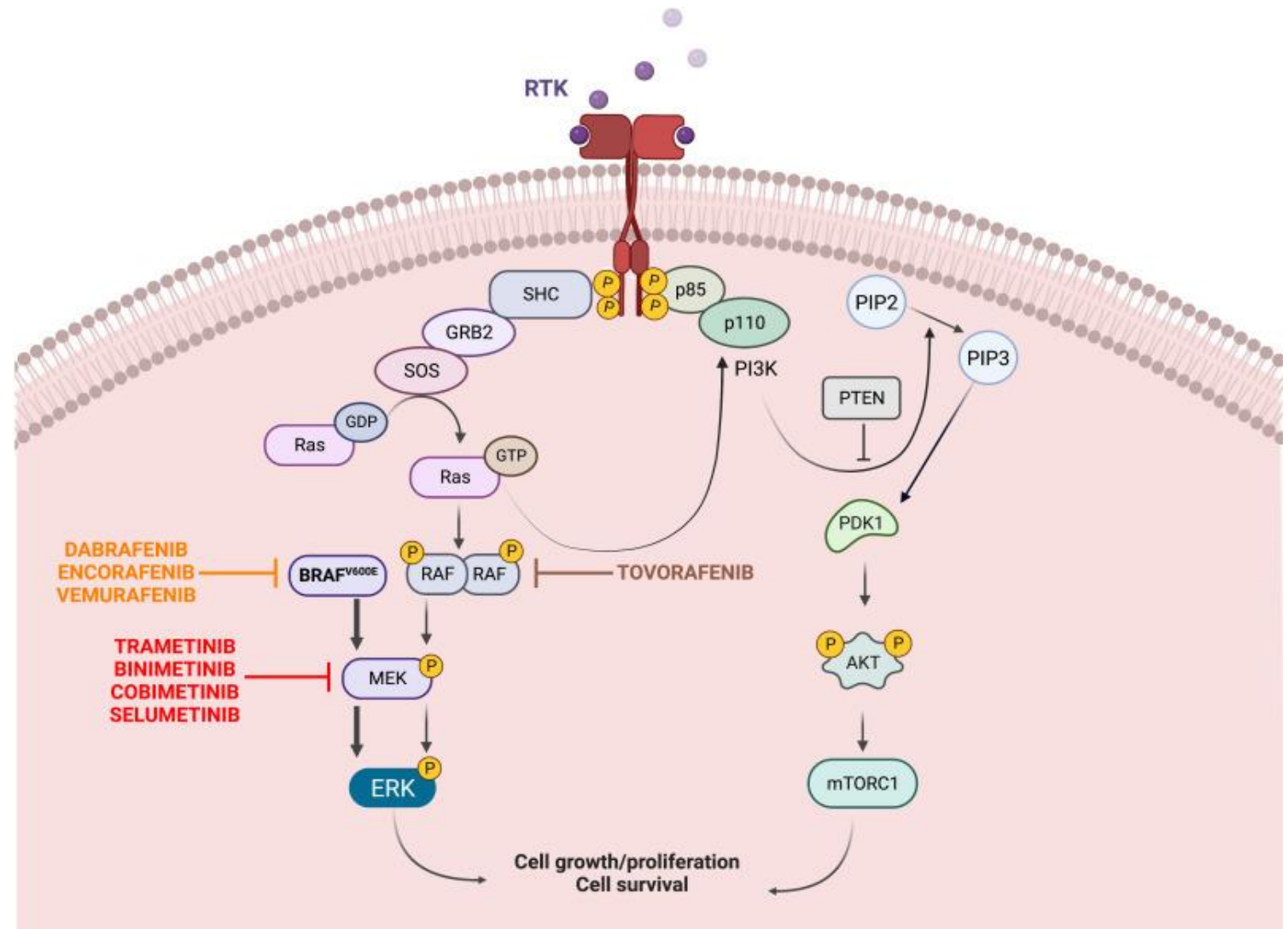
# Bersagli e Farmaci nei Tumori pediatrici *RAF-altered*

## 0. Sorafenib

## 1. BRAFi

## 2. MEKi

## 3. Pan-RAFi



# Sofafenib nei pLGG: Storia di un entusiasmante fallimento ...ed una lezione...

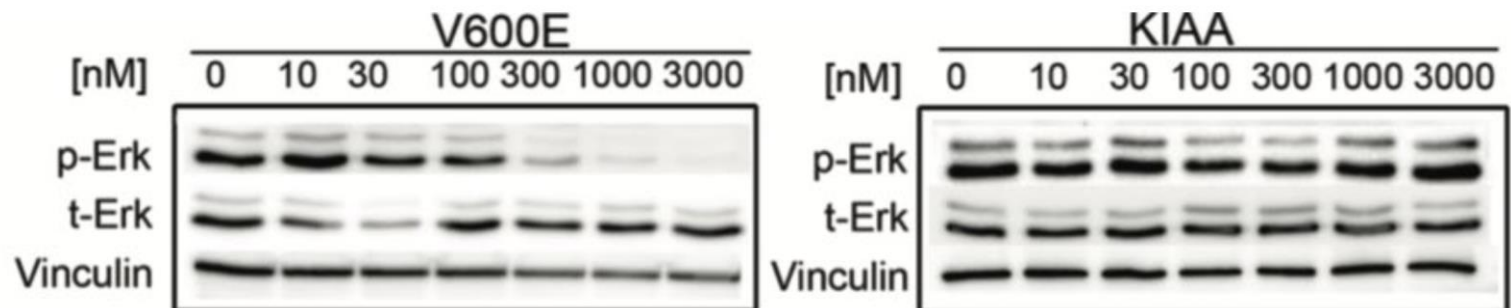
## Studio fase II in pazienti (non selezionati) con pLGG recidivati (2010)

- 9/12 paz (82%) progressione rapida nei primi 2-3 cicli

Studi in vitro hanno (poi) confermato un'attivazione paradossa di ERK nei pazienti con BRAF fusion+ (o NF1+), secondaria alla **dimerizzazione RAF WT**



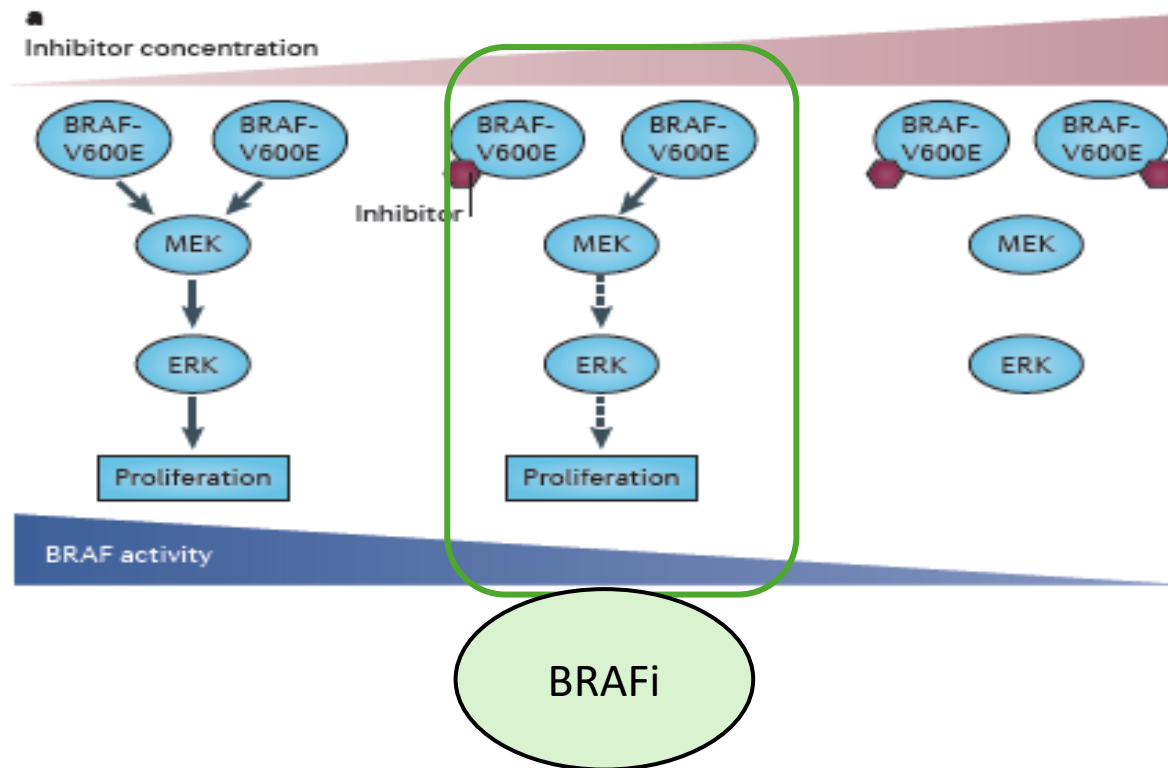
Karajannis M et Al, Neuro-Oncology 2014



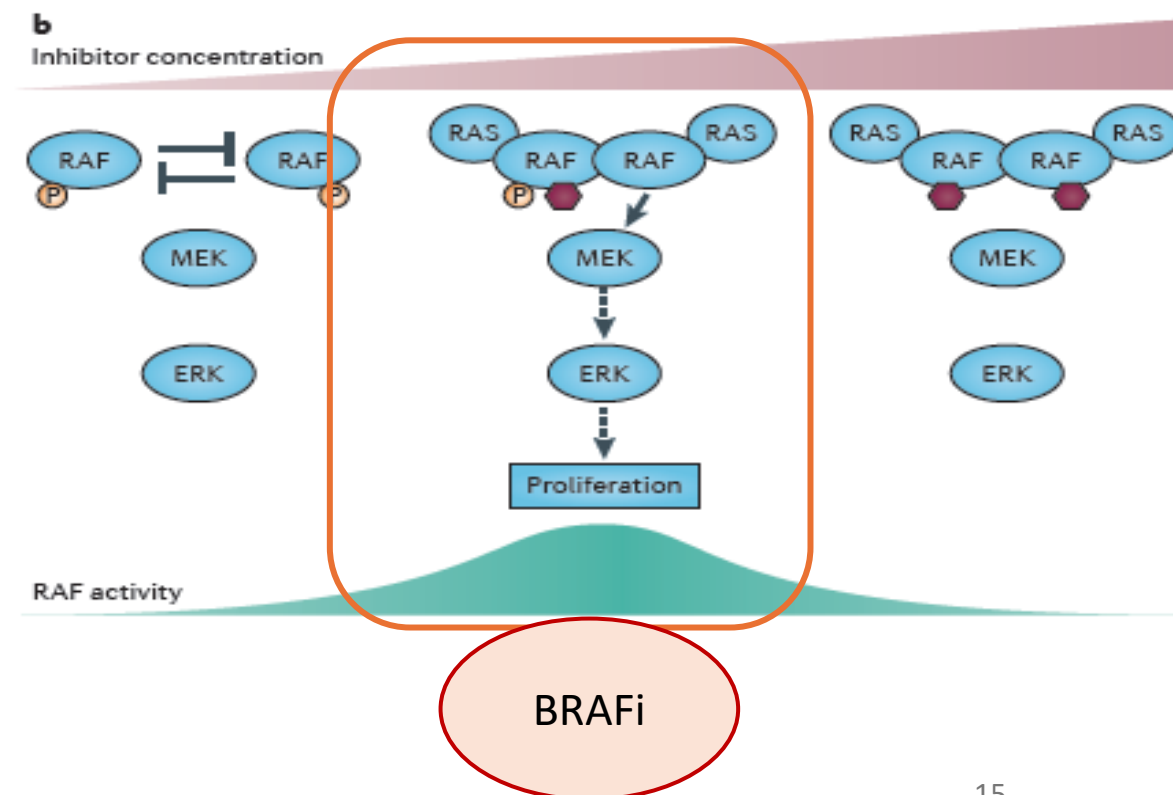
Sun et al, Neuro-Oncology, 2017

# Conoscere il Paradosso di RAF ... Ogni RAFi al posto giusto

## BRAFv600e mutant



## Riarrangiamento BRAF (fusioni, NF1, etc) o mut RAS



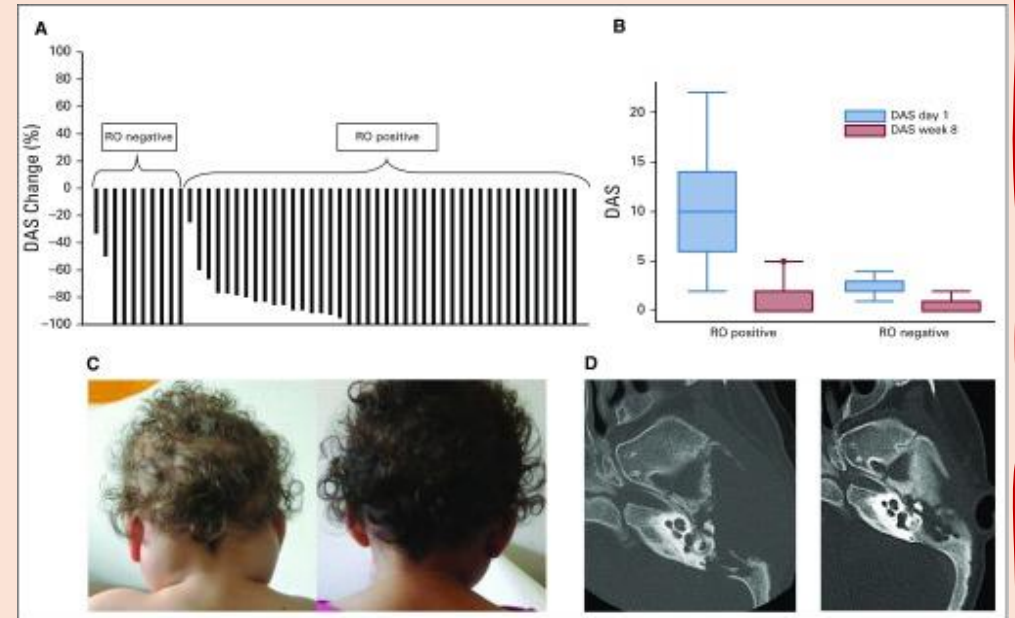
## Targeting BRAFv600e con BRAFi selettivi *single agent*

- **Risposte significative (rapide e sostenute) a Vemurafenib o Dabrafenib**

- off-label use in **R/R LCH** (ORR 100%, miglioramento score attività),
- Trial clinici fase I/II in corso (gliomi)
- Dabrafenib in **R/R pLGG** (ORR 30-40%)

- **Tossicità**

- cute, GI, fatigue, febbre, etc...
- Aumento num e dimensioni nevi
- Rari tumori cute (cheratoacantomi) > adulti





# Combinazione BRAF +MEKi (vertical targeting approach) nei tumori BRAFv600e

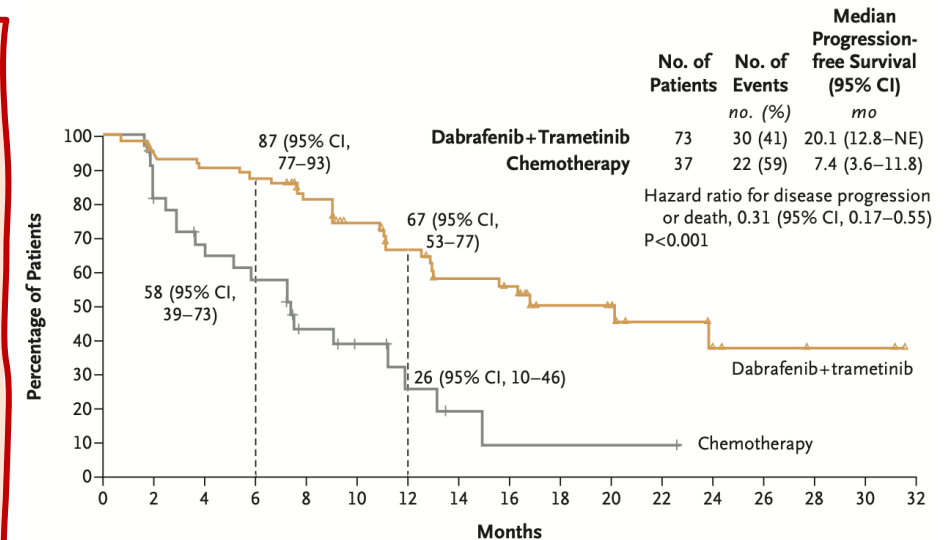
## • Studio *TADPOLE-G Dabrafenib/Trametinib*

pLGG in prima linea (Vs chemo) n=110, ORR = 47% (Vs 11), 1-yr PFS = 67% (Vs 26%)

pHGG in seconda linea: n= 41, CR/PR= 51%, PD 24%, 1yr-PFS 44%

FDA/EMA  
approvati

- **Trial mono-istituzionale D/T in LCH (1° linea, n =12, ORR 58%, CR in 40%)**
- **Beneficio** combinazione in termini di **tollerabilità/minore tossicità** (no confronti diretti)

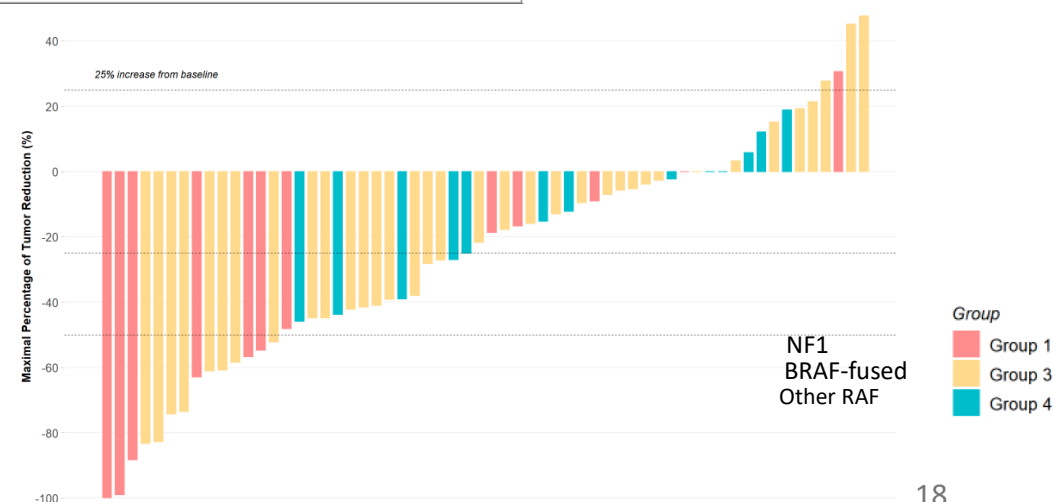
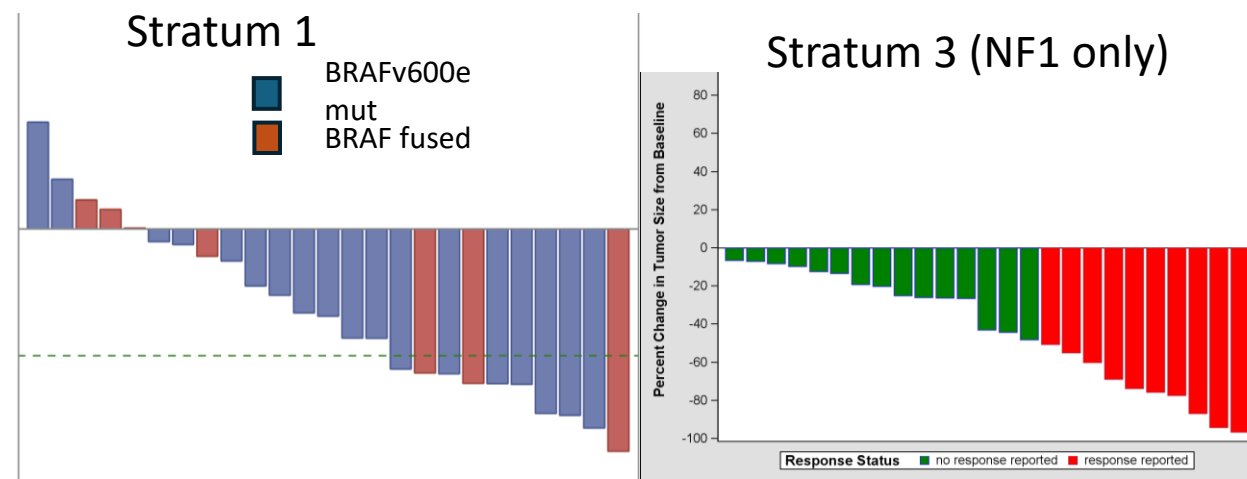


*du gust is  
megh che uan !*

# Studi conclusi e/o in corso su MEKi in pLGG ricaduti e con alterazioni RAF (o NF1)

## Simile «relativo» successo (ORR ~ 40%)

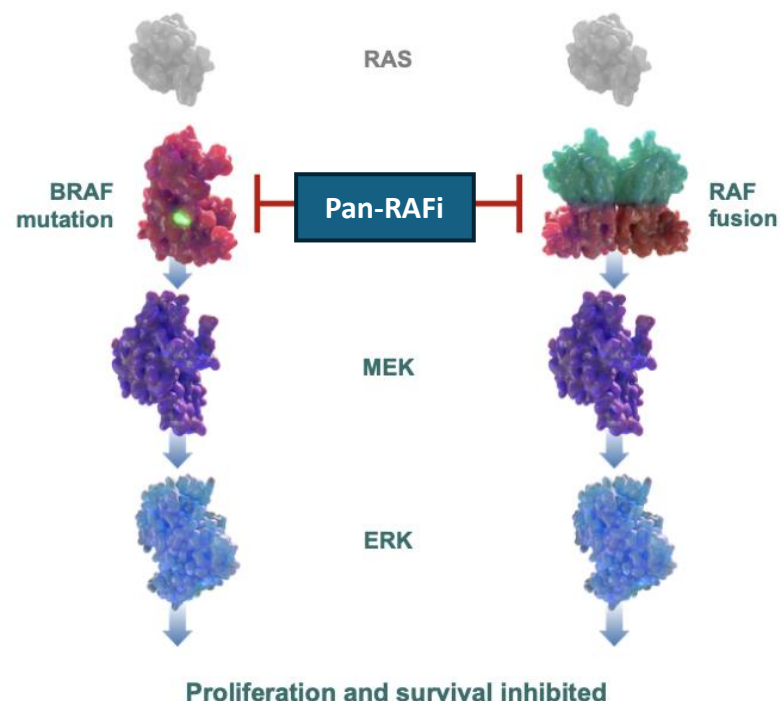
- **PBTC029-Selumetinib** (dati più maturi):
  - **Stratum 1 BRAF-altered** (n=25) : 5-yr PFS 30%
  - **Stratum 3 NF1+** (n=25): **5yr-PFS 54%**
  - **Stratum 4** (non-OPG) 5yr-PFS 50%
- **TRAM01 -Trametinib** (dati preliminari n=104)
  - ORR 48%, 18-mo PFS = 75% (91% NF1+)
  - Time to best response = **5.8 m**
- **Binimetinib** (n =85 pLGG)
  - ORR **56%** (BRAF-altered)/**43%** (NF1+)/**69%** (non BRAF)
  - Tossicità ++



# Inibitori Pan-RAF “paradox breakers” nei pLGG refrattari/recidivati

## Firefly 1 - A Phase II trial of Tovorafenib in relapsed/refractory BRAF-altered\* pLGG

### Tovorafenib inhibition of RAS-independent MAPK pathway signaling in RAF-altered cancers

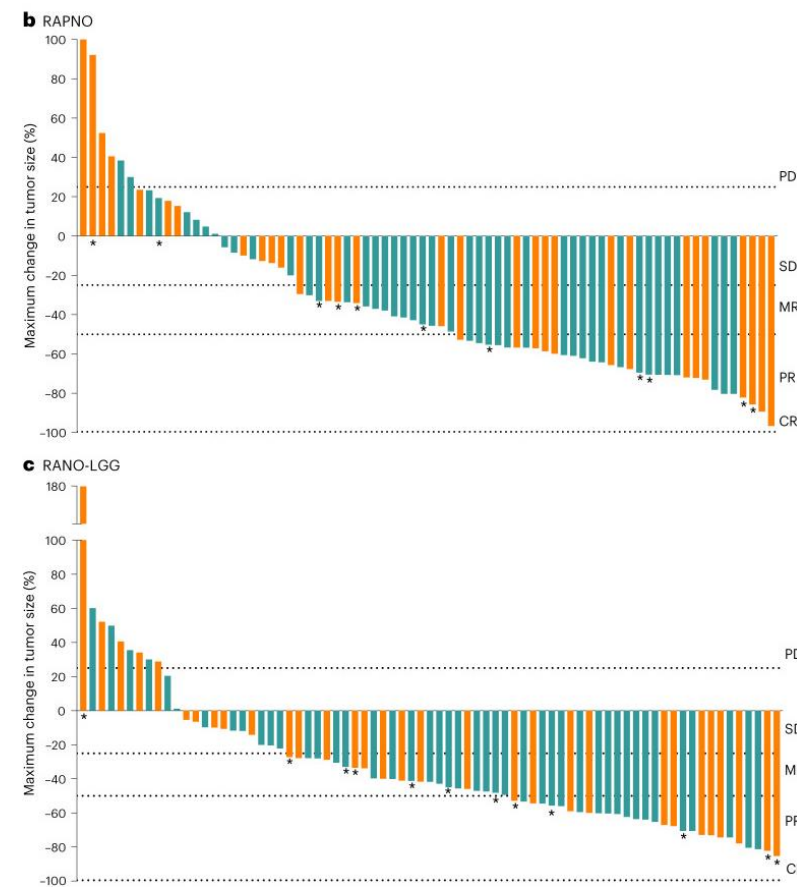


### Relapsed/Refractory BRAF-altered (mutation, fusion, others\* (n = 77)

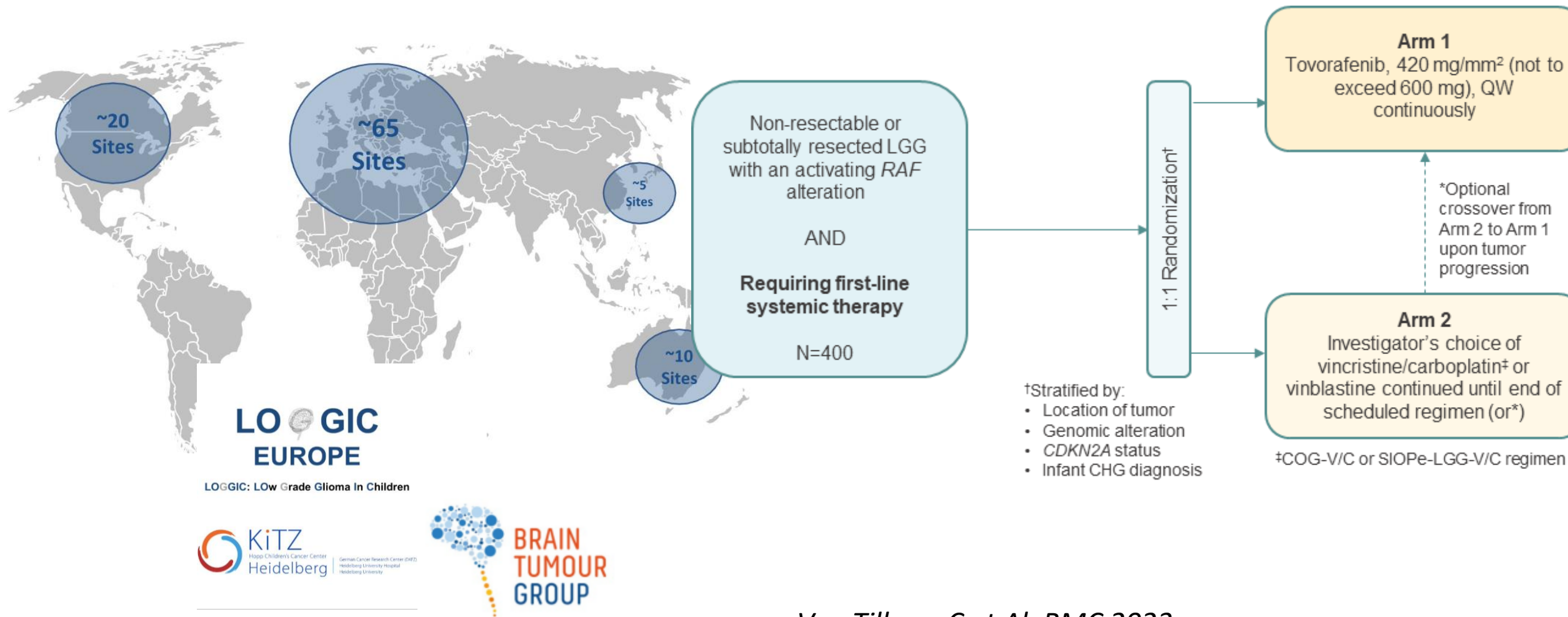
- **ORR 60%** (HGG RANO), **ORR 47%** LGG RANO/RAPNO
- **Oral, weekly administration**
- **Side effects:** change in hair colour (75%), increased CPK (64%), anemia (46%), fatigue (42%) and rash (42%), **decreased growth (27%)**
- **FDA approvato nel 2024**

Kilburn L.B, Nat Med 2024

\*esclusi NF1+



## LOGGIC-Firefly 2 randomised phase III trial for children with non resectable RAF altered LGG requiring first line treatment





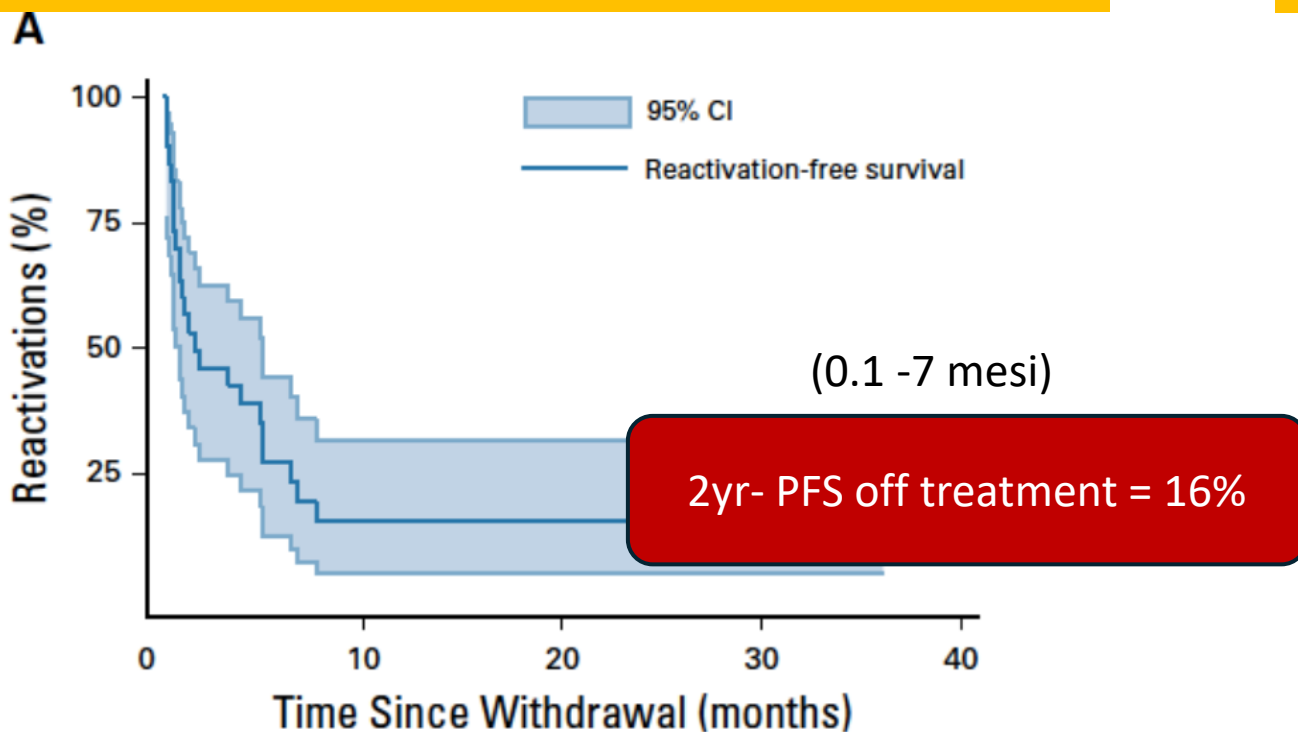


## Criticità nell'uso dei RAFi

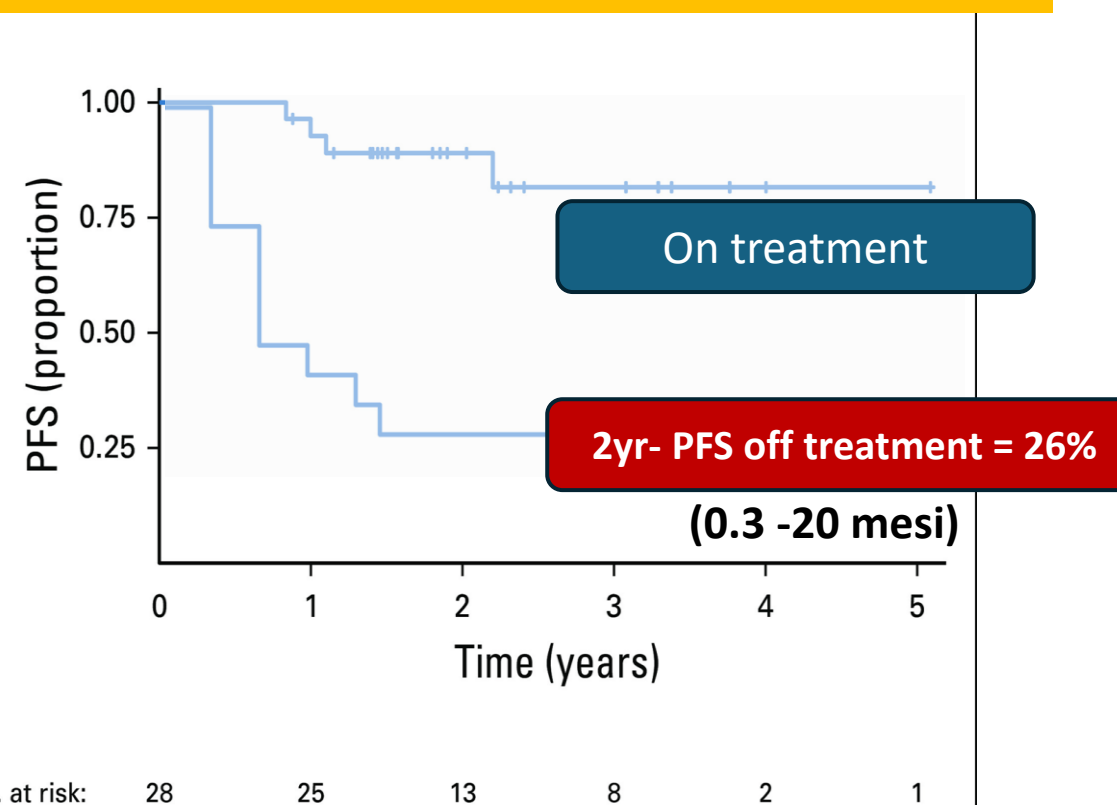
1. Tossicità medio/lungo termine (nota/non nota)
2. Effetto *Rebound* alla sospensione e *Oncogene Induced Senescence* (OIS)
3. Sostenibilità e costi (*financial toxicity*)

# Dati clinici su effetto rebound» alla sospensione RAFi nei Tumori pediatrici BRAFv600e

## LCH post Vemurafenib



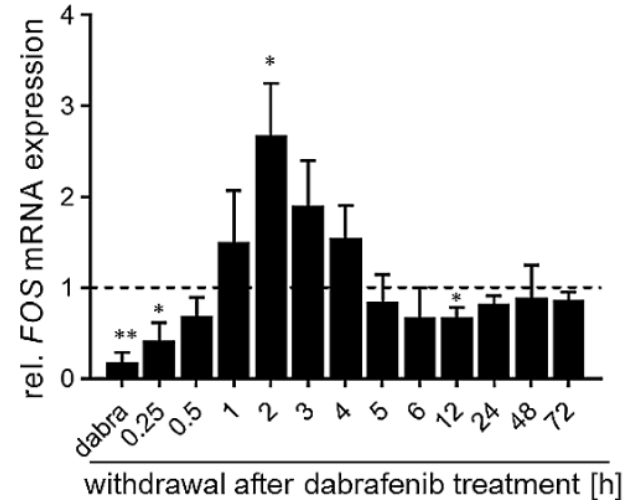
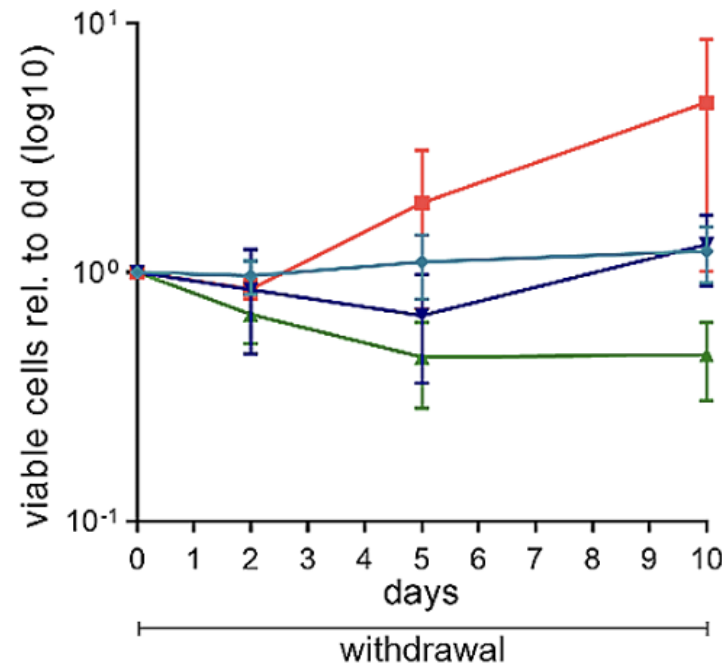
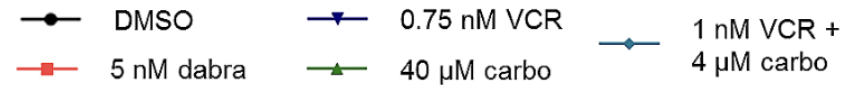
## LGGr600e post dabrafenib



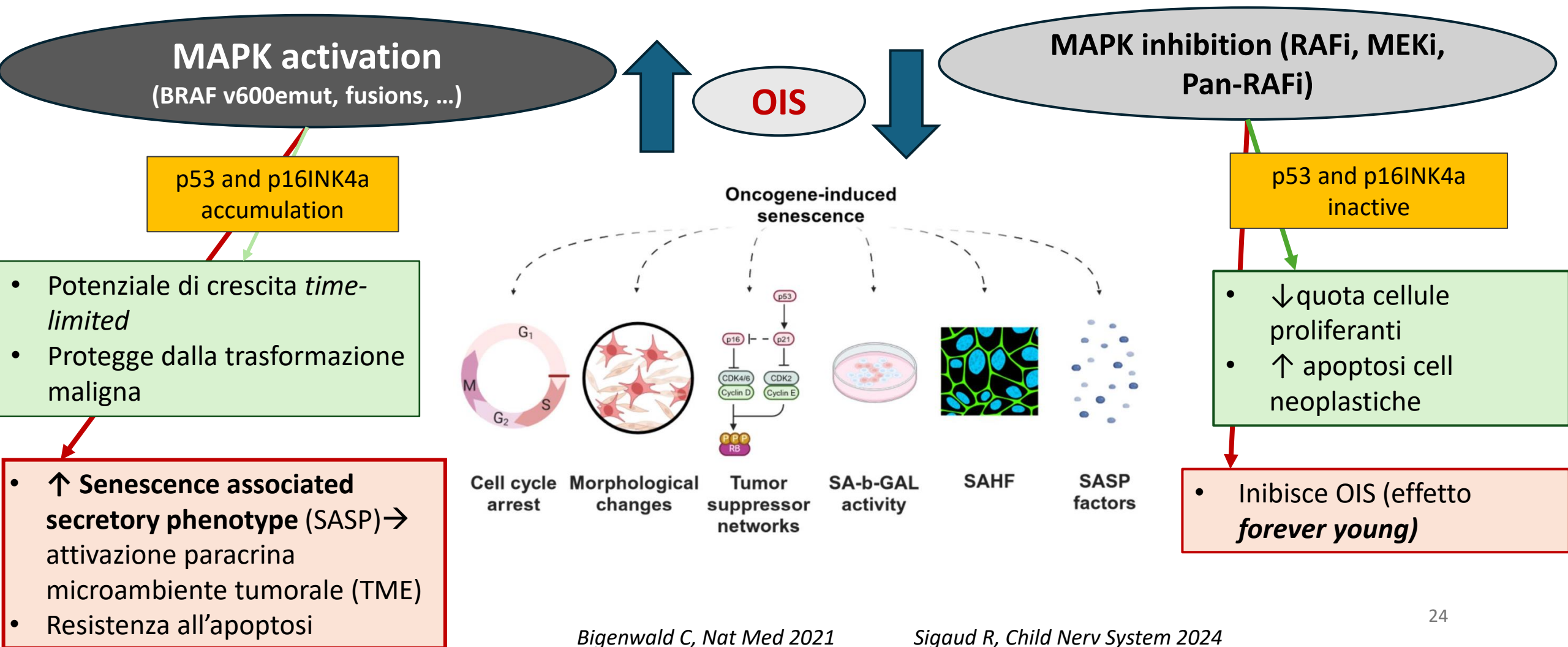


# Modelli preclinici LGG BRAFv600e (CDKN2a) su effetto «rebound» alla sospensione RAFi

- **Meccanismo intrinseco** di rapida riattivazione MAPK alla sospensione
  - ≠ resistenza
  - ≠ chemioterapia
- Temporanea iperattivazione con fenomeno di «overshooting» (**Goldilocks model**)
- Secrez. paracrina citochine con attrazione **microglia** (↑ MRI)

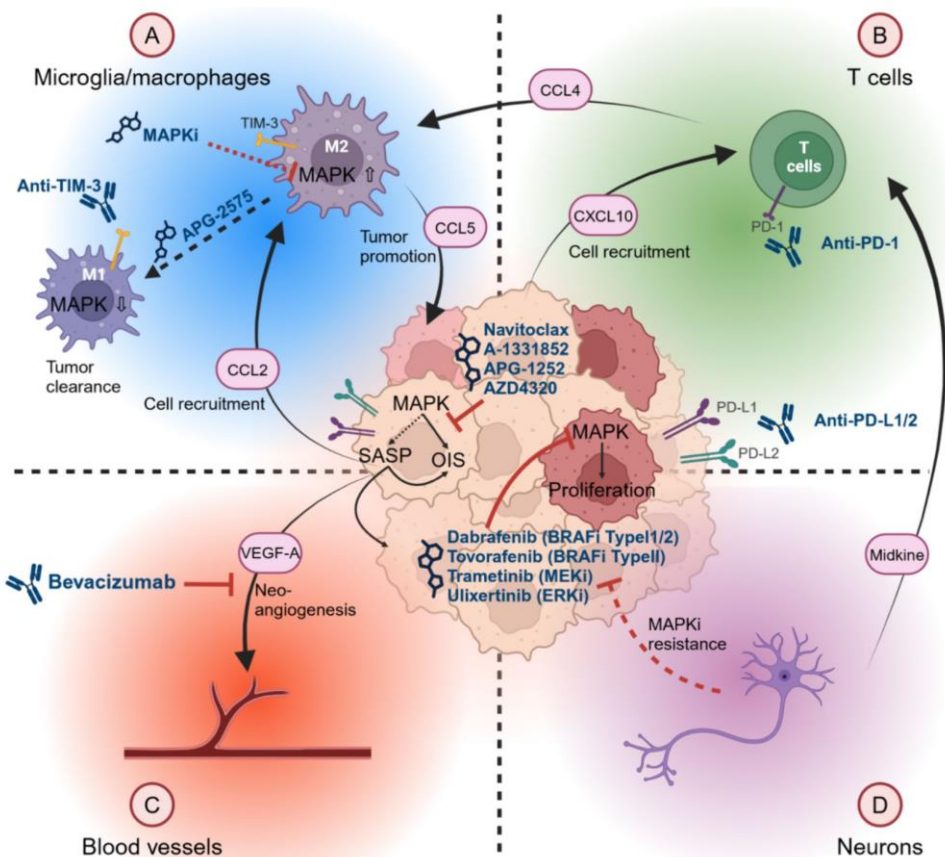


## Ruolo della Oncogene Induced Senescence (OIS) e sua inibizione con uso RAFi

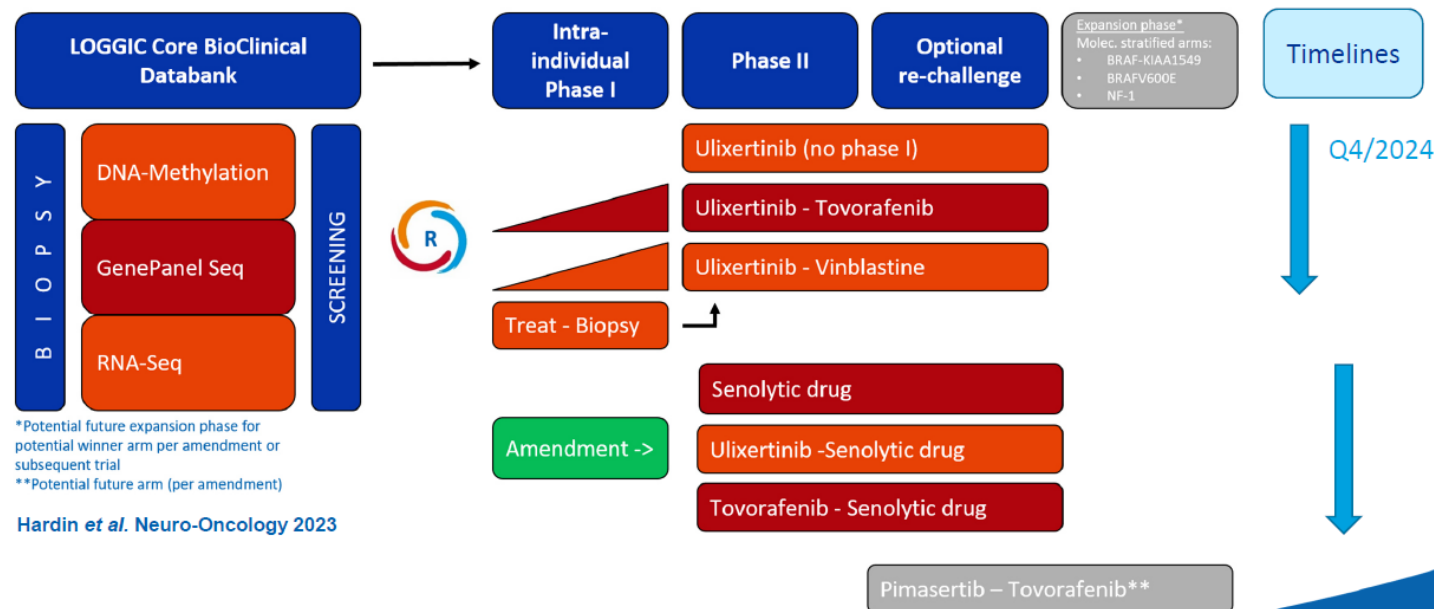




# Un approccio terapeutico integrato mirato al sistema di regolazione MAPK/OIS/SASP/TME



## EPILOGUE Trial Design: Flowchart



## Sostenibilità delle Terapie anti-RAF & *Financial Toxicity*

- **Un giorno** di Dabrafenib+ Trametinib ~ \$ 113.4
- **Un mese** di Vemurafenib ~ \$ 13.000
- **Una scatola** di Tovorafenib (24 cps) ~ \$ 33.000 (\$ 8.000 Formulaz liquida)
- **Un anno** di Selumetinib ~\$ 268.678

età paziente (s.c.) e **durata**- spesso prolungata- terapie anti-RAF

**Vs** riduzione costi x ricoveri, CVC, CT/RT, morbidità lungo termine

# Analisi della *RAF pathway* nei Tumori pediatrici- Conclusioni

- Conferma del ruolo diagnostico, prognostico e terapeutico delle alterazioni RAF in particolare nei pLGG e LCH (ruolo della biopsia/liquida)
- Strategie anti-RAF efficaci, alcune già approvate in US/Europa (frontline/relapse) (non ancora rimborsabili)
- Nessuna strategia ancora in grado di offrire una «cura» definitiva mirata alla «funzione»
- Identificazione di nuovi bersagli e strategie (senolitici, TME, etc) grazie allo studio dei modelli preclinici



# Grazie per l'attenzione

