

TITOLO DEL PROGETTO

Terapia di precisione per le leucemie linfoblastiche acute pediatriche *BCR-ABL-like*: sviluppo di un sistema *in vitro* per la diagnosi ed il monitoraggio clinico.

DURATA DEL PROGETTO

12 mesi

SETTORE DI INTERESSE ONCOEMATOLOGIA

BACKGROUND E RAZIONALE

La leucemia linfoblastica acuta (LLA) è la neoplasia ematologica più comune nei bambini (1), caratterizzata da una proliferazione anomala di cellule immature linfoidi. Grazie ai trattamenti polichemioterapici adattati al rischio attualmente usati in clinica la sopravvivenza a 5 anni è pari a ~90% (2). La LLA è una malattia eterogenea dal punto di vista genetico: i linfoblasti dei pazienti presentano infatti diverse alterazioni cromosomiche, sia numeriche che strutturali, alcune delle quali con valore prognostico e terapeutico, tanto che la loro identificazione alla diagnosi contribuisce a definire la classe di rischio del paziente ed il relativo trattamento da seguire. Di particolare importanza è la traslocazione t(9;22) che porta alla formazione del gene di fusione *BCR-ABL1* codificante una tirosin-chinasi (TK) chimerica costitutivamente attiva: la t(9;22) è presente in ~3% dei pazienti pediatriche con LLA di tipo B ed è associata ad un outcome sfavorevole. Questo tipo di LLA è potenzialmente trattabile con inibitori specifici per le TK (TKI), quali l'imatinib.(3-4) Studi recenti hanno dimostrato l'esistenza di un sottogruppo di leucemie *BCR-ABL1 like* (BAL, ~10-15% delle LLA del tipo B (5)), i cui blasti hanno un profilo di espressione genica simile a quello *BCR-ABL1* pur mancando della traslocazione t(9;22). Il preciso meccanismo patogenetico delle BAL è ancora da definire, ma esse sono caratterizzate principalmente dall'attivazione costitutiva delle vie di trasduzione del segnale mediate dalle chinasi ABL o da JAK-STAT ad opera di TK diverse da BCR-ABL,(6) generate da una varietà di fusioni con i geni *ABL1*, *ABL2* e *JAK2*, oppure a causa di aberrazioni geniche nei recettori di superficie (ad esempio: *PDGFRB*, *CRLF2*) a monte di ABL o di JAK-STAT (Figura 1). I pazienti con LLA BAL costituiscono un gruppo ad esito sfavorevole non identificato dagli attuali criteri di rischio: infatti rispondono peggio ai protocolli in uso, come evidenziato da una più alta malattia residua minima durante la terapia di induzione (7). Nonostante le BAL siano potenzialmente curabili con i TKI (ad esempio: imatinib, dasatinb, nilotinib come inibitori di ABL e ruxolitinib, tofacitinib ed erlotinib come inibitori di JAK), ad oggi mancano sistemi pratici e veloci per identificare i pazienti candidati alla terapia con TKI e l'inibitore specifico più appropriato su base individuale. C'è dunque la necessità di ricorrere alla medicina di precisione per migliorare il loro decorso terapeutico, evitando di esporre bambini con LLA BAL alle conseguenze di terapie intensive inadeguate ed al crescente rischio di progressione della malattia. Va ricordato infatti che la ricaduta rappresenta una complicazione clinica importante della LLA, potenzialmente letale (sopravvivenza a 5 anni ~ 50% (8)). Questo progetto si propone di sviluppare un sistema *in vitro* per quantificare l'attività di TK presenti in pazienti con LLA BAL in risposta ai TKI con lo scopo ultimo di sviluppare biosensori di facile utilizzo per la diagnosi ed il monitoraggio clinico. Questi biosensori dovrebbero guidare il medico nella scelta del TKI migliore per il paziente da integrare nella terapia.

OBIETTIVI

Gli obiettivi del progetto sono:

- 1) *Messa a punto di sistemi in vitro per valutare quantitativamente l'attività delle TK BAL espresse in linee cellulari e per lo screening di un pannello di TKI;*
- 2) *Validazione dei sistemi in vitro con campioni di cellule leucemiche di pazienti pediatriche affetti da LLA BAL attualmente in cura con il protocollo AIEOP-BFM LLA 2009.*

Questo progetto getta le basi per lo sviluppo di biosensori specifici per le TK BAL da usare al letto del paziente. I potenziali benefici comprendono:

- *la personalizzazione della cura per i pazienti LLA BAL.* In futuro le analisi citogenetiche alla diagnosi consentiranno l'identificazione delle anomalie BAL mediante tecniche di FISH, multiplex RT-PCR o RNA seq. Tuttavia, la disponibilità di biosensori specifici per le TK sarà uno strumento utile per perfezionare la diagnosi della LLA BAL, identificando in modo tempestivo il migliore TKI per il trattamento farmacologico, consentendo anche di identificare i pazienti con resistenze primarie a questi farmaci, che necessitano quindi di altre scelte terapeutiche. In tal modo i pazienti riceveranno una terapia adeguata fin dalla diagnosi, ottimizzata per aumentare le loro probabilità di sopravvivenza e per ridurre gli effetti collaterali dovuti all'esposizione a farmaci citotossici ad alti dosaggi dei protocolli chemioterapici convenzionali, per loro potenzialmente inadeguati.
- *il monitoraggio del decorso clinico delle LLA BAL.* I biosensori potranno essere impiegati sia sugli aspirati midollari che sul sangue periferico dei pazienti raccolti in diversi momenti della terapia per valutare l'attività residua delle TK e/o l'eventuale comparsa di resistenze ai TKI acquisite nel corso della terapia.
- *la razionalizzazione dei costi per il sistema sanitario.* La personalizzazione della terapia si traduce in una gestione più razionale dei costi a carico del servizio sanitario nazionale. Tramite la realizzazione della medicina di precisione ed i conseguenti esiti più favorevoli della terapia, la sanità nazionale risparmierà nell'immediato e nel lungo termine sulle prestazioni cliniche e socio-assistenziali ricollegabili ad ogni paziente malato. Considerando inoltre che i pazienti sono bambini, si devono tener da conto anche i costi indiretti legati alle figure genitoriali (assenze dal lavoro, malattie da stress emotivo).
- *ulteriori applicazioni dei biosensori in campo medico.* I biosensori sono sistemi versatili e ottimizzabili per qualsiasi TK. Questo progetto preliminare ha perciò una potenziale applicazione anche in malattie diverse dalla LLA pediatrica quali la leucemia mieloide cronica e i tumori stromali gastrointestinali (GIST) e può essere strumento utile anche per lo screening di TKI di nuova generazione da introdurre in clinica.

VALORE SCIENTIFICO E POTENZIALI BENEFICI PER IL SETTORE SANITARIO/PAZIENTI

Il successo della terapia su pazienti affetti da LLA BAL è ancora estremamente scarso; questo significa che, trattati con protocolli convenzionali, questi pazienti rischiano di sviluppare gravi effetti collaterali, legati alla chemioterapia somministrata, senza benefici e con rischio di ricaduta. La possibilità di inserimento di farmaci innovativi specifici nel protocollo terapeutico, come l'imatinib, già usato per le LLA con traslocazione t(9;22), oppure il ruxolitinib, potrebbe migliorare grandemente la prognosi. Le fusioni genetiche alla base delle BAL sono ancora poco conosciute e rimangono molte domande che riguardano il loro meccanismo, ma la potenziale risposta farmacologica ad inibitori specifici rende la possibilità della loro individuazione alla diagnosi essenziale nella prospettiva della terapia personalizzata. L'esistenza di diversi TKI, la mancanza di un razionale chiaro per preferire una molecola rispetto alle altre, l'incapacità attuale di prevedere la risposta

individuale, rallentano le scelte terapeutiche ed espongono i pazienti ad un aumentato rischio di progressione della malattia. L'introduzione di biosensori dedicati rappresenterebbe quindi una novità a servizio degli oncologi per la scelta e l'ottimizzare della terapia della LLA. Tutto questo si tradurrà in esiti terapeutici ancora più favorevoli e in una razionalizzazione dei costi per il servizio sanitario nazionale.

INNOVATIVITA' DEL PROGETTO

Questo studio svilupperà un metodo innovativo nell'ambito della medicina di precisione delle leucemie BAL. Al termine di un anno di finanziamento ci aspettiamo di mettere a punto il modello base utile per lo sviluppo futuro di biosensori dedicati per specifiche TK, in particolare per le LLA BAL che coinvolgono fusioni dei geni CRLF2 e PDGFRB. Il biosensore dovrà essere strutturato come un dispositivo semplice da usarsi in reparto, direttamente dal medico o dagli infermieri al letto del paziente, senza l'intermediazione di laboratori di analisi con apparecchiature specializzate. Il risultato dovrà essere rapido e di comprensione immediata. Tale sistema sarà innovativo rispetto all'attuale pratica clinico-diagnostica consentirà una diagnosi veloce e funzionale della presenza di TK, riducendo le tempistiche che sono richieste per le analisi citogenetiche. Inoltre, questo strumento fornirà immediatamente l'informazione riguardante il miglior approccio terapeutico, individuando la sensibilità a specifici TKI. Contribuirà dunque ad un uso razionale dei TKI ed al monitoraggio della terapia, determinando potenzialmente esiti clinici più favorevoli nel sottogruppo di pazienti BAL per cui le attuali terapie non sono soddisfacenti. Il coraggio del progetto sta nel focalizzarsi in tematiche ancora così poco conosciute e in fase di studio. La possibilità quindi di identificarne i problemi e trovare soluzioni, di adattare a qualcosa di nuovo protocolli già esistenti o addirittura ideare nuovi metodi adatti alla circostanza rende il progetto innovativo e stimolante.

REFERENZE

- (1) AIRTUM Working Group; CCM; AIEOP Working Group. *Epidemiol Prev* 2013; 37 (1) suppl 1: 1-296
- (2) Bhojwani e coll. *Pediatr Clin North Am.* 2015;62(1):47-60
- (3) Malagola e coll., *Ann Hematol.* 2016;95(5):681-93.
- (4) Bleckmann e coll., *Br J Haematol.* 2016;172(6):855-69.
- (5) den Boer e coll., *Lancet Oncol.* 2009; 10(2): 125–134.
- (6) Ofran e coll. *Blood reviews* 2016; epub ahead of print
- (7) Roberts e coll. *J Clin Oncol.* 2014; 20;32(27):3012-20.
- (8) Locatelli e coll, *Current opinion in oncology* 2013; 25 (6), 707.