

Medicina personalizzata: sviluppo di terapie oncologiche di precisione

PeRsonalized mEdicine: developMEnt of precision cancer therapies

PREME

Proponente: Dott. Mirco Ponzoni, Responsabile Laboratorio di Terapie Sperimentali in Oncologia (LTSO), Istituto Giannina Gaslini

PREME è composto da sottoprogetti focalizzati al disegno di strategie terapeutiche innovative e di precisione per pazienti affetti da neuroblastoma (NB), ma che potrebbero essere estesi, con opportune modifiche, ad altre patologie emato-oncologiche pediatriche, quali tumori cerebrali, leucemie e linfomi, e rappresentare un progetto di alto impatto in pediatria.

PREME verrà sviluppato da figure professionali con competenze complementari nella ricerca pre-clinica e clinica, nella caratterizzazione genica e nella cura dei pazienti affetti da NB. Il **Dott. M. Ponzoni** è il Coordinatore Nazionale della ricerca traslazionale del NB. Il Laboratorio di Terapia Sperimentale in Oncologia (LTSO) dell'Istituto Giannina Gaslini (IGG), da lui diretto, ha una lunga esperienza nello screening di farmaci anti-tumorali e loro validazione, nelle diverse metodologie di somministrazione di farmaci anti-neoplastici e nelle tecniche di targeting, nel bersagliamento genico, nella valutazione del ruolo degli oncogeni nell'iniziazione e progressione tumorale, nella generazione di modelli cellulari tumorali 3D, nello sviluppo di modelli animali tumorali e nella gestione di campioni biologici provenienti dai pazienti affetti da NB. L'Unità di Oncologia Pediatrica dell'IGG è il Centro Clinico di Coordinamento Italiano per il NB (**Dott. A. Garaventa e Dott. M. Conte**) ed interagisce con tutti i Centri di Emato-Oncologia Pediatrica Italiana (AIEOP). L'Unità di Epidemiologia e Biostatistica (**Dott. R. Haupt**) fornisce supporto all'approccio metodologico e all'analisi statistica dei protocolli di studio clinici e laboratoristici connessi al NB; inoltre l'ambulatorio DOPO (Diagnosi Osservazione Prevenzione *dopo* terapia Oncologica) permette il follow-up a distanza dei soggetti lungo-sopravvivenenti da tumore pediatrico permettendo un'analisi delle eventuali tossicità a lungo termine dei farmaci utilizzati per la cura del tumore stesso.

Più in generale, dal 1976 i ricercatori dell'IGG, in collaborazione con l'AIEOP, hanno attivato protocolli di trattamento internazionali e hanno pianificato ricerche scientifiche sul NB. Nel 1994, l'IGG, insieme a 3 centri europei, ha fondato il gruppo cooperativo europeo per lo studio del NB (SIOPEN) che oggi ha 26 Stati membri e coordina l'arruolamento e il follow-up dei pazienti nel trattamento di prima linea con protocolli clinici di Fase III. Nel 2016, il dipartimento di Ematologia/Oncologia dell'IGG è stato riconosciuto come centro di riferimento per la cura del NB dalla Regione Liguria e nel 2017 è stato selezionato per essere incluso nella Rete di riferimento europea per l'oncologia pediatrica (PaedCanERN). Tutti i bambini affetti da NB vengono quindi sottoposti ad una adeguata caratterizzazione isto-patologica, biochimica e genetica del tumore primario e della malattia metastatica, sia alla diagnosi che durante la terapia. Queste procedure garantiscono a tutti i pazienti il corretto inquadramento clinico e biologico e trattamento secondo i protocolli SIOPEN.

PREME si avvarrà inoltre d'importanti collaborazioni Nazionali:

-Dott. Mario Capasso, Ceinge, Napoli.

Mario Capasso è Professore Associato presso l'Università di Napoli Federico II, Genetica Medica. Dal 2007 al 2008 è stato ricercatore post dottorato presso The Children's Hospital of Philadelphia dove ha collaborato con successo ai primi studi GWAS sul neuroblastoma.

Ha competenze in analisi dei dati genomici ottenuti dall'array SNP array, Epigenomica, Gene Expression e Next Generation Sequencing. E' autore del primo studio NGS realizzato in Italia sul neuroblastoma. E' attualmente PI e Responsabile del Servizio di Bioinformatica per NGS presso l'Istituto di ricerca CEINGE Biotecnologie Avanzate di Napoli. Mario Capasso è inoltre, dal 2019, co-coordinatore del Gruppo Biologico Italiano AIEOP guidato dal proponente di PREME.

- Dott.ssa Sanja Aveic, Fondazione Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza, Padova.

Sanja Aveic acquisisce il titolo accademico in biomedicina sperimentale presso l'Università di Belgrado in Serbia. Dottorato di ricerca nel 2010 presso l'Università di Padova dove ha lavorato come post-doc per 4 anni presso il Dipartimento di Onco-ematologia Pediatrica. I suoi principali campi d'interesse sono le neoplasie maligne pediatriche, comprese leucemie e neuroblastoma. Dal 2014 sta studiando gli aspetti molecolari della neuroblastomagenesi che potrebbero portare allo sviluppo di regimi terapeutici più efficaci e personalizzati. Dal 2018 è capogruppo del laboratorio del neuroblastoma della Fondazione Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza di Padova. Ha esperienza nella biologia cellulare, biologia molecolare e nello sviluppo di nuovi modelli sperimentali. Da Febbraio 2019 è project manager presso l'Ospedale Universitario di Aquisgrana, presso il Dipartimento di Biomateriali.

- Dott.ssa Doriana Fruci, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma.

Doriana Fruci, è ricercatore presso l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma, macroarea di Oncoematologia. Dal 1998 al 2001 ha svolto il post-doc presso l'Hopital Necker-Enfants Malades di Parigi dove ha contribuito all'identificazione di alcuni componenti chiave del processamento e presentazione dell'antigene, uno dei meccanismi biologici di fondamentale importanza che da inizio alla risposta immunitaria. È autore di diversi studi sulla biologia del neuroblastoma e della componente immune infiltrante il tumore. Ha competenze in biologia cellulare, biologia molecolare, studi *in vivo*, citofluorimetria a flusso, immunoistochimica ed immunofluorescenza multiplex.

- Dott. A. Quattrone, Università Trento.

Alessandro Quattrone è Professore Ordinario di Biologia Applicata. Ha acquisito il dottorato di ricerca presso l'Università di Firenze, in "Morfologia e morfogenesi umana. E' attualmente Direttore del Dipartimento di Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata – CIBIO. Il gruppo di ricerca del Prof. Quattrone si occupa di: Meccanismi epigenetici di modulazione dell'espressione genica; Controllo traduzionale dell'espressione genica secondo una prospettiva di biologia dei sistemi; Ruolo delle proteine ELAV/BRUNO nel controllo traduzionale sequenza-specifico dell'espressione genica in fisiologia e in patologia umana; Applicazioni di metabolomica in biomedicina e in biologia dei sistemi; Approcci bioinformatici all'interpretazione di dati trascrittomici, proteomici e metabolomici.

Background e Razionale: dalla genomica alla clinica passando per i modelli animali.

Il NB è il tumore solido extra-cranico più frequente in età pediatrica (10% dei tumori), con circa 130 nuovi casi diagnosticati annualmente in Italia. Più del 50% di questi viene purtroppo diagnosticato in fase metastatica già all'esordio. Sebbene siano stati ottenuti importanti progressi sulla conoscenza della biologia del NB, e siano stati introdotti nuovi farmaci e modalità terapeutiche per il trattamento di questo tumore, la percentuale di pazienti che vanno incontro a progressione o recidiva della malattia e al fenomeno della farmaco-resistenza rimane significativamente superiore rispetto a quanto osservato per altri tumori pediatrici. Il NB ad alto rischio (HR-NB) rimane ancora la principale causa di mortalità tumorale nei pazienti sotto i 5 anni di vita e da solo è responsabile del 15% dei decessi per cancro infantile.

Nonostante la ricerca pre-clinica abbia permesso l'elaborazione di promettenti terapie, la loro applicabilità clinica è ancora limitata dall'insufficiente concentrazione di farmaci in grado di arrivare al sito tumorale e da un'elevata tossicità sistemica.

Il raggiungimento di un efficace trattamento per il NB rappresenta, pertanto, una delle principali sfide in oncologia pediatrica. Nell'era della medicina di precisione la necessità di disegnare nuove strategie terapeutiche per il NB è quindi fondamentale.

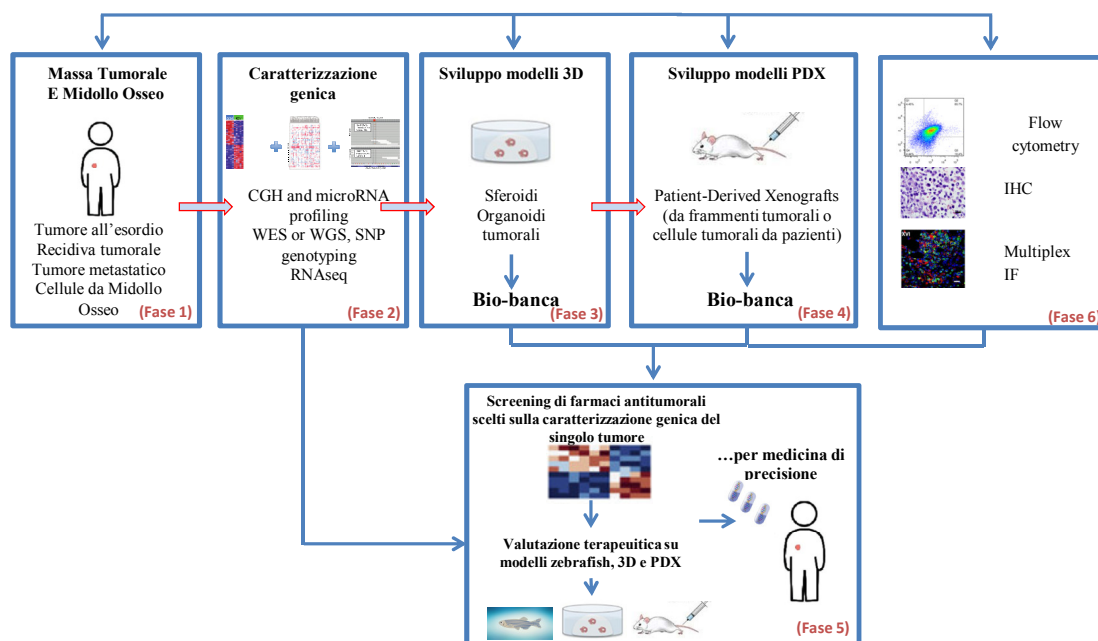
Per raggiungere gli obiettivi del Progetto, saranno integrate diverse abilità in ambito clinico, biologico, bioinformatico, veterinario e genomico. Per chiarire le interazioni necessarie per l'esecuzione di PREME vedere **schema** esemplificativo allegato in basso.

PREME verterà sulla realizzazione dei seguenti punti:

- a. Acquisizione di biopsie tumorali (Massa Tumorale) o cellule primarie di NB infiltranti il midollo osseo (Midollo Osseo) da pazienti affetti da HR-NB (*Fase 1*), al di là dei campioni biologici riservati a scopi diagnostici.
- b. Le cellule tumorali saranno processate per la caratterizzazione del DNA mediante sequenziamento di nuova generazione e per identificare il profilo di espressione genica mediante sequenziamento dell'RNA (*Fase 2*).
- c. Le cellule tumorali saranno utilizzate anche per lo sviluppo di modelli 3D e verrà costruita una Bio-banca di organoidi tumorali (*Fase 3*).
- d. Le cellule tumorali saranno anche utilizzate "in vivo" per lo sviluppo di modelli Patient Derived Xenografts (PDX) che verranno geneticamente caratterizzati anche ad ogni generazione successiva. Sarà costruita una Bio-banca di tumori PDX (*Fase 4*).
- e. Le cellule tumorali saranno anche utilizzate per la messa a punto di un modello di Patient Derived zebrafish (zPDX), in cui le cellule derivate da pazienti affetti da NB saranno inoculate in larve di zebrafish.
- f. Organoidi tumorali e tumori derivati da PDX crioconservati, insieme ad altro materiale biologico fresco ricevuto nel frattempo, saranno utilizzati per la valutazione terapeutica di farmaci anti-tumorali innovativi e di composti attualmente in clinica per il trattamento di pazienti affetti da HR-NB. La selezione dei farmaci anti-tumorali sarà basata sul profilo genomico e sulle possibili mutazioni rilevate nei tumori. Il gruppo di lavoro si avvarrà inoltre dell'interrogazione di alcuni grandi database genomici internazionali. La risposta dei tumori ai composti terapeutici selezionati consentirà di individuare i farmaci anti-tumorali più attivi, e questo permetterà di disegnare protocolli terapeutici idonei e di precisione per i pazienti con NB, con possibili trials clinici di Fase I-II (*Fase 5*).
- g. Le cellule ed i tessuti tumorali saranno caratterizzati per la componente immunitaria mediante citofluorimetria a flusso, immunoistochimica ed immunofluorescenza multiplex (*Fase 6*).

Medicina di Precisione per pazienti affetti da neuroblastoma ad alto rischio

Clinici – Biologi – Veterinari - Bioinformatici - Genetisti



Piano sperimentale

Fase 1: Raccolta dei campioni di tumore da pazienti affetti da NB ad alto rischio

Tre importanti servizi sono stati attivati e centralizzati in IGG:

1. Centralizzazione e analisi del tessuto tumorale e di altri materiali biologici. A tutti i bambini italiani affetti da NB viene fornita un'adeguata caratterizzazione isto-patologica, biochimica e genetica del tumore primario e della malattia metastatica sia alla diagnosi che durante la terapia. Queste procedure garantiscono a tutti i pazienti affetti da NB il trattamento corretto in base ai protocolli SIOPEN.
2. Il Registro Italiano dei Neuroblastomi (RINB), attivo dal 1979, raccoglie prospetticamente informazioni su tutti i pazienti con NB diagnosticati in Italia e trattati presso i centri AIEOP. Ad oggi, RINB ha oltre 4000 casi e dal 2016 risiede su una piattaforma informatica sicura e accessibile via web da tutti i centri.
3. La Bio-banca integrata tessuto-genomica (BIT Gaslini) raccoglie il materiale centralizzato dai centri AIEOP e lo rende disponibile per i ricercatori. La BIT appartiene alla rete di eccellenza PaedCanERN (che comprende banche europee di tessuti pediatrici) e alla rete europea BBMRI.

In particolare, oltre ai campioni riservati a scopi diagnostici, il Midollo Osseo fresco infiltrato sarà caratterizzato fenotipicamente (mediante citofluorimetria a flusso e immunocitochimica) per marcatori specifici per il NB, come il GD₂ e il B7-H3 e successivamente utilizzato per lo sviluppo delle Fasi 2- 5 di PREME. Inoltre, i frammenti tumorali saranno sezionati, una parte conservati nella BIT Gaslini e in parte utilizzati (sia freschi che dopo congelamento in liquido apposito) per le Fasi 2- 6 del Progetto.

Schematizzazione del flusso di consegna dei campioni per PREME.

Tipo di materiale:

Midollo Osseo (2 ml per cresta, tot. 4 ml).

Sangue Periferico (5-10 ml) (e post mortem, 20-50 ml).

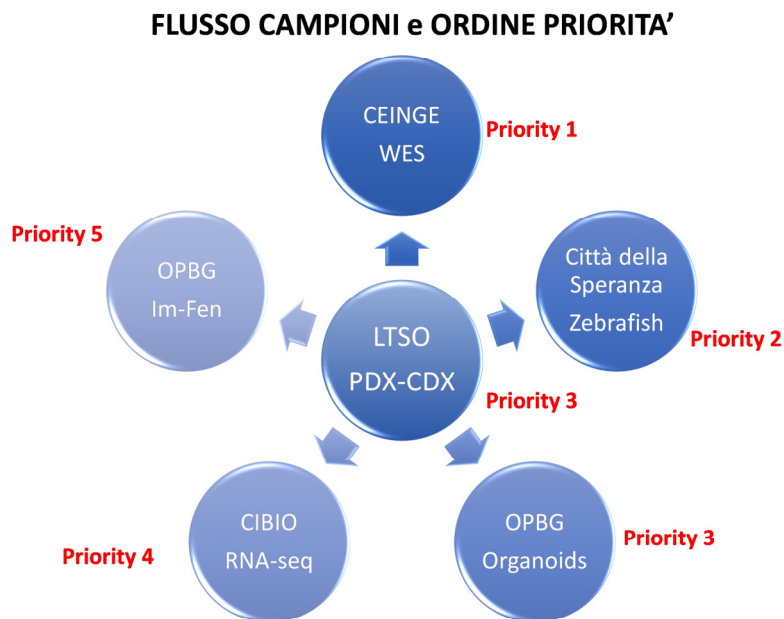
1-2 pezzi/frammenti di massa primaria/recidiva (biopsia chirurgica) o ago biopsia, congelati immediatamente post-chirurgia in 90% FCS+10% DMSO. **(I campioni sono dedicati al progetto PREME, quindi da aggiungere a quelli per la centralizzazione)**

Il Laboratorio di Terapie Sperimentali in Oncologia (LTSO; referenti dottori **Fabio Pastorino** e **Chiara Brignole**) riceverà da tutti i centri italiani partecipanti il materiale biologico fresco e congelato, insieme al sangue periferico, di ogni paziente classificato come alto rischio o recidivato, che verrà ridistribuito in base alle priorità:

- 1) Materiale biologico somatico e costituzionale per WES al CEINGE, Napoli
- 2) Materiale biologico per Zebrafish a Città della Speranza, Padova
- 3) Materiale biologico per Organoidi a OPBG, Roma e per PDX-CDX a LTSO, Genova
- 4) Materiale biologico per RNA-seq a CIBIO, Trieste
- 5) Tessuto paraffinato per immuno-fenotipizzazione (Im-Fen) a OPBG, Roma

In riferimento al materiale biologico raccolto all'OPBG (ROMA):

- una parte verrà spedito a LTSO (Genova) che lo distribuirà seguendo le priorità;
- una parte rimarrà all'OPBG per produrre Organoidi.



Fase 2: Caratterizzazione genomica di campioni biologici tumorali di pazienti affetti da NB ad alto rischio

Recenti analisi genomiche di tumori pediatrici, effettuate con tecniche di sequenziamento ad alta efficienza, hanno suggerito che l'identificazione di varianti genetiche sia somatiche che ereditarie

potrebbe essere rilevante nel migliorare la prognosi soprattutto per i tumori altamente aggressivi. Le mutazioni somatiche ricorrenti sono rare nel NB primario, come supportato non solo dai nostri studi. Al contrario, i tumori recidivanti e metastatici sono arricchiti in mutazioni riconosciute come possibili bersagli molecolari, offrendo quindi nuove possibilità terapeutiche. Inoltre, studi di associazione genetica hanno dimostrato che varianti genetiche germinali sia rare che comuni sono associate al NB metastatico. Nel complesso, questi studi hanno suggerito che una maggiore comprensione delle alterazioni genomiche delle forme di NB sia metastatiche che recidivanti potrebbe avere un impatto sulla risposta del paziente alla terapia e quindi, in ultima analisi, sulla prognosi. Proponiamo quindi di dimostrare che le varianti acquisite a livello somatico possano essere fattori genetici utili per lo sviluppo di una strategia di terapia personalizzata per i pazienti affetti da HR-NB. Inoltre, il NB mostra un'elevata eterogeneità genetica. Infatti, il tessuto tumorale dei pazienti affetti da HR-NB presenta svariate alterazioni sia numeriche che strutturali del numero di copie geniche associate allo sviluppo del tumore. Alcune mutazioni geniche coinvolte nelle vie cellulari sono in grado di aumentare l'aggressività del tumore. Quindi, alcuni cloni cellulari più aggressivi di altri potrebbero essere responsabili delle metastasi distali grazie ad una maggiore capacità di migrazione. Ci proponiamo di studiare l'espansione clonale del NB e di identificare il clone cellulare più aggressivo e potenzialmente responsabile del processo metastatico. Pertanto, abbiamo in programma di analizzare cellule di NB infiltranti il Midollo Osseo e confrontarle con i dati ottenuti sul plasma (biopsia liquida) e la biopsia tumorale degli stessi pazienti. I nostri obiettivi sono: a) monitorare l'evoluzione dei cloni cellulari, delle mutazioni del DNA e dei profili di espressione genica di microRNA e mRNA durante la chemioterapia/immunoterapia al fine di ridurre il rischio di recidiva; b) identificare le cosiddette "actionable mutations", cioè quelle mutazioni per le quali è possibile intervenire attraverso un bersagliamento selettivo, principalmente nei tumori metastatici e ricorrenti al fine di poter attuare una strategia terapeutica personalizzata; c) confrontare il profilo genetico-molecolare (analisi mutazionale, variazione del numero di copie) dei pazienti recidivanti con quello dei modelli di xenotrapianto ottenuti dall'impianto di cellule tumorali del paziente o linee cellulari primarie.

Il nostro obiettivo finale sarà anche quello di dimostrare che le mutazioni geniche acquisite a livello somatico possono rappresentare bersagli molecolari utili per il disegno di strategie terapeutiche di precisione, in modelli pre-clinici prima e, successivamente, per pazienti affetti da HR-NB.

Fase 3: Sviluppo di modelli preclinici 3D "in vitro" clinicamente rilevanti: sferoidi e organoidi tumorali

Nel campo dell'oncologia, la scoperta di farmaci, intesa sia come sviluppo di nuovi composti o il riposizionamento di farmaci già esistenti, è parzialmente compromessa dalla scarsa predittività dei modelli preclinici comunemente usati per lo screening farmacologico. La maggior parte degli studi focalizzati ad individuare composti anti-tumorali efficaci contro il NB recidivante/metastatico sono stati fino ad oggi eseguiti utilizzando sistemi di coltura cellulare 2D, basati su linee cellulari di NB e su modelli di malattia in topo ottenuti attraverso l'impianto di linee cellulari. I modelli preclinici di cui sopra non hanno però una correlazione clinica affidabile. Infatti, non ricapitolano completamente l'eterogeneità intrinseca dell'ecosistema del tumore, che, di per sé, è caratterizzato da un microambiente tumorale dinamico contenente diversi tipi di cellule (cellule tumorali, cellule endoteliali, cellule immunitarie), oltre a chemochine, citochine e fattori di crescita. Inoltre, le linee cellulari tumorali non riflettono le caratteristiche del tumore originario da cui derivano, mostrando, ad esempio, alti livelli di nuove mutazioni. Questo fenomeno è spesso associato ad un alto tasso di fallimento clinico per le molecole che hanno avuto successo nei modelli preclinici. Se ci concentriamo sul NB, la mancanza di modelli sufficientemente idonei a

prevedere l'efficacia dei farmaci nei pazienti ha ostacolato, fino ad ora, lo sviluppo di una terapia su misura per i pazienti affetti da NB ad alto rischio. In questo contesto, diversi sistemi di cultura 3D sono emersi come eccellenti strumenti da poter utilizzare per lo sviluppo della medicina di precisione.

In questo Progetto, ci concentreremo sullo sviluppo di sferoidi tumorali e di organoidi tumorali.

Le diverse caratteristiche degli sferoidi riassumono aspetti chiave del tumore e del suo microambiente: 1) tasso di proliferazione cellulare differente nei diversi strati dello sferoide, 2) stretto contatto cellula-cellula, 3) deposizione di matrice extracellulare (ECM). Similmente a ciò che succede nella massa tumorale, le cellule dello strato esterno degli sferoidi sono altamente proliferanti, le cellule nello strato centrale sono quiescenti e quelle situate nel nucleo dello sferoide sono necrotiche. Ciò è dovuto alla progressiva riduzione del metabolismo cellulare, spostandosi dalla periferia verso il centro, a causa della riduzione della penetrazione di ossigeno e sostanze nutritive.

Gli organoidi tumorali sono modelli cellulari 3D che possono derivare da cellule staminali pluripotenti indotte o da cellule tumorali provenienti dalla massa del paziente. Gli organoidi tumorali consentono alle cellule tumorali di organizzarsi spazialmente in un contesto tridimensionale, mimando meglio il microambiente tumorale. La cultura a lungo termine degli organoidi tumorali è stata già stabilita per diversi tipi di tumori dell'adulto, ma non per quelli pediatrici. Gli organoidi tumorali presentano caratteristiche genetiche e fenotipiche simili a quelle del tumore da cui derivano. Lo sviluppo di organoidi tumorali derivati dal paziente sembra essere particolarmente appropriata per lo screening dei farmaci e per la progettazione di protocolli di medicina personalizzata. È importante sottolineare che anche gli organoidi tumorali derivati dal paziente possono essere crio-preserved e conservati nelle Bio-banche.

Complessivamente, il profilo genico dei modelli 3D sopra descritti, sarà caratterizzato per garantire che il profilo tumorale del paziente di origine sia stato mantenuto. Verrà creata una Bio-banca degli organoidi tumorali costituita da una serie di campioni biologici con caratteristiche genetiche diverse. Questi, a loro volta, saranno utilizzati per i successivi esperimenti di screening e valutazione dei farmaci anti-tumorali.

Fase 4: Sviluppo di modelli preclinici "in vivo" clinicamente rilevanti: xenotrapianti derivati da paziente (PDX)

Gli xenotrapianti ottenuti mediante impianto diretto di frammenti tumorali o sospensioni cellulari derivate da tumori del paziente in topi immunodeficienti (PDX), sono emersi come strumenti importanti per la ricerca traslazionale. Essi, infatti, mantengono la struttura cellulare e istologica del tumore originale, contenendo anche elementi stromali critici. Inoltre, l'analisi molecolare dei tumori PDX ha rivelato una forte conservazione dei profili di espressione genica dei corrispondenti tumori originari del paziente. Nel caso di NB ad alto rischio (HR-NB) recidivante/metastatico, la principale limitazione per lo sviluppo di PDX è rappresentata dalla difficoltà di accedere a una quantità sufficiente di materiale biologico fresco. In tal caso, la possibilità di isolare le cellule di NB infiltranti il Midollo Osseo di pazienti affetti da NB ad alto rischio rappresenta un'opzione valida per la creazione di PDX.

In questo progetto, frammenti di tumore del paziente e/o sospensioni cellulari saranno impiantati in topi immunodeficienti (NSG). In particolare, la prima generazione di topi portanti il tumore (indicati con P_0) sarà ottenuta iniettando i campioni tumorali per via sottocutanea. Le successive generazioni di topi (indicati come P_1 - P_n) verranno quindi ottenuti mediante l'impianto, sottocutaneo o ortotopico (nella ghiandola surrenale), dei frammenti tumorali/sospensioni cellulari derivate dai tumori dei topi P_0 . Ad ogni successiva generazione di PDX, un frammento del tumore sarà valutato geneticamente e fenotipicamente per determinare eventuali differenze dal

tumore del paziente di origine. Un secondo frammento verrà congelato per creare una Bio-banca di PDX con caratteristiche genetiche diverse e da utilizzare, in seguito, per lo screening e la valutazione dei farmaci anti-tumorali.

Oltre ai modelli PDX sopraccitati, saranno messi a punto anche dei modelli di NB in zebrafish. Esistono già i modelli transgenici di NB in zebrafish, in cui l'espressione di MYCN o LIN28B umano è sotto il controllo del promotore della dopamina beta idrossilasi (D β H) di zebrafish. Questi modelli sono caratterizzati da un esordio precoce, proprio come il tumore pediatrico, e presentano le caratteristiche istologiche e molecolari tipiche del NB umano. Lo zebrafish può essere considerato, grazie alle sue peculiarità, un modello economico sia per lo screening, sia per lo sviluppo di nuovi farmaci utili per i pazienti HR-NB. Un'altra possibilità di studio è rappresentata dagli xenotrapianti effettuati nelle larve di zebrafish. Questo modello può essere ottenuto tramite impianto di cellule derivate da paziente, nelle larve di zebrafish, andando a ottenere i cosiddetti zPDX, ad oggi sviluppati solo utilizzando cellule da pazienti affetti da cancro colo-rettale. In questo modello gli zPDX rispondevano ai farmaci testati nello stesso modo in cui rispondevano i pazienti, avvalorando quindi il loro potenziale utilizzo come eccellenti strumenti nella medicina di precisione.

Fase 5: Valutazione terapeutica di farmaci anti-tumorali per la creazione di protocolli di medicina di precisione

I tumori derivati dal paziente saranno utilizzati per la valutazione dell'efficacia terapeutica di farmaci anti-tumorali innovativi così come di farmaci già in clinica per la cura dei pazienti affetti da HR-NB. In particolare, i tumori crio-conservati derivati da Bio-banche di organoidi tumorali e PDX, insieme a materiale biologico fresco, raccolto e geneticamente caratterizzato, saranno utilizzati per testare la risposta a nuovi farmaci, la cui selezione sarà basata sul profilo genomico di ogni singolo tumore analizzato, e anche in base a possibili nuove mutazioni rilevate (es. mutazioni ALK e H/KRAS). Organoidi tumorali e PDX verranno anche utilizzati per testare l'efficacia terapeutica dei chemioterapici convenzionali (temozolomide e topotecan o temozolomide e irinotecan), più comunemente usati durante il trattamento della recidiva dei pazienti ad alto rischio.

Inoltre, i centri AIEOP, in collaborazione con SIOOPEN e il centro per la Terapia Innovativa per i pazienti pediatrici oncologici, progetteranno e svilupperanno studi di fase I e di fase II sulla base dei dati ottenuti nella sperimentazione preclinica. Le Unità cliniche partecipano attivamente alle sperimentazioni cliniche internazionali di prima linea, di seconda linea e di fase 1 all'interno della rete SIOOPEN, dove hanno la responsabilità di coordinare a livello nazionale i diversi trials clinici. La collaborazione tra clinici e ricercatori permetterà di studiare i cloni cellulari responsabili delle recidive e delle metastasi midollari nei pazienti affetti da HR-NB e di individuare le mutazioni che possono essere bersagliate con i farmaci più promettenti. Questo Progetto permetterà di creare la più ampia coorte di pazienti affetti da NB metastatico, caratterizzati a livello molecolare, segnalata fino ad oggi.

Tramite l'ambulatorio DOPO, sarà possibile garantire un follow-up a distanza dei soggetti lungosopravvissuti da tumore pediatrico garantendo quindi una valutazione dei possibili effetti a distanza delle terapie tradizionali così come delle terapie innovative adottate nell'ambito di questo Progetto pluriennale.

Fase 6: Caratterizzazione fenotipica della componente immunitaria nei campioni biologici tumorali di pazienti affetti da NB ad alto rischio

Le cellule immuni infiltranti i tessuti neoplastici sono importanti componenti del microambiente tumorale e mediatori della risposta ai trattamenti di chemio e radioterapia. La presenza di cellule T

citotossiche è considerata un importante indicatore prognostico per molte neoplasie, compreso il NB. Studi sulla caratterizzazione fenotipica della componente immune nei tessuti di NB all'esordio hanno infatti dimostrato che la presenza di cellule T effettrici ha un valore prognostico superiore ed indipendente dai criteri attualmente utilizzati per classificare i NB. Informazioni sulla quantità, distribuzione spaziale e tipologia di cellule immuni infiltranti i tessuti di NB post-trattamento e recidivati sono invece molto scarse. Nel presente progetto proponiamo quindi di valutare la presenza di infiltrato immune (linfociti T, cellule NK, macrofagi, cellule dendritiche) nei tessuti di HR-NB all'esordio, post trattamento e recidivati, mediante citofluorimetria a flusso, immunohistochimica ed immunofluorescenza multipla.

Significatività, innovazione e trasferibilità.

La filosofia principale di PREME è la sua duttilità che mira ad integrare i progressi scientifici e medici, non appena disponibili, al fine di migliorare gli esiti finali, mantenendo sempre un elevato grado di sicurezza. È da sottolineare che PREME è fortemente innovativo in Italia e mostra una svolta nell'approccio terapeutico ai pazienti oncologici. Tutti i pazienti verranno sottoposti a biopsia midollare o di altri siti metastatici al momento della diagnosi. Per quei pazienti, diagnosticati come metastatici, verrà eseguito il profilo genomico delle metastasi e saranno effettuati studi preclinici per testare potenziali nuovi farmaci. Nel frattempo, questi pazienti riceveranno la chemioterapia secondo i protocolli terapeutici di prima linea SIOOPEN. In seguito, in caso di recidiva, saranno nuovamente sottoposti a test per valutare se la recidiva sia stata causata dall'espansione di una mutazione già presente alla diagnosi o da una nuova mutazione. Questi pazienti saranno trattati in modo personalizzato, utilizzando le informazioni terapeutiche precedentemente testate nella piattaforma preclinica. Per i pazienti che saranno caratterizzati solo al momento della recidiva, verrà studiato il profilo molecolare per offrire la possibilità di utilizzare il farmaco più appropriato in un protocollo di fase 1.

L'obiettivo finale di PREME è porre le basi per lo sviluppo della cosiddetta "medicina di precisione". Infatti, nuovi pazienti affetti da patologie tumorali ad alto rischio avranno la possibilità di beneficiare delle informazioni terapeutiche ottenute utilizzando le piattaforme precliniche proposte. Questa cooperazione darà l'opportunità di effettuare valutazioni cliniche prospettive nell'ottica di individuare nuovi biomarcatori per la risposta al trattamento, oncogeni in modelli tumorali pediatrici preclinici, appropriate combinazioni farmacologiche, e infine nuovi approcci bioinformatici per investigare l'evoluzione tumorale, nonché strumenti per la medicina di precisione.

Referenze

- Overcoming Biological Barriers in Neuroblastoma Therapy: The Vascular Targeting Approach with Liposomal Drug Nanocarriers. Pastorino F, Brignole C, Di Paolo D, Perri P, Curnis F, Corti A, Ponzoni M. *Small* 2019 Mar;15(10):e1804591. doi: 10.1002/sml.201804591. Epub 2019 Feb 1.
- Preclinical evaluation of the first intravenous small molecule MDM2 antagonist alone and in combination with temozolomide in neuroblastoma. Chen L, Pastorino F, Berry P, Bonner J, Kirk C, Wood KM, Thomas HD, Zhao Y, Daga A, Veal GJ, Lunec J, Newell DR, Ponzoni M, Tweddle DA. *Int J Cancer*. 2019 Jun 15;144(12):3146-3159. doi: 10.1002/ijc.32058. Epub 2019 Jan 9.
- Enhancement of Tumor Homing by Chemotherapy-Loaded Nanoparticles. Ponzoni M, Curnis F, Brignole C, Bruno S, Guarnieri D, Sitia L, Marotta R, Sacchi A, Bauckneht M, Buschiazzo A, Rossi A, Di Paolo D, Perri P, Gori A, Sementa AR, Emionite L, Cilli M, Tamma R, Ribatti D, Pompa PP, Marini C, Sambucetti G, Corti A, Pastorino F. *Small* 2018 Nov;14(45):e1802886. doi: 10.1002/sml.201802886. Epub 2018 Oct 7.
- Investigational drugs in phase II clinical trials for the treatment of neuroblastoma. Amoroso L, Haupt R, Garaventa A, Ponzoni M. *Expert Opin Investig Drugs* 2017 Nov;26(11):1281-1293. doi: 10.1080/13543784.2017.1380625. Epub 2017 Sep 26.
- Tumor regression and curability of preclinical neuroblastoma models by PEGylated SN38 (EZN-2208), a novel topoisomerase I inhibitor. Pastorino F, Loi M, Sapra P, Becherini P, Cilli M, Emionite L, Ribatti D, Greenberger LM, Horak ID, Ponzoni M. *Clin Cancer Res* 2010 Oct 1;16(19):4809-21. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1354. Epub 2010 Aug 11.
- Enhanced antitumor efficacy of clinical-grade vasculature-targeted liposomal doxorubicin. Pastorino F, Di Paolo D, Piccardi F, Nico B, Ribatti D, Daga A, Baio G, Neumaier CE, Brignole C, Loi M, Marimpietri D, Pagnan G, Cilli M, Lepekhin EA, Garde SV, Longhi R, Corti A, Allen TM, Wu JJ, Ponzoni M. *Clin Cancer Res* 2008 Nov 15;14(22):7320-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0804.
- Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy. Pastorino F, Brignole C, Di Paolo D, Nico B, Pezzolo A, Marimpietri D, Pagnan G, Piccardi F, Cilli M, Longhi R, Ribatti D, Corti A, Allen TM, Ponzoni M. *Cancer Res* 2006 Oct 15;66(20):10073-82.
- Exome and deep sequencing of clinically aggressive neuroblastoma reveal somatic mutations that affect key pathways involved in cancer progression. Lasorsa VA, Formicola D, Pignataro P, Cimmino F, Calabrese FM, Mora J, Esposito MR, Pantile M, Zanon C, De Mariano M, Longo L, Hogarty MD, de Torres C, Tonini GP, Iolascon A, Capasso M. *Oncotarget* 2016 Apr 19;7(16):21840-52. doi: 10.18632/oncotarget.8187.
- Kinome expression profiling of human neuroblastoma tumors identifies potential drug targets for ultra high-risk patients. Russo R, Cimmino F, Pezone L, Manna F, Avitabile M,

Langella C, Koster J, Casale F, Raia M, Viola G, Fischer M, Iolascon A, Capasso M. *Carcinogenesis* 2017 Oct 1;38(10):1011-1020. doi: 10.1093/carcin/bgx077.

- An 18 gene expression-based score classifier predicts the clinical outcome in stage 4 neuroblastoma. Formicola D, Petrosino G, Lasorsa VA, Pignataro P, Cimmino F, Vetrella S, Longo L, Tonini GP, Oberthuer A, Iolascon A, Fischer M, Capasso M. *J Transl Med* 2016 May 17;14(1):142. doi: 10.1186/s12967-016-0896-7.
- Fine mapping of 2q35 high-risk neuroblastoma locus reveals independent functional risk variants and suggests full-length BARD1 as tumor-suppressor. Cimmino F, Avitabile M, Diskin SJ, Vaksman Z, Pignataro P, Formicola D, Cardinale A, Testori A, Koster J, de Torres C, Devoto M, Maris JM, Iolascon A, Capasso M. *Int J Cancer*. 2018 Dec 1;143(11):2828-2837. doi: 10.1002/ijc.31822. Epub 2018 Oct 4.
- LIN28B increases neural crest cell migration and leads to transformation of trunk sympathoadrenal precursors. Corallo D, Donadon M, Pantile M, Sidarovich V, Cocchi S, Ori M, De Sarlo M, Candiani S, Frasson C, Distel M, Quattrone A, Zanon C, Basso G, Tonini GP, Aveic S. *Cell Death Differ* 2019 Oct 10. doi: 10.1038/s41418-019-0425-3.
- Calcium phosphate scaffolds with defined interconnecting channel structure provide a mimetic 3D niche for bone marrow metastasized tumor cell growth. Aveic S, Davtalab R, Vogt M, Weber M, Buttler P, Tonini GP, Fischer H. *Acta Biomater* 2019 Apr 1;88:527-539. doi: 10.1016/j.actbio.2019.02.030. Epub 2019 Feb 20.
- Exploring Cancer Cell Behavior In Vitro in Three-Dimensional Multicellular Bioprintable Collagen-Based Hydrogels. Duarte Campos DF, Bonnin Marquez A, O'Seanain C, Fischer H, Blaeser A, Vogt M, Corallo D, Aveic S. *Cancers (Basel)*. 2019 Feb 5;11(2). pii: E180. doi: 10.3390/cancers11020180.
- TP-0903 inhibits neuroblastoma cell growth and enhances the sensitivity to conventional chemotherapy. Aveic S, Corallo D, Porcù E, Pantile M, Boso D, Zanon C, Viola G, Sidarovich V, Mariotto E, Quattrone A, Basso G, Tonini GP. *Eur J Pharmacol* 2018 Jan 5;818:435-448. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.11.016. Epub 2017 Nov 14.
- PD-L1 Is a Therapeutic Target of the Bromodomain Inhibitor JQ1 and, Combined with HLA Class I, a Promising Prognostic Biomarker in Neuroblastoma. Melaiu O, Mina M, Chierici M, Boldrini R, Jurman G, Romania P, D'Alicandro V, Benedetti MC, Castellano A, Liu T, Furlanello C, Locatelli F, Fruci D. *Clin Cancer Res* 2017 Aug 1;23(15):4462-4472. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2601. Epub 2017 Mar 7.
- Tumor-infiltrating T lymphocytes improve clinical outcome of therapy-resistant neuroblastoma. Mina M, Boldrini R, Citti A, Romania P, D'Alicandro V, De Ioris M, Castellano A, Furlanello C, Locatelli F, Fruci D. *Oncoimmunology* 2015 Apr ;4(9):e1019981. eCollection 2015 Sep.
- IRF1 and NF- κ B restore MHC class I-restricted tumor antigen processing and presentation to cytotoxic T cells in aggressive neuroblastoma. Lorenzi S, Forloni M, Cifaldi L, Antonucci C, Citti A, Boldrini R, Pezzullo M, Castellano A, Russo V, van der Bruggen P, Giacomini P,

Locatelli F, Fruci D. PLoS One 2012;7(10):e46928. doi: 10.1371/journal.pone.0046928. Epub 2012 Oct 5.

- NF-kappaB, and not MYCN, regulates MHC class I and endoplasmic reticulum aminopeptidases in human neuroblastoma cells. Forloni M, Albin S, Limongi MZ, Cifaldi L, Boldrini R, Nicotra MR, Giannini G, Natali PG, Giacomini P, Fruci D. Cancer Res 2010 Feb 1;70(3):916-24. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2582. Epub 2010 Jan 26. Erratum in: Cancer Res. 2010 Apr 1;70(7):2995.

Il progetto avrebbe un costo complessivo così di seguito schematizzato:

BUDGET FORM

| | 1 anno | 2 anno | 3 anno | Totale |
|---|------------------|------------------|------------------|--------------------|
| Costi diretti | | | | |
| <i>Consumabili</i> | 100.000 € | 100.000 € | 100.000 € | 390.000 € |
| <i>Piccola strumentazione (i.e. leasing, rent)</i> | 10.000 € | 10.000 € | 10.000 € | 30.000 € |
| <i>Servizi (i.e. imaging)</i> | 15.000 € | 15.000 € | 15.000 € | 45.000 € |
| <i>Subcontracts (i.e. sequencing)</i> | 50.000 € | 50.000 € | 50.000 € | 150.000 € |
| <i>-Topi (vari strain, acquisto e mantenimento colonia) e costi veterinario.</i> <i>-Zebrafish</i> | 50.000 € | 50.000 € | 50.000 € | 150.000 € |
| <i>Pubblicazioni</i> | 3.000 € | 6.000 € | 9.000 € | 30.000 € |
| <i>Meetings</i> | 5.000 € | 10.000 € | 10.000 € | 30.000 € |
| Costi Personale (3 tecnici lab.) | 75.000 € | 75.000 € | 75.000 € | 225.000 € |
| Costi indiretti | 0 € | 0 € | 0 € | 0 € |
| SUBTOTALE | 308.000 € | 316.000 € | 319.000 € | 943.000 € |
| Overheads | 24.640 € | 25.280 € | 25.520 € | 75.440 € |
| TOTALE | 332.640 € | 341.280 € | 344.520 € | 1.018.440 € |

Nel costo presunto del Progetto vanno però considerati i finanziamenti che molti gruppi già ricevono dedicati al Progetto o a Progetti sovrapponibili. Quindi, qui di seguito è riportato il Budget minimo necessario per l'inizio del progetto:

| | 1 anno | 2 anno | 3 anno | Totale |
|------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Consumabili | 15000 | 15000 | 15000 | 45000 |
| Servizi: sequencing, imaging | 20000 | 20000 | 18000 | 58000 |
| Topi e Zebrafish | 20000 | 20000 | 18000 | 58000 |
| Pubblicazioni | 0 | 0 | 4000 | 4000 |
| Totale | 55000 | 55000 | 55000 | 165000 |