

## S.S. Malattie Linfoproliferative

### Studio prospettico dei fattori di prognosi molecolari e cellulari della leucemia linfatica cronica

*Linea di ricerca:* 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

*Programma:* a - Definizione del profilo di rischio individuale in pazienti con neoplasia in fase iniziale o avanzata

*Responsabile scientifico:* Giovanna Cutrona

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Simona Zupo, Mauro Megna

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* leucemia linfatica cronica; stimolazione antigenica; fattori prognostici; immunoglobuline di superficie; progressione neoplastica

*Altre strutture IST partecipanti:* S.C. Oncologia Medica C (M. Ferrarini, D. Reverberi, R. Massara)

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica osservazionale

*Area di interesse:* diagnostica

*Soggetti cofinanziatori:* GISL; Compagnia di San Paolo

#### *Background*

La leucemia linfatica cronica (CLL) è una malattia linfoproliferativa caratterizzata dall'accumulo di linfociti B di piccola taglia nel sangue periferico e negli organi linfoidi periferici. La B-CLL è una malattia che insorge nell'anziano con una incidenza di 3-4 casi su 100.000. Il decorso clinico è eterogeneo, alcuni pazienti sopravvivono per lungo tempo senza bisogno di intervento terapeutico, altri soccombono rapidamente. In passato si pensava che la malattia fosse di accumulo di linfociti B immuno-incompetenti con un apparato apoptotico difettivo. Attualmente la B-CLL è considerata una patologia di cellule B immunocompetenti che si rinnovano continuamente. Le capacità proliferative variano a seconda dei casi e la risposta antigenica è probabilmente coinvolta nella regolazione della proliferazione del clone leucemico.

Negli ultimi dieci anni sono stati identificati diversi marcatori prognostici. Tra questi, tre importanti che possono predire con una certa precisione il decorso clinico dei pazienti con CLL, sono CD38, ZAP-70, e stato mutazionale dei geni VH delle immunoglobuline. Sia l'espressione del CD38 che dello ZAP-70 hanno un alto valore prognostico indipendente, tuttavia per definire i casi positivi o negativi le metodiche di misurazione devono ancora essere standardizzate per un uso clinico di routine. A questi marcatori si aggiungono le anomalie cromosomiche, quali la delezione del 17q13 (che coinvolge il gene p53) e dell'11q22-23 che sono di cattiva prognosi. Tuttavia queste anomalie si osservano nelle fasi tardive di malattia.

Nel tentativo di chiarire il peso che i marcatori di prognosi già studiati hanno, da soli o in combinazione, all'esordio e durante il corso della malattia è stato approvato e attivato dal GISL (gruppo Italiano linfomi) nel 2007 un protocollo osservazionale prospettico O-CLL1-"Prospective Collection of Biological Data of Prognostic Relevance in Patients with B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia" nell'ambito del quale gli studi biologici e molecolari su almeno 500 pazienti con CLL saranno centralizzati nel nostro istituto. Questo anche allo scopo di standardizzare le metodiche di misurazione dei fattori di prognosi e testarne di nuovi, oltre che valutare il significato prognostico di nuove alterazioni cromosomiche possibilmente patogenetiche della malattia.

#### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

L'obiettivo principale del progetto è di sviluppare un indice prognostico biologico in pazienti con leucemia linfatica cronica in stadio Binet A alla diagnosi che non necessitano di terapia in accordo con le linee guida NCI e validare in maniera prospettica lo score proposto basato sulla presenza/assenza di 1, 2, o 3 marcatori di prognosi sfavorevoli come CD38, ZAP-70 e stato mutazionale dei geni IgV. Sulla base di questo sistema di score i pazienti saranno divisi in tre gruppi: basso rischio (score 0), rischio intermedio (score 1) e alto rischio (score 2-3), con decorso clinico significativamente differente.

Gli obiettivi secondari saranno i seguenti:

1. Produzione di un grande database di almeno 500 casi di leucemia linfatica cronica classificati secondo marcatori di prognosi classici (ZAP-70, CD38, stato mutazionale dei geni IgV e la maggior parte delle alterazioni citogenetiche tipiche della CLL).
2. Standardizzazione delle metodiche per l'analisi dei marcatori di prognosi CD38 e ZAP-70
3. Determinazione e validazione di nuovi marcatori capaci di distinguere nuovi sottogruppi di CLL in clinica. I casi di CLL saranno testati per altri marcatori che sono espressi in maniera variabile, come il CD22 e le immunoglobuline di superficie IgM e IgD o IgG e IgA (come intensità media di fluorescenza, MFI). Infatti studi preliminari sulla proliferazione/apoptosi/sopravvivenza di cellule di CLL stimulate in vitro via IgM o IgD di superficie, hanno dimostrato differenze nelle vie di trasduzione di segnale attivate dai due diversi isotipi, le quali possono spiegare il differente esito della stimolazione stessa. Le differenze in magnitudine di risposta dipendono anche dall'espressione delle Ig di superficie (MFI) che possono diventare un utile marcatore prognostico facile da testare.

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

- Inoltre sono stati fatti degli studi preliminari sull'identificazione di molecole che sono espresse in maniera differenziale nei sottogruppi di CLL (come TNFR1, TNFR2, PTEN, CRY1, SRI, LPL, IL21-R, IL23-R). Questi marcatori saranno validati a livello cellulare mediante citofluorimetria e/o e testate per il loro valore predittivo in clinica.
- Valutazione di nuove alterazioni cromosomiche possibilmente patogenetiche della malattia mediante analisi SNP (studio integrato genomico).

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

La standardizzazione dei marcatori di prognosi già conosciuti e la validazione nell'ambito di una casistica ben studiata di pazienti all'esordio di malattia e alla progressione ha un'importanza notevole nella decisione di quali marcatori utilizzare per conoscere e individuare precocemente i casi di CLL (circa il 30%) che vanno incontro rapidamente a progressione di malattia e poi a morte nonostante le attuali terapie.

In aggiunta la validazione di nuovi marcatori prognostici e anomalie cromosomiche capaci di distinguere nuovi sottogruppi di CLL in clinica possono essere di valido aiuto nella classificazione di questa malattia e modificare in ultima analisi l'attuale approccio terapeutico soprattutto nei casi a cattiva prognosi.

### *Risultati e prodotti 2009*

Nel 2009 sono stati arruolati nell'ambito del protocollo osservazionale prospettico O-CLL1 attivato dal GISL (gruppo Italiano linfomi) 100 nuovi casi di CLL. Questi campioni, tutti da pazienti con leucemia linfatica cronica in stadio Binet A alla diagnosi, sono stati analizzati per l'espressione dei marcatori di prognosi conosciuti: CD38, ZAP-70 e stato mutazionale dei geni IgV. Sulla base della presenza/assenza di 1, 2, o 3 di questi marcatori di prognosi sfavorevoli abbiamo ottenuto n 46 casi con score 0, 24 casi con score 1, 17 casi a score 2 e 9 casi a score 3.

I casi di CLL sono stati inoltre testati per altri marcatori che sono espressi in maniera variabile, come il CD22 e le immunoglobuline di superficie IgM e IgD o IgG e IgA (come intensità media di fluorescenza, MFI). Infatti studi preliminari sulla proliferazione/apoptosi/sopravvivenza di cellule di CLL stimolate in vitro via IgM o IgD di superficie, hanno dimostrato differenze nelle vie di trasduzione di segnale attivate dai due diversi isotipi, le quali possono spiegare il differente esito della stimolazione stessa. Le differenze in magnitudine di risposta dipendono anche dall'espressione delle Ig di superficie (MFI) che possono diventare un utile marcatore prognostico facile da testare. Abbiamo infatti dimostrato che la risposta in vitro alla stimolazione via IgD di superficie e l'intensità di fluorescenza delle IgD di membrana sono correlate direttamente ad una prognosi sfavorevole (Morabito et al. Br. J. Haematol., Epub 2009).

Inoltre tutti i casi sono stati testati per TNFR1, TNFR2, IL21-R, IL23-R, nuovi marcatori biologici differentemente espressi nella CLL. Il TNFR1 non è mai espresso dalle cellule di CLL, di contro il TNFR2 è espresso per lo più dalle CLL che hanno geni delle VH non mutati e quindi a prognosi sfavorevole. Anche IL23-R sembra correlare con i fattori di prognosi sfavorevoli.

### *Pubblicazioni*

Cro L.-Morabito F.-Zucal N.-Fabris S.-Lionetti M.-Cutrona G.-Rossi F.-Gentile M.-Ferrario A.-Ferrarini M.-Molica S.-Neri A.-Baldini L.

CD26 expression in mature B-cell neoplasia: its possible role as a new prognostic marker in B-CLL.  
Hematol. Oncol. 27(3):140/147, 2009

Gentile M.-Cutrona G.-Neri A.-Molica S.-Ferrarini M.-Morabito F.

Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages.  
Haematologica. 94(6):887/888, 2009

Matis S.-Mariani M.R.-Cutrona G.-Cilli M.-Piccardi F.-Daga A.-Damonte G.-Millo E.-Moroni M.-Roncella S.-Fedeli F.-Boffa L.C.-Ferrarini M.

PNAE $\mu$  can significantly reduce Burkitt's lymphoma tumor burden in a SCID mice model: cells dissemination similar to the human disease.  
Cancer Gene Therapy 16:786/793, 2009

Molica S.-Digiesi G.-Mauro F.-Mirabelli R.-Cutrona G.-Vitelli G.-Morabito F.-Iuliano F.-Foà R.-Ferrarini M.

Increased serum BAFF (B-cell activating factor of the TNF family) level is a peculiar feature associated with familial chronic lymphocytic leukemia.  
Leuk. Res. 33(1):162/165, 2009

Molica S.-Digiesi G.-Mirabelli R.-Cutrona G.-Antenucci A.-Molica M.-Giannarelli D.-Sperduti I.-Morabito F.-Neri A.-Baldini L.-Ferrarini M.

Serum level of CD26 predicts time to first treatment in early B-chronic lymphocytic leukemia.  
Eur. J. Haematol. 83(3):208/214, 2009

Morabito F.-Cutrona G.-Gentile M.-Fabbi M.-Matis S.-Colombo M.-Reverberi D.-Megna M.-Spriano M.-Callea V.-Vigna E.-Rossi E.-Lucia E.-Festini G.-Zupo S.-Molica S.-Neri A.-Ferrarini M.

Prognostic relevance of in vitro response to cell stimulation via surface IgD in binet stage a CLL.  
Br. J. Haematol. Epub Dec 8, 2009

Morabito F.-Cutrona G.-Gentile M.-Matis S.-Todoerti K.-Colombo M.-Sonaglio C.-Fabris S.-Reverberi D.-Megna M.-Spriano M.-Lucia E.-Rossi E.-Callea V.-Mazzone C.-Festini G.-Zupo S.-Molica S.-Neri A.-Ferrarini M.

Definition of progression risk based on combinations of cellular and molecular markers in patients with Binet stage A chronic lymphocytic leukaemia.  
Br. J. Haematol. 146(1):44/53, 2009

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

### *Attività previste e risultati attesi nel 2010*

I pazienti con CLL continueranno ad essere arruolati nel 2010, sia gli esordi di malattia sia le progressioni di malattia dei pazienti precedentemente inseriti nel protocollo. Tutti i casi saranno nuovamente testati per i fattori di prognosi già conosciuti per valutarne la stabilità nei diversi stadi di malattia e anche per gli altri marcatori il cui significato prognostico e biologico non è ancora chiarito nella patogenesi della malattia. Saranno condotti studi in vitro per chiarire la trasduzione del segnale delle IgD e in particolare saranno analizzate le proteine coinvolte nelle reazioni redox: Tiredoxina, VDUP e produzione di tioli.

In parallelo saranno condotti degli studi in vitro di CLL che esprimono elevati livelli di TNFR11, coltivate in presenza di TNF alfa.

Stiamo inoltre mettendo a punto un modello animale che consiste in topi Nod/SCID in cui le cellule fresche di CLL vengono inoculate sottocute o nella vena caudale.

Le cellule di CLL saranno precedentemente transfettate con il gene della luciferasi che le rende visibili in luminescenza, in presenza della luciferina che è il substrato di questo enzima, con l'IVIS "imaging system". A questo scopo stiamo mettendo a punto, in collaborazione col Dr Daga, un plasmide lenti virale che dovrebbe essere in grado di entrare nelle cellule che non si moltiplicano in vitro. Nell'ambito di queste sperimentazioni l'obiettivo è quello di chiarire il ruolo del TNF alfa nella patogenesi della CLL e il possibile utilizzo di farmaci di nuova generazione atti a bloccare la via TNFR11-TNF mediata.

**Miglioramento e standardizzazione delle tecniche di diagnostica molecolare per la determinazione dei marcatori genici predittivi nei carcinomi polmonari e del colon-retto. Applicabilità di questa problematica diagnostica alla organizzazione sanitaria della Regione Liguria**

*Linea di ricerca:* 3 - ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

*Programma:* b - Predizione della risposta ai trattamenti, inclusa la possibilità di valutare precocemente la risposta definitiva

*Responsabile Scientifico:* Simonetta Zupo

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Giannamaria Cerruti, Carlotta Massucco

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* marcatori genici predittivi; carcinoma colon retto; NSCLC; K-RAS; EGFR

*Altre strutture IST partecipanti:* S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini); S.S. Genomica Funzionale (U. Pfeffer); S.C. Oncologia Medica A (F. Grossi)

*Altri Enti coinvolti:* S.C. Oncologia Medica, A.O.U. San Martino, Genova (A. Sobrero)

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica osservazionale

*Area di interesse :* diagnostica

### *Background*

La cura delle malattie oncologiche sta subendo una vera e propria rivoluzione legata alla crescita esponenziale delle conoscenze scientifiche e delle possibilità tecnologiche di cui oggi si dispone. Un elevatissimo numero di nuovi markers con possibile significato prognostico e predittivo di sensibilità alle diverse opzioni terapeutiche sono costantemente al vaglio per essere aggiunte alle indagini già presenti nella pratica clinica. L'obiettivo è quello di avere un pattern di informazioni di natura biologica finalizzate a caratterizzare ogni singolo paziente in base al rischio e alle capacità di risposta ai vari tipi di trattamento oggi disponibili. Questo allo scopo di evitare trattamenti laddove non siano necessari ed individuare invece gli strumenti terapeutici più efficaci per i casi ad elevato rischio di evoluzione sfavorevole. Questo approccio diagnostico/prognostico, che vede associare alle tecniche tradizionali nuovi markers genetici, in alcuni casi è già una realtà per cui sulle basi di informazioni di questa natura vengono adottate strategie terapeutiche differenziate. Un esempio è rappresentato dallo studio del gene k-ras che è frequentemente mutato nei tumori umani, in particolare nel cancro del colon retto ma non solo (per es. pancreas, polmone). Mutazioni nei codoni 12-13 dell'esone 2 del gene k-ras sono associate a prognosi sfavorevole e conferiscono resistenza ai trattamenti con cetuximab o panitumumab nei pazienti con tumore al colon retto metastatico. Per questo motivo l'EMEA ha approvato l'uso del cetuximab e del panitumumab per il trattamento del tumore al colon retto metastatico solo in pazienti con neoplasie k-ras wild type. Lo stato mutazionale del gene EGFR nelle cellule di NSCLC è un altro esempio di biomarker con significato predittivo per il trattamento con erlotinib. Nonostante siano entrate rapidamente nella pratica clinica, queste indagini sono ancora da considerarsi in fase di studio per quanto riguarda le gli aspetti metodologici. Infatti non è ancora stata eseguita una vera e propria standardizzazione che definisca la metodica da utilizzarsi, i parametri di sensibilità, di specificità e i cut off con significato clinico.

Oltre a tutto ciò, purtroppo i markers genetici fino ad oggi individuati hanno dimostrato un potere predittivo parziale. Per esempio, nel caso del tumore del colon-retto, il marker k-ras wild type non identifica tutti i pazienti responsivi alla terapia con cetuximab/panitumumab, una percentuale significativa di pazienti (30-40%) comunque non risponde alla terapia. Questo vuol dire che sono necessari nuovi markers molecolari da aggiungere a quelli noti, da ricercare nelle pathways legate alla proliferazione, differenziamento e morte cellulari e che potrebbero spiegare la resistenza a questi

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

tipi di terapia. Effettivamente molti geni sono già in esame da questo punto di vista; sono però necessarie validazioni perché possono essere considerati markers predittivi di utilizzo clinico.

### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

L'oggetto del progetto riguarda lo studio di biomarkers molecolari con significato prognostico e/o predittivo di risposta a specifiche terapie nei seguenti tumori: polmone, colon-retto.

Obiettivo generale: l'obiettivo generale della presente proposta è quello di fornire al SSN, uno strumento operativo attraverso il quale precise problematiche cliniche di natura molecolare possano essere affrontate mediante tecnologie all'avanguardia, riproducibili e il cui costo sia contenuto entro limiti accettabili e che seguano stringenti criteri di appropriatezza e qualità. Quindi, il primo obiettivo è quello di assicurare a tutti i pazienti oncologici della Regione Liguria, anche se provenienti da piccoli centri periferici, tutte le indagini molecolari già introdotte nella pratica clinica e ormai indispensabili per un approccio terapeutico corretto seguendo gli standard di qualità e appropriatezza descritti.

Obiettivi specifici:

1) Definire la tecnica "gold standard" per la determinazione di ogni singola indagine clinica che tenga presente anche degli aspetti economici, di tempo e di applicabilità ad una routine clinica. Questo allo scopo di definire una serie di parametri di sensibilità e specificità che a tutt'oggi ancora non sono stati definiti, per cui queste indagini debbono essere considerate ancora sperimentali dal punto di vista clinico.

2) Trasferire, una volta che le metodiche siano state validate e standardizzate dall'IST, le conoscenze e le attività ai laboratori periferici che abbiano le competenze e le attrezzature adeguate per indagini molecolari.

3) Individuare nuovi marcatori che possano ulteriormente stratificare i pazienti oncologici sulle basi del rischio e sulle basi della loro sensibilità a specifici trattamenti. In particolare, per il carcinoma colon retto si intende identificare e validare markers biologici predittivi della risposta a trattamenti con anti EGFR in pazienti con ca. colon retto e stato mutazionale di k-ras wild type. Si vuole indagare se la presenza di mutazioni su geni coinvolti nella pathway di k ras, ma più a valle di k-ras (braf-mek-erk1-erk2), possano identificare i pazienti con k-ras non mutato ma non sensibili alle terapie con anti EGFR.

Per il ca. polmone, in pazienti affetti da NSCLC, si valuteranno alcuni marcatori (ERCC1, RRM1, TS, EGFR, K-Ras) sia come espressione che come presenza di mutazioni somatiche oncogeniche e si metteranno in relazione alla risposta dei pazienti a specifiche strategie terapeutiche

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

La realizzazione del progetto sarà in grado di: 1) assicurare a tutti i pazienti oncologici della Regione Liguria, anche se seguiti nelle diverse ASL ed Aziende, una identica, moderna e mirata strategia terapeutica supportata da tutte le indagini molecolari attualmente disponibili nella pratica clinica, con un conseguente notevole risparmio della spesa sanitaria. 2) migliorare le conoscenze sulla problematica di risposta alle terapie identificando ulteriori nuovi marcatori biologici.

### *Risultati e prodotti 2009*

In questo primo anno di attività si sono affrontate due problematiche distinte: 1) la determinazione di mutazione del gene k ras e di braf nei pazienti affetti da cancro colon rettale; 2) la determinazione di mutazioni nel gene EGFR nei pazienti affetti da NSCLC.

Per entrambe le problematiche come prima cosa si sono messi a punto differenti protocolli di estrazione e purificazione del DNA genomico a seconda della natura del campione da esaminare: tessuti paraffinati, tessuti freschi, piccole biopsie su vetrini ed ancora materiale citologico su vetrino. Per il punto 1) il primo approccio è stato quello di disegnare primers specifici per ciascun gene ed esone di interesse e procedere al sequenziamento genico dei prodotti amplificati in PCR secondo metodo Sanger. Successivamente si sono utilizzati due differenti approcci di realtime PCR in grado di mettere in luce la presenza delle mutazioni dell'esone 2 del gene kras. Infine si sono confrontati i risultati ottenuti con le tre differenti metodiche e si sono stabilite le sensibilità, la specificità e i cut off per ciascuna di esse.

Per il punto 2) cioè lo studio del gene EGFR, l'approccio è stato più complesso perché gli esoni da studiare per la presenza di mutazioni sono tre più un quarto che non risulta mutato bensì deletato. Quindi il test che dia una risposta completa di sensibilità o resistenza alla terapia richiede l'applicazione di più metodiche differenti tra loro. Abbiamo per questo studiato sia tecniche di sequenziamento sia tecniche di studio di micro satelliti.

In conclusione al termine di questo anno di attività abbiamo messo a punto tecniche sensibili e specifiche di biologia molecolare per la determinazione dei markers molecolari kras, egfr e braf noti con significato predittivo di risposta alle terapie anti EGFR.

La casistica studiata in questo primo anno di attività può essere così riassunta:

- determinazioni mutazioni k-ras in pazienti affetti da cancro colon rettale n°140 casi
- determinazione mutazioni braf in pazienti affetti da cancro colon rettale n°40 casi
- determinazioni di egfr in pazienti affetti da NSCLC n°10 casi.

Inoltre siamo entrati a fare parte del progetto programma KRAS AKTIVE come centro di riferimento per la determinazione delle mutazioni di k ras.

### *Attività previste e risultati attesi nel 2010*

Nonostante kras e EGFR siano dei buoni fattori predittivi rimangono sempre pazienti in cui non vi è corrispondenza tra la positività ai fattori predittivi e la risposta clinica. Nel prossimo anno di attività si intende ampliare lo studio sui pazienti con NSCLC ad altri oncogeni che potrebbero influire sulla sensibilità o refrattarietà alla terapia partendo dalle conoscenze sulle pathway di attivazione indotte dalla stimolazione di EGFR, per esempio i geni PTEN, BRAF, MEK. Questo allo scopo di selezionare in maniera sempre più precisa i pazienti sensibili alle target therapy creando un vero e proprio profilo di risposta alle terapie. Inoltre, stiamo studiando una metodica in PCR RealTime per il rilevamento della mutazione T790M dell'esone 20. Infatti, alcuni pazienti responder alla terapia con Tk inibitori sembrano destinati nel tempo (6-12 mesi) ad acquisire resistenza al trattamento terapeutico. Molti di questi pazienti diventati refrattari mostrano avere una seconda mutazione sull'esone 20, appunto la T790M, non presente alla diagnosi. Le ipotesi più

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

accreditate per la comparsa di questa mutazione è che sia già presente ma solo in un piccolo subset di cellule tumorali non rilevabili prima della terapia con le metodiche utilizzate. Questi dati rendono necessarie tecniche di biologia molecolare molto più sensibile per poter individuare la mutazione T790M anche quando presente a livelli molto bassi, cosicché pazienti che devono essere trattati con terapia targeted possano in fase pre-trattamento conoscere in anticipo quale potrebbe essere il loro tipo di risposta alla terapia stessa (soprattutto in termini di progression-free survival). Questo aiuterebbe molto i clinici ad applicare una strategia alternativa terapeutica.