

**Bando FIN-RER**  
**Sinossi dello Studio**

**Titolo dello studio:** INTEGRATIVE “OMICS” APPROACHES FOR LEUKEMIA TARGET IDENTIFICATION AND MATCHED THERAPEUTIC INTERVENTION

**Responsabile scientifico:** Benedetta Cambo'-Giovanni Roti

**AZIENDA/IRCCS Azienda** Ospedaliero-Universitaria di Parma

**Studio multicentrico** Si  No

**Elenco dei centri partecipanti**

Denominazione U. O	AZIENDA/IRCCS
U.O. Ematologia e CTMO	A.O.U. Parma
U.O. Ematologia	IRST-IRCCS Meldola
U.O. Ematologia-Dipartimento di Oncoematologia	Ospedale di Rimini-AUSL Romagna
U.O. Ematologia	Ospedale di Ravenna-AUSL Romagna
Dipartimento di Scienze Mediche	A.O.U. Ferrara
Dipartimento di Oncoematologia	Ospedale di Piacenza-AUSL Piacenza
Dipartimento di Oncoematologia	A.O.U. Bologna
U.O. Ematologia	A.O. Reggio Emilia
U.O. Ematologia	A.O.U. Policlinico di Modena

**Background e Razionale (massimo 3000 caratteri):** Descrivere brevemente lo stato dell'arte sull'argomento ed il razionale che giustifica l'esecuzione dello studio

Negli ultimi decenni la possibilità di utilizzare l'immunoterapia e la farmacogenomica ha modificato radicalmente l'approccio terapeutico alle malattie oncologiche. Attualmente le terapie mirate permettono di agire sul sistema immunitario oppure su specifici biomarkers molecolari, ma spesso questi approcci da soli non sono sufficienti per predire la risposta alla terapia, soprattutto in malattie complesse come le Leucemie Acute (LA).

Questo progetto propone di utilizzare multiple scienze "omiche" per indagare in maniera più approfondita le Leucemie Acute Recidivate/Refrattarie (LA R/R) dopo terapia convenzionale, al fine di individuare nuovi target e/o approcci terapeutici. Le tecniche proposte comprendono citogenetica, Next Generation Sequencing (NGS), analisi trascrizionale e profilazione della risposta farmacologica. I dati permetteranno di identificare pazienti potenzialmente responsivi a molecole altrimenti non utilizzabili sulla base del semplice assetto mutazionale ("Exceptional Responders").

Il progetto è alla base dello sviluppo di un network regionale che permetterà ai pazienti con LA avanzata e/o resistente alle terapie di accedere equamente alle tecnologie diagnostiche e alla definizione di una terapia personalizzata.

**Obiettivi dello studio (massimo 3000 caratteri):** Endpoint primario; Endpoint secondari; Obiettivi esplorativi

La maggior parte dei potenziali target terapeutici nelle LA sono fattori di trascrizione, regolatori epigenetici e effettori metabolici, per i quali non abbiamo ancora a disposizione farmaci che possono essere traslati nella pratica clinica. In più le forme di LA R/R spesso si caratterizzano per l'emergenza di cloni pre-esistenti selezionati dalla pressione della chemioterapia o per l'acquisizione di mutazioni che alterano il sito enzimatico sede di legame con le piccole molecole utilizzate come terapia target, il che inficia la possibilità di successo delle terapie a disposizione. L'obiettivo generale di questo studio è utilizzare la sistematica profilazione genetica, metabolica e funzionale, associata alla valutazione della sensibilità farmacologica *ex vivo* al momento della recidiva, per permettere l'identificazione di nuovi target funzionali.

A tale scopo lo studio verrà suddiviso in tre fasi:

- ***Caratterizzazione genomica e trascrittomica dei casi di LA R/R.*** Tutti i campioni delle U.O. partecipanti saranno centralizzati presso l'Azienda Ospedaliero Universitaria di Parma e successivamente inviati c/o l'IRCCS Meldola per l'analisi di NGS. La diagnosi, effettuata presso i centri partecipanti, sarà fornita sulla base delle linee guida WHO e comprenderà la valutazione morfologica dei campioni di midollo osseo, la valutazione citogenetica classica e molecolare, la valutazione citofluorimetrica e, qualora fosse disponibile, l'analisi NGS. Ogni caso sarà sottoposto a NGS per le mutazioni ricorrenti e per l'analisi delle alterazioni del numero di copie mediante kit commerciali comprendenti un pannello di geni conosciuti nell'ambito delle patologie acute mieloidi e linfoidi (Myeloid Solution e Lymphoma Solution by SOPHiA Genetics). Parallelamente saranno effettuate analisi trascrizionali (scRNAseq/RNAseq) delle cellule staminali leucemiche midollari. Solo in caso di sospetto di varianti germinali verrà eseguita un'analisi di Whole Exome Sequencing e Genome sequencing su campioni di saliva e/o unghie.

- ***Sviluppo di una piattaforma di profilazione della risposta ai farmaci (drug response profiling, DRP).*** Le cellule leucemiche verranno screenate con una libreria ad hoc di chemioterapici, agenti target, immunomodulanti e anticorpi monoclonali *ex vivo* attualmente utilizzati in studi di fase I, fase II e fase III per altri tumori ematologici e non ematologici e/o approvati dalle principali agenzie del farmaco come FDA, EMA e AIFA. Questa parte dello studio verrà eseguita c/o il Laboratorio di Ematologia Traslazionale e Chemogenomica (THEC) c/o l'Università di Parma.

- *Analisi del secretoma e dei profili di segnale del microambiente.* In particolare verranno isolate e analizzate le vescicole extracellulari dalle cellule stromali mesenchimali derivate dal microambiente midollare e verrà indagato il ruolo del microambiente midollare sulle alterazioni metaboliche. I dati ottenuti verranno integrati e correlati con i parametri clinici e con i dati ottenuti dalle precedenti indagini per ottenere una migliore stratificazione del rischio. Lo scopo è testare la definizione di un subset specifico di vescicole extracellulari come strumento diagnostico e di monitoraggio di risposta alla terapia. Questa parte dello studio verrà eseguita c/o Istituto "L.A. Seragnoli" c/o Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna.

**Disegno dello studio:** Indicare la tipologia di studio [Osservazionale (prospettico/retrospettivo/retroprospettico), interventistico (randomizzato/non randomizzato, in aperto/in cieco, controllato con placebo/con comparatore attivo/non controllato), studio su campioni biologici]

#### Studio prospettico su campioni biologici

A partire da campioni di sangue midollare e/o periferico, i blasti leucemici verranno raccolti, isolati e immediatamente processati per l'estrazione DNA e RNA, per gli studi in vitro e il biobanking. Verranno eseguiti inoltre single cell RNA sequencing e Next Generation Sequencing. In caso di sospetto di varianti germinali, verranno eseguite analisi di whole exome sequencing e genome sequencing a partire da campioni salivari e/o unghie per validazione della linea germinale. Le cellule leucemiche isolate saranno quindi analizzate sulla base di un pannello di 30 fosfoproteine per determinare il pattern di attivazione. Successivamente verrà effettuata la profilazione di risposta al farmaco (Drug Sensitivity Response Profiling, DRP) screenando una libreria di farmaci e dei loro derivati già approvati dalle autorità tipo FDA/EMA/AIFA o molecole in corso di sperimentazione (anticorpi monoclonali, ADC, altre molecole sperimentali) attualmente in studi di fase I, II o III. Inizialmente le cellule saranno esposte a concentrazioni di farmaco crescenti (10nM, 100 nM e 1000nM). Per le molecole più promettenti, la dose ideale sarà precisata utilizzando serie di diluizioni 2x da 1 nM a circa 10 uM. La concentrazione di farmaco che riduce la vitalità al 50% (IC50%) e al 90% (IC90) verrà quindi definita e comparata con i dati disponibili per linee cellulari note di LAM, LAL-B e LAL-T. Inoltre potranno essere utilizzati altri parametri per definire la vitalità cellulare (es: metodiche citofluorimetriche, altro). Infine saranno isolate da sangue periferico o midollare e dalle cellule stromali mesenchimali midollari le vescicole extracellulari, utilizzando un protocollo automatizzato (Automatic Fraction Collector, Izon) con un approccio cromatografico (Size Exclusion Chromatography (SEC)). Ne verranno stabiliti il numero e le caratteristiche intrinseche (contenuto di microRNA, lipidi e metaboliti) mediante tecnologie Nanostring e liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS-MS), per identificare markers predittivi e specifiche metaboliche. Inoltre verranno sviluppati saggi funzionali (co-culture con le vescicole extracellulari) per determinare se le vescicole possano modificare il profilo metabolico delle cellule leucemiche midollari.

**Popolazione dello studio:** Condizione/malattia; Numero di pazienti da arruolare; Criteri di inclusione; Criteri di esclusione; Se non applicabile riportare NA.

Criteri di inclusione:

- Pazienti con diagnosi di Leucemia Acuta Mieloide (LAM), Leucemia Linfoblastica Acuta/Linfoma Linfoblastico B (LLA-B), Leucemia Linfoblastica Acuta/Linfoma Linfoblastico T (LLA-T), Leucemia Acuta Bifenotipica/Indifferenziata come da definizione WHO 2016, recidivati o refrattari dopo almeno una linea di terapia.
- Età maggiore di 18 anni.
- Presenza di blasti midollari >5% in presenza o meno di malattia extramidollare (compreso l'interessamento del Sistema Nervoso Centrale, SNC).

- Pazienti con malattia ricorrente purchè documentata da criteri clinici o radiografici e confermata istologicamente rispetto alla diagnosi. -.
- I pazienti eleggibili possono essere arruolati indipendentemente dal tempo trascorso dalla prima linea terapeutica.
- I pazienti devono essere in grado di comprendere la natura sperimentale e gli obiettivi dello studio. Tutti i pazienti devono firmare un consenso informato.

Dimensione del campione:

Reclutando casi dall'intera regione, con un numero atteso di nuovi casi di circa 240 nuovi casi/anno (con <100 casi R/R) e stimando la perdita del 5-10% dei casi per campione cellulare insufficiente, sebbene sia possibile ottenere una DRP ottimale entro le 500.000 cellule, l'obiettivo è raggiungere 100 campioni totali in circa 3 anni.

**Se studio Interventistico specificare l'intervento;** se non applicabile riportare NA.

NA

**Tempistica dello studio:** Durata dello studio per paziente; Durata dell'arruolamento; Durata dello studio in toto; se non applicabile riportare NA.

36 mesi (arruolamento: 24 mesi; trattamento/osservazione: 12 mesi).

Per la dichiarazione dei conflitti d'interesse si rinvia al relativo documento presentato e valutato dal Comitato Etico di competenza ai sensi di legge.