Caratterizzazione Molecolare dei Tumori e Terapia Personalizzata

Convegno «Patologie Rare in Oncologia»
Camera dei Deputati
Roma, 19 Settembre 2013

Marco G. Paggi e Ruggero De Maria
Istituto Nazionale Tumori Regina Elena
Roma

Premesse

Definizione di Tumore Raro: ≤6 casi/100.000 abitanti/anno

La scarsa incidenza di ogni singola patologia tumorale «rara» provoca un relativo disinteresse nello sviluppo di specifici programmi terapeutici, vista la limitata ricaduta a fronte di consistenti impegni intellettuali ed economici.

Ovviamente, la somma dei pazienti affetti da patologie neoplastiche rare genera un numero considerevole di casi clinici. Questi pazienti, in quanto portatori di patologie, non integrate in un modello moderno di ricerca e sviluppo mirati, andranno incontro a notevoli problemi nell'approccio clinico, dalla diagnosi fino alle valutazioni prognostiche e alle scelte terapeutiche

Tale situazione crea problemi sia sul piano assistenziale che su quello della ricerca

- Assistenza: in Italia la sopravvivenza a 5 anni è del 69% per i tumori in generale e del 51% per i tumori rari (-18%)
- Ricerca: la ricerca sui tumori rari è poco finanziata (quasi solo dal Ministero della Salute); l'investimento di altre agenzie non ripaga in immagine e quello delle industrie farmaceutiche non produce ricadute economiche.

Tumori Rari e Terapia Personalizzata

I tumori rari rappresentano una categoria fortemente eterogenea di neoplasie

In effetti, tutti i tumori, presi singolarmente, sono patologie estremamente eterogenee, in particolare per ciò che concerne la risposta terapeutica. La sola classificazione morfologica non basta a indirizzare prognosi e terapia

L'obiettivo è mettere momentaneamente da parte i concetti canonici di diagnosi e terapia, per focalizzarsi su una valutazione prettamente molecolare della malattia

Con l'impiego degli strumenti oggi a disposizione potremmo raggruppare i tumori rari in famiglie che possano condividere percorsi prognostici e terapeutici sovrapponibili, in particolare per la predizione di risposta a terapie specifiche.

La classificazione della malattia non deve basarsi sui soli canoni classici, ma può e deve essere definita da determinanti molecolari

- Primo vantaggio: definizione del trattamento a prescindere da una serie di criteri canonici, quali istotipo, sede, grading etc.
- Secondo vantaggio: uso di farmaci a bersaglio specifico spesso già registrati (small molecules o anticorpi monoclonali) che possono già essere reperibili in commercio e che richiedono solo un permesso di utilizzazione «off label»

Come individuare questo percorso comune?

Strumenti Molecolari per la Terapia Personalizzata

La medicina personalizzata si basa sull'uso di marcatori molecolari che possano indirizzare una terapia quanto più mirata possibile per ogni paziente

La terapia personalizzata prende in considerazione sia le caratteristiche del tumore che quelle del paziente

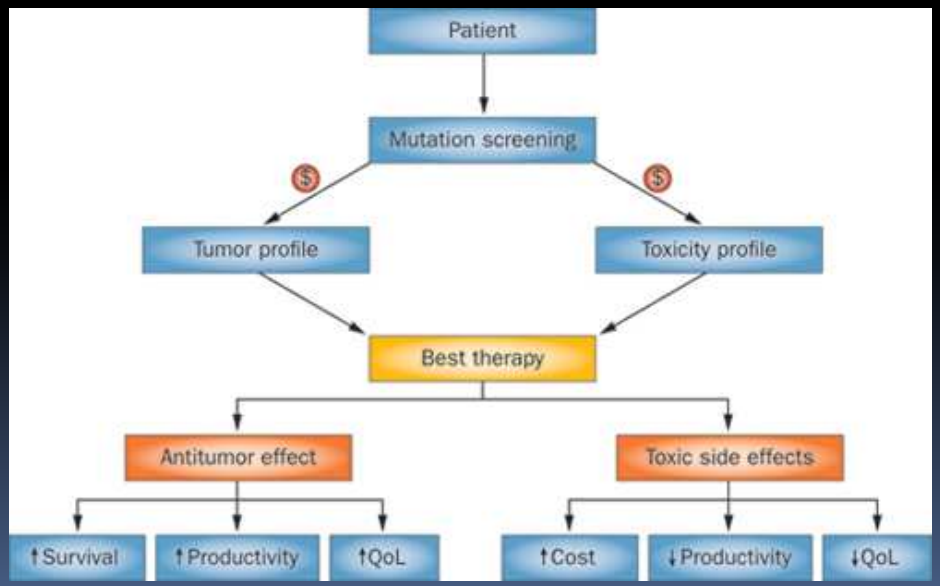
Gli strumenti a disposizione sono le tecnologie "high-throughput":

- **Genomica: lo studio simultaneo di molteplici tipi di alterazioni genetiche, quali mutazioni, delezioni o amplificazioni del DNA**
- **Epigenomica: lo studio simultaneo di molteplici tipi di modificazioni epigenetiche**
- **Trascrittomica: lo studio simultaneo di molteplici tipi di alterazioni della trascrizione (mRNA, microRNA)**
- **Proteomica : lo studio simultaneo di molteplici tipi di alterazioni delle proteine e del loro stato funzionale**

Con questi strumenti possiamo identificare le modificazioni molecolari che contribuiscono alla biologia di un tumore o che ne influenzano le caratteristiche

Genomica: studio delle alterazioni del DNA

- **Sequenziamento del DNA e confronto con un campione di riferimento per identificare le aberrazioni genomiche che possono causare quel tumore, ad es. mutazioni, delezioni o amplificazioni**
- **Individuazione di un meccanismo d'azione che possa utilizzare i dati genomici per stabilire una terapia specifica: moleculer investigation on the target**
- **Lo scopo ultimo è individuare il farmaco giusto che possa far ottenere il più elevato controllo della crescita neoplastica con la minore tossicità per il paziente**



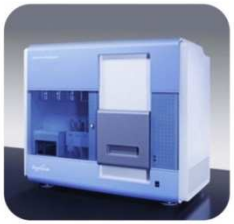
from Keefe, D. M. K. & Bateman, E. H. (2011 *Nat. Rev. Clin. Oncol*)

Questo approccio, pur se affascinante, richiede una quantità di materiale biologico relativamente elevata; inoltre, per generare una predizione è necessario molto tempo, a causa dell'enorme quantità di dati da analizzare

Cutting Edge in genomics: NGS

Cosa sono in grado di fare apparecchiature come Illumina o SOLiD?

Applications



DNA Analysis

- Whole Genome Resequencing
- Targeted Resequencing
- De Novo Sequencing
- Structural Variations / Ins / Del
- Copy Number
- ChIP
- Methylation

RNA Analysis

- Whole Transcriptome Resequencing
- micro RNA Discovery
- micro RNA Profiling
- small RNA Analysis

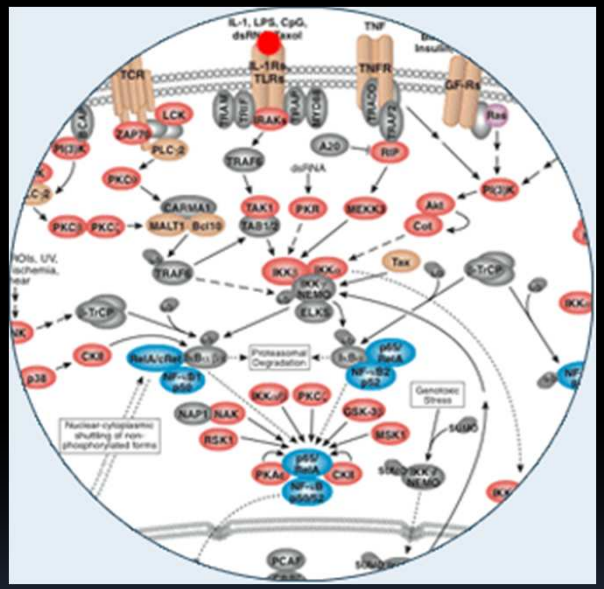




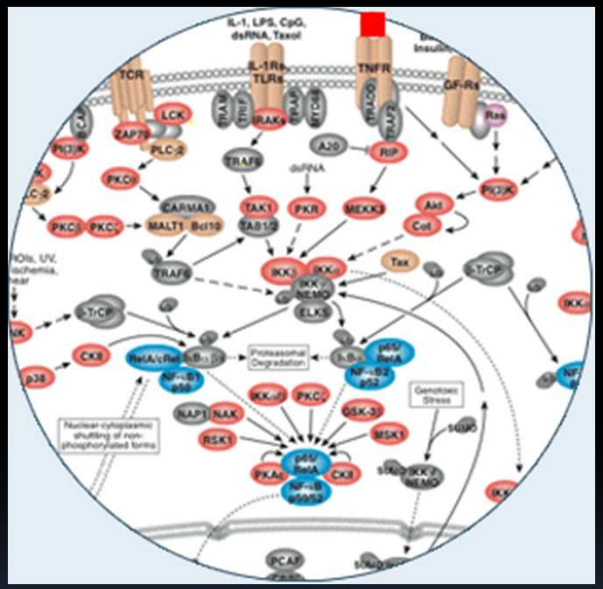
Illumina

Proteomica:
Un approccio rivolto alla funzione delle proteine

Il cancro è una malattia governata da circuiti proteici
(vie di trasduzione del segnale) iperattivi o difettosi.
Questi circuiti contengono i potenziali bersagli terapeutici



Paziente A



Paziente B

Ogni tumore di ogni paziente è un'entità unica. Nei tumori rari, inoltre, non si possono analizzare in maniera affidabile i dati epidemiologici

L'approccio Proteomico alla Terapia Personalizzata dei Tumori

Lo sviluppo delle tecnologie ha reso possibile una comprensione più approfondita dei meccanismi molecolari che sottendono alla progressione tumorale

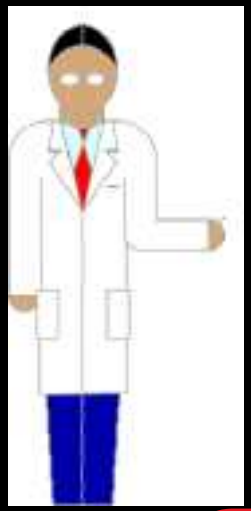
Siamo ormai in grado di capire in gran parte il funzionamento di complessi network proteici e di identificare all'interno di questi network le proteine che possono rappresentare un valido bersaglio terapeutico

L'impiego di un un nuovo gruppo di farmaci estremamente selettivi ha prodotto un notevole passo in avanti nel trattamento dei pazienti neoplastici

Marco G. Paggi

Istituto Nazionale Tumori
Regina Elena

Conventional Cancer Therapy



A group of patients all have cancer

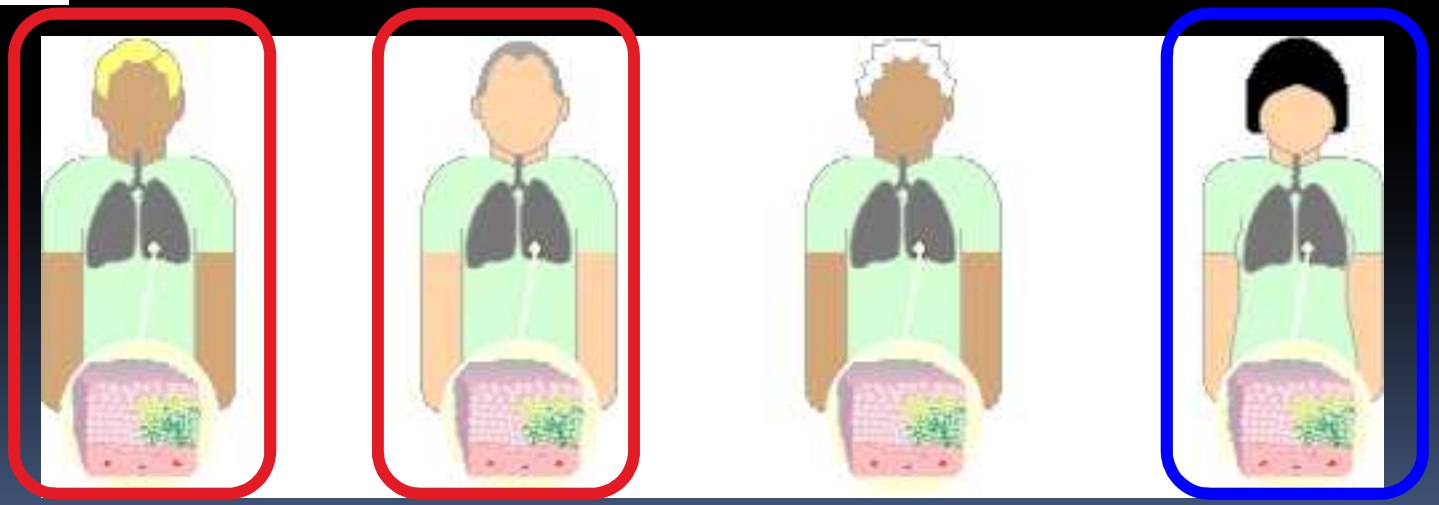
One type of therapy is given to all patients

Therapy causes toxic side effects in many patients

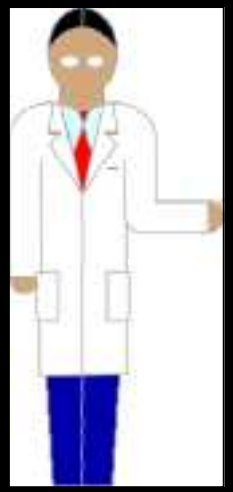
Therapy works in a few patients

Side Effects

Tumor Shrinks



Personalized Cancer Therapy



The tumor of each patient is tested using proteomics and genomics technology

Therapy is tailored to the molecular circuitry of the individual patient's tumor

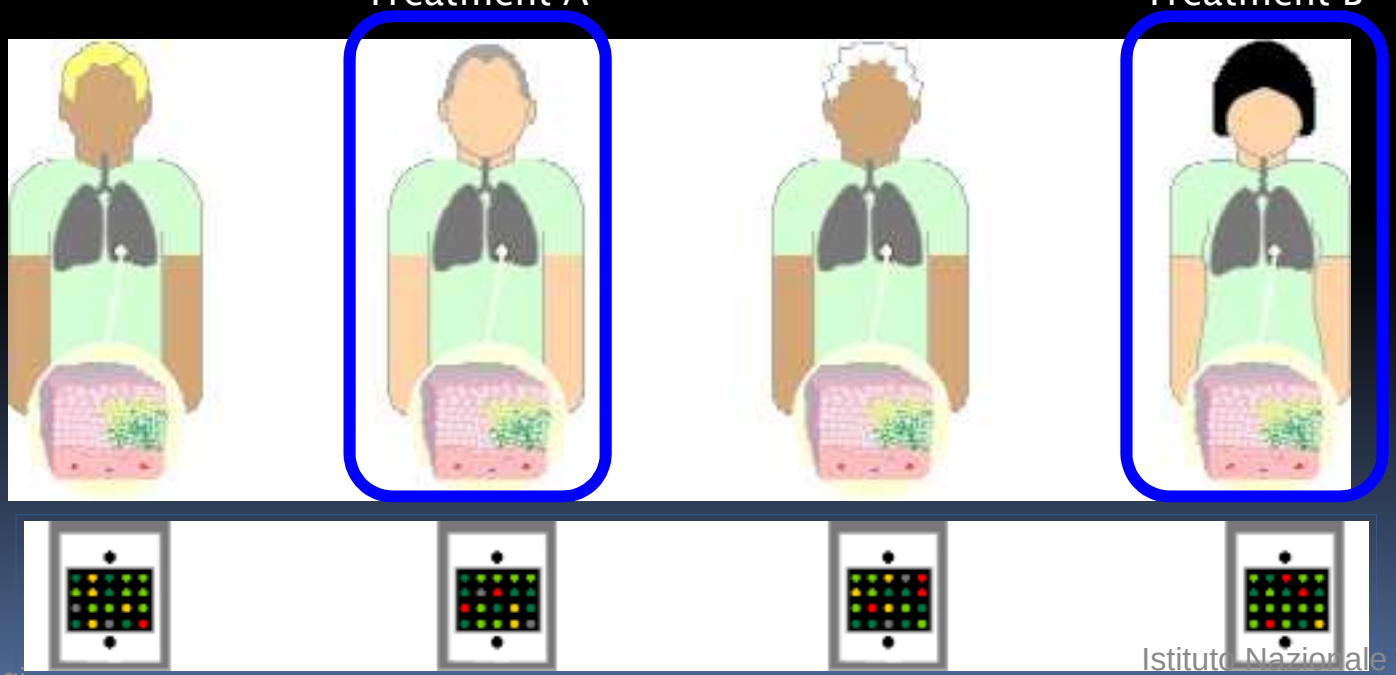
A group of patients all have cancer

The Outcome:

The correct therapy is given to the correct patient

Higher treatment success rate

Patients are spared unnecessary toxicity



Punti fondamentali

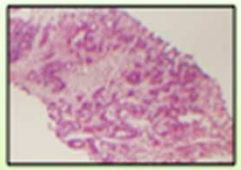
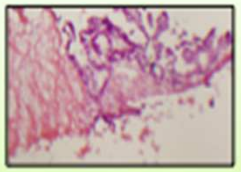
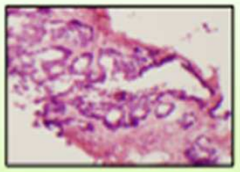
Per ogni tipo di tumore - e anche per i tumori rari – l'attuale paradigma terapeutico accetta che pazienti e tumori siano estremamente eterogenei, potremmo dire entità uniche

Inoltre, siamo finalmente in grado, attraverso le tecnologie di biologia molecolare, di pronosticare quale paziente potrà realmente trarre beneficio da uno specifico approccio terapeutico

Al giorno d'oggi possiamo trattare i pazienti con i farmaci che meglio si adattano al profilo molecolare del tumore. Con questo approccio si ottengono sia un considerevole miglioramento delle risposte terapeutiche che una riduzione degli effetti collaterali

Reverse Phase Protein Microarray (RPPM) application to clinical trials

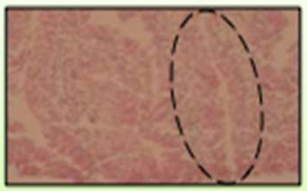
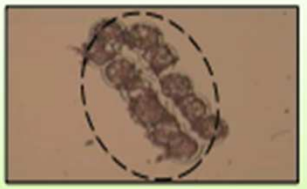
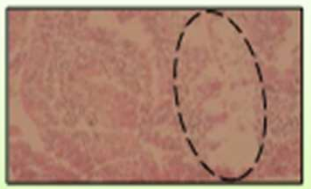
LIVER BIOPSY
Tissue is snap frozen within 30 minutes from collection time and kept at -80°C

Tissue is processed into 8 micron sections and applied to glass following standard frozen section processing.

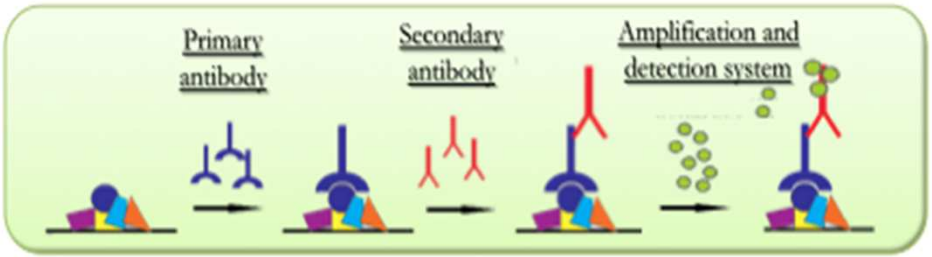
~12 hours after receiving the sample

LASER CAPTURE MICRODISSECTION
to isolate pure cancer cell population

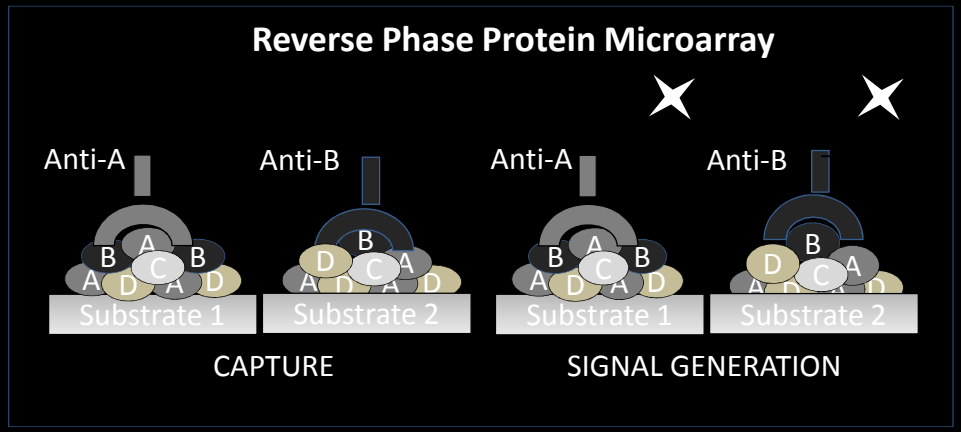
~24 hours after receiving the sample

REVERSE PHASE PROTEIN MICROARRAY
to measure phosphorylation levels of the target endpoints



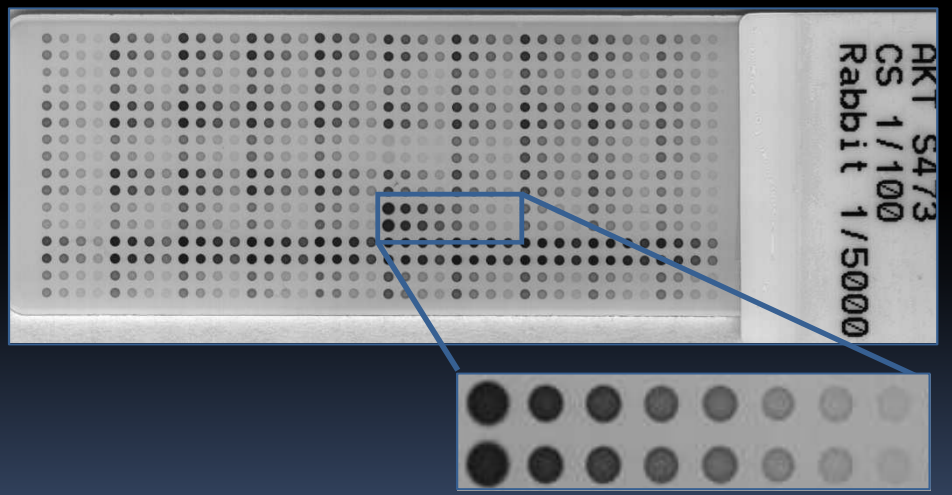
Report can be delivered to the medical committee within 10-15 working days from sample collection

Novel quantitative and multiplexed platform



- ✓ Multiple samples/array
- ✓ One antibody probe/array
- ✓ Controls, standards, samples on same array

Reverse Phase Protein Microarray (RPPM)



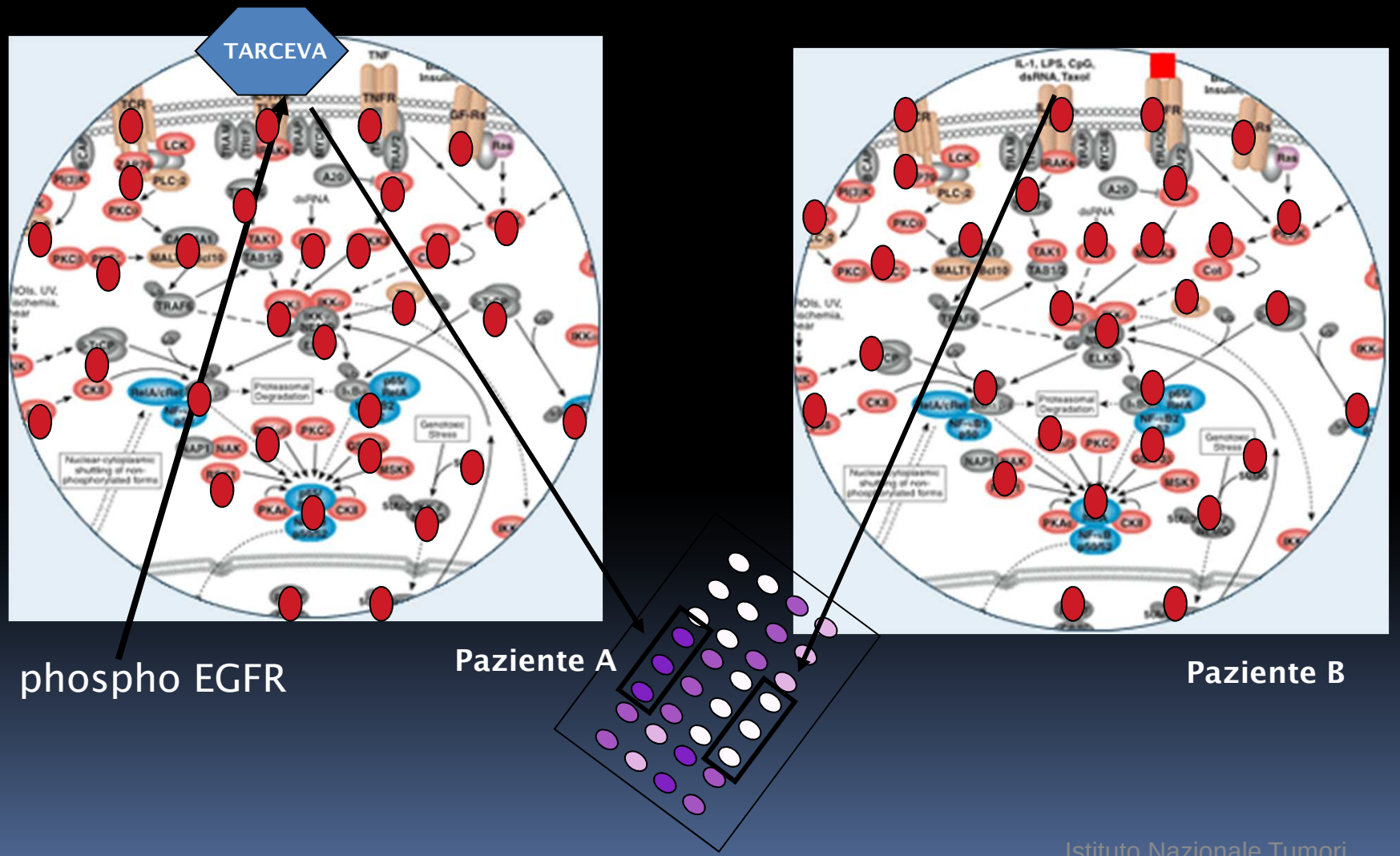
Advantages:

- **Low amount of material needed: 16-gauge needle biopsy (12 mm x 2.5 mm tissue)**
- **Short time allowed between surgery/biopsy and therapy**

Bersagli terapeutici

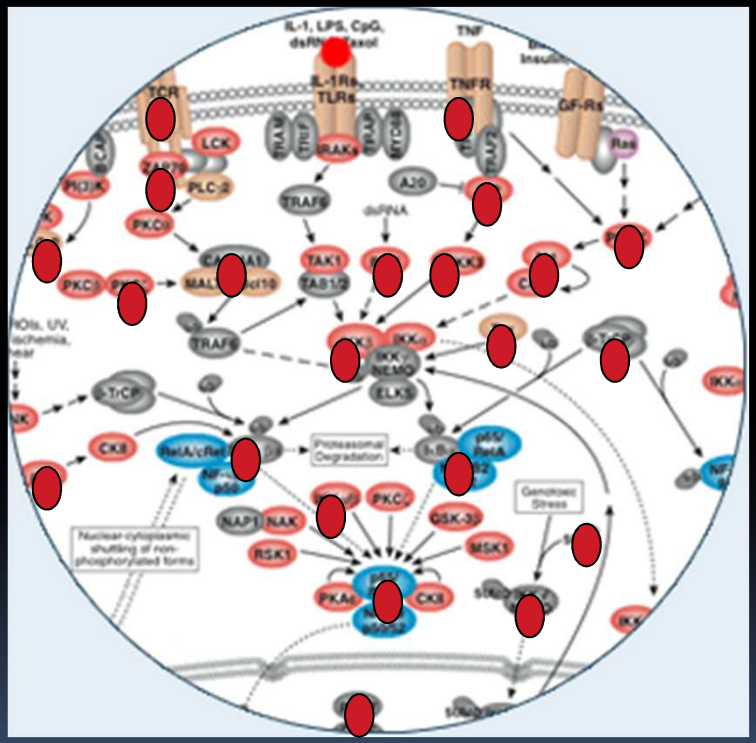
p4E-BP1 S65	pErbB2 Y1248	pp70 S6 kinase S371	pStat5 Y694
pAkt S473	pErbB3 Y1289	pp70 S6 Kinase T389	pVEGFR Y996
pAlk Y1586	pERK 1/2 (T202/Y204)	pp90 RSK S380	Cleaved NOTCH 1
pAurora A/B/C	Estrogen rec alpha	pPaxillin Y118	Cleaved PARP D214
pB-Raf S445	pFAK Y576/577	pPDK1 (S241)	Cox2
pc-Abl Y245	pGSK3 a-b S21/9	pPDGF Rec Beta Y751	EGFR
pBAD (S112)	pHistone H3 (S10)	pPLK1 T210	LC3B
c-ErbB2/HER2	pIGF-1R (Y1135/36)/IR (Y1150/51)	pPTEN S380	PTEN
pChk1 S345	pIkappa B alpha (S32/36)	pRaf S259	Survivin
pChk2 S33/35	pIRS-1 S612	pRet Y905	XIAP
pc-KIT Y719	pJak1 Y1022/1023	pRSK3 (T356/S360)	
pCrkII Y221	pJak2 Y1007/1008	pSAPK/JNK T183/Y185	
pEGFR Y1045	pMEK1/2 S217/221	pShc Y317	
pEGFR Y1173	pMet Y1234/1235	pSmad1/5/8	
pEGFR Y992	pmTOR S2448	pSmad2 S245/250/255	
peIF4G S1108	pNF-kB p65 (S536)	pSrc Y527	
pElk-1 S383	pp38 MAPK (T180/Y182)	pStat3 S727	

Princìpi Generali

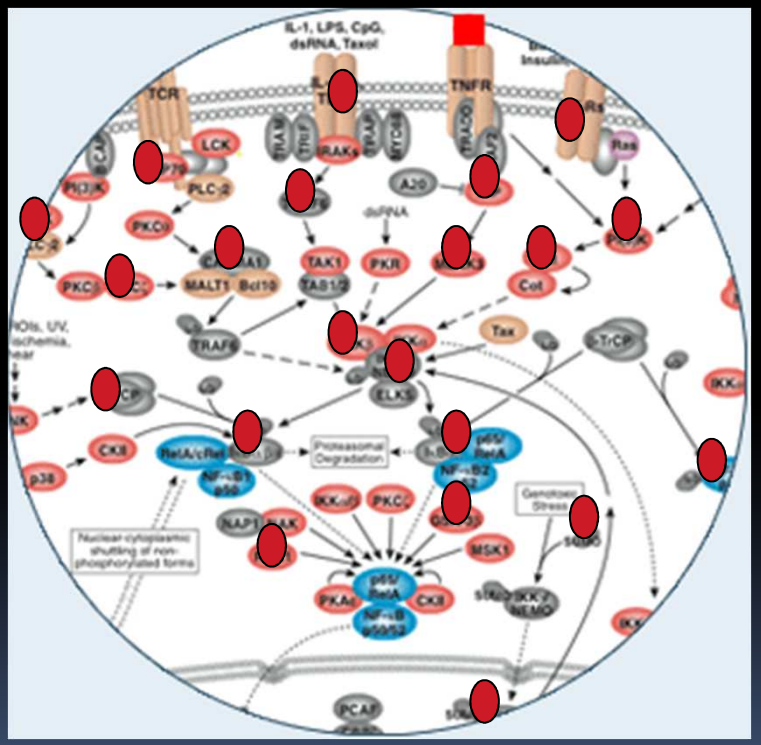


Referto del Futuro:
Mappe Individualizzate di Attivazione di Pathway Proteici

Paziente 1



Paziente 2



Conclusioni

- Negli anni precedenti la ricerca sui tumori rari è stata finanziata in maniera non ottimale ed essenzialmente da agenzie governative, in primis dal Ministero della Salute
- Se si prende in considerazione una classificazione molecolare che possa raggruppare più patologie rare, si può raggiungere la soglia dell'interesse anche per altre agenzie di finanziamento e per le industrie farmaceutiche
- Nell'attesa di progressi scientifici mirati, accurate – e non più costosissime – analisi molecolari possono ottimizzare l'utilizzo di un armamentario terapeutico - ormai abbastanza considerevole - di farmaci a bersaglio molecolare in grado di migliorare considerevolmente la prognosi dei pazienti affetti da queste patologie

Ringraziamenti



Istituto Nazionale Tumori Regina Elena
Roma



Istituto Superiore di Sanità
Roma