

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Fisiopatologia Sistemica

Ciclo XXIII

“Fattori predittivi di risposta al trattamento
con chemioterapici e/o farmaci biologici nei
tumori polmonari”

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Enrico Maria Silini

Tutor:
Chiar.mo Prof. Enrico Maria Silini

Dottorando: Dr. Marcello Tiseo

INDICE

1	Introduzione	1
2	Panel di marcatori molecolari predittivi nel trattamento con gefitinib di pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato	3
2.1	Razionale dello studio	3
2.2	Materiali e metodi	5
2.2.1	<i>Pazienti</i>	5
2.2.2	<i>Analisi delle mutazioni dei geni EGFR e K-ras</i>	5
2.2.3	<i>Numero di copie dei geni EGFR e HER2</i>	6
2.2.4	<i>Espressione immunoistochimica di EGFR</i>	6
2.2.5	<i>Caratterizzazione genotipica</i>	6
2.2.6	<i>Analisi statistica</i>	7
2.3	Risultati	8
2.3.1	<i>Caratteristiche dei pazienti</i>	8
2.3.2	<i>Mutazioni dei geni EGFR e K-ras</i>	8
2.3.3	<i>Numero di copie dei geni EGFR ed HER2</i>	10
2.3.4	<i>Espressione immunoistochimica di EGFR</i>	10
2.3.5	<i>Polimorfismi dell'introne 1 del gene EGFR</i>	10
2.3.6	<i>Analisi multivariata</i>	13
2.4	Discussione e conclusioni	14
3	Espressione immunoistochimica di ERCC1/BRCA1 e polimorfismi dei geni di riparo del DNA quali fattori predittivi nel trattamento chemioterapico a base di platino dei pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato	18
3.1	Razionale dello studio	18
3.2	Disegno dello studio	23
3.3	Materiali e metodi	23
3.3.1	<i>Pazienti</i>	23
3.3.2	<i>Determinazioni immunoistochimiche di ERCC1 e BRCA1</i>	24
3.3.3	<i>Caratterizzazione genotipica</i>	26
3.3.4	<i>Considerazioni statistiche</i>	27
3.4	Risultati	30
3.4.1	<i>Caratteristiche generali</i>	30
3.4.2	<i>Espressione immunoistochimica di ERCC1</i>	30

3.4.3	<i>Espressione immunoistochimica di BRCA1</i>	34
3.4.4	<i>Polimorfismi dei geni di riparazione del DNA</i>	34
3.5	Discussione e conclusioni	41
4	Correlazione dei polimorfismi e dell'attività della citidina deaminasi con l'outcome dei pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) avanzato trattati con platino-gemcitabina	46
4.1	Razionale dello studio	46
4.2	Materiali e metodi	48
4.2.1	<i>Criteri di selezione dei pazienti</i>	48
4.2.2	<i>Criteri di valutazione</i>	48
4.2.3	<i>Trattamento</i>	49
4.2.4	<i>Raccolta dei campioni, isolamento del DNA e genotipizzazione</i>	49
4.2.5	<i>Analisi dell'attività enzimatica della CDA</i>	49
4.2.6	<i>Analisi statistica</i>	50
4.3	Risultati	53
4.3.1	<i>Caratteristiche dei pazienti e trattamento</i>	53
4.3.2	<i>Informazioni del genotipo</i>	53
4.3.3	<i>Correlazione tra polimorfismi e outcome clinico</i>	57
4.3.4	<i>Correlazione tra genotipo e CDA attività enzimatica</i>	59
4.3.5	<i>Correlazione tra attività enzimatica e outcome clinico</i>	59
4.3.6	<i>Analisi multivariata</i>	60
4.3.7	<i>Analisi di tossicità</i>	62
4.4	Discussione e conclusioni	64
5	Fattori biologici predittivi nel trattamento chemioterapico con pemetrexed nella neoplasia polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato	67
5.1	Razionale dello studio	70
5.2	Disegno dello studio	71
5.3	Materiali e metodi	71
5.3.1	<i>Pazienti</i>	71
5.3.2	<i>Analisi molecolare dei polimorfismi dei geni per TS, MTHFR, RFC, GGH</i>	71
5.3.3	<i>Analisi statistica</i>	72
5.4	Risultati	74
5.4.1	<i>Caratteristiche dei pazienti</i>	74

5.4.2	<i>Informazioni del genotipo</i>	74
5.4.3	<i>Correlazione tra polimorfismi e outcome clinico</i>	74
5.4.4	<i>Analisi multivariata</i>	78
5.4.5	<i>Correlazione tra polimorfismi e outcome clinico per gruppo di trattamento</i>	80
5.5	Discussione e conclusioni	82
6	Conclusioni	85
7	Bibliografia	88

1. Introduzione

Le neoplasie polmonari rappresentano la prima causa di morte per cancro al mondo; la loro incidenza e mortalità sono pressoché sovrapponibili ad indicare una scarsa curabilità di questo tipo di neoplasia [1]. Nella maggior parte dei casi si presentano alla diagnosi in stadio localmente avanzato o metastatico e pertanto non passibili di chirurgia. Circa l'80-85% di queste neoplasie rientrano nella categoria istologica "non a piccole cellule (NSCLC, non-small cell lung cancer)".

Le neoplasie polmonari non a piccole cellule si presentano nel 50% dei casi in stadio avanzato alla diagnosi e, pertanto, trattabili con la sola terapia medica. Negli ultimi anni sono progressivamente aumentate le conoscenze circa la biologia del NSCLC; tutto ciò ha portato a sviluppare nuove strategie terapeutiche, sia con nuovi farmaci chemioterapici sia con farmaci a target molecolare.

Sebbene notevoli progressi siano stati fatti negli ultimi anni nel trattamento del NSCLC, questa malattia risulta ancora legata a cattiva prognosi nella maggior parte dei pazienti. In relazione al progressivo incremento delle conoscenze ed anche grazie all'introduzione delle terapie biologiche, sempre più si è andato ad affermando il concetto di personalizzazione del trattamento, secondo il quale una determinata terapia andrebbe somministrata ad un dato paziente a seconda delle caratteristiche specifiche della neoplasia di cui è affetto e delle caratteristiche proprie di quell'individuo. Nella pratica clinica, tuttavia, ancora oggi un dato schema terapeutico viene scelto tenendo conto di alcuni fattori come l'età, il performance status, la presenza di co-morbidità e valutando i profili di tossicità dei vari regimi, lontani quindi da una situazione di specifica individualizzazione.

In quest'ottica, recenti evidenze suggeriscono la possibilità di individuare sottopopolazioni di pazienti che possono beneficiare di uno specifico trattamento rispetto ad altre. Proprio in questo ambito si inserisce il progetto che ho sviluppato in questi 4 anni, volto ad identificare fattori predittivi di risposta ai

diversi tipi di trattamento (chemioterapico e biologico) impiegati nella terapia del NSCLC avanzato.

Il mio progetto si è articolato in quattro sottoprogetti relativi a quattro differenti tipi di terapie utilizzate nel trattamento del NSCLC avanzato. I quattro sottoprogetti sviluppati sono stati i seguenti:

1. Panel di marcatori molecolari predittivi nel trattamento con gefitinib di pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato;
2. Espressione immunoistochimica di ERCC1/BRCA1 e polimorfismi dei geni di riparo del DNA quali fattori predittivi nel trattamento chemioterapico a base di platino dei pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato;
3. Correlazione dei polimorfismi e dell'attività della citidina deaminasi con l'outcome dei pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule avanzato trattati con platino-gemcitabina;
4. Fattori biologici predittivi nel trattamento chemioterapico con pemetrexed nella neoplasia polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato.

2. Panel di marcatori molecolari predittivi nel trattamento con gefitinib di pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato

2.1. Razionale dello studio

Il beneficio del trattamento delle neoplasie polmonari non a piccole cellule con inibitori dell'attività tirosino-chinasica di Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR-TKIs, tyrosine kinase inhibitors), quali gefitinib ed erlotinib, sembra essere riservato ad un sottogruppo di pazienti. Un'alta probabilità di risposta appare associata ad alcune caratteristiche cliniche, quali il sesso femminile, l'essere non fumatori, l'origine etnica asiatica e l'istologia adenocarcinoma [2]. Nonostante l'utilità delle caratteristiche cliniche nell'identificare i migliori candidati al trattamento con EGFR-TKIs, la selezione del paziente ideale dovrebbe basarsi su caratteristiche biologiche del tumore [3].

A tal proposito, recenti acquisizioni sono quelle relative al riscontro di specifiche mutazioni a carico del gene codificante per EGFR, in grado di iperattivare il recettore e di renderlo maggiormente suscettibile all'inibizione da parte di gefitinib o erlotinib; pertanto, il sottogruppo di pazienti portatori di tali mutazioni (a carico degli esoni 18-21) risulterebbe quello più responsivo al trattamento [4]. Al contrario, mutazioni di K-ras, un oncogene che codifica per proteine coinvolte nella cascata di eventi dipendente da EGFR e che porta a stimolazione della proliferazione cellulare, sono risultate essere predittive di resistenza agli inibitori dell'attività tirosino-chinasica di EGFR e assenti se presenti le mutazioni di EGFR [5].

Altri possibili fattori predittivi sono rappresentati dal numero delle copie del gene di EGFR e/o di HER2, determinate mediante metodica FISH, e dall'espressione immunoistochimica di EGFR [6, 7]. Recenti studi, inoltre, hanno proposto un potenziale ruolo predittivo dei polimorfismi dell'introne 1 del gene per EGFR [8, 9].

In questo studio è stato valutato il ruolo predittivo di un gruppo di marcatori molecolari comprendente le mutazioni dei geni codificanti per EGFR e K-ras, l'amplificazione dei geni per EGFR ed HER2, l'espressione della proteina EGFR ed i polimorfismi dell'introne 1 del gene EGFR, in pazienti affetti da NSCLC in fase avanzata trattati con gefitinib.

2.2 Materiali e metodi

2.2.1 Pazienti

Nello studio sono stati arruolati pazienti trattati con gefitinib all'interno di un accesso allargato del farmaco, condotto presso l'Unità Operativa di Oncologia Medica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma e l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Modena, dopo approvazione del Comitato Etico e dopo la firma del consenso informato da parte dei pazienti.

I criteri di eleggibilità dello studio includevano diagnosi citologica od istologica di neoplasia polmonare non a piccole cellule, lesioni misurabili, stadio IIIB-IV e progressione di malattia dopo almeno una precedente linea di chemioterapia. I pazienti dovevano, inoltre, avere un performance status da 0 a 2 in accordo con l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) ed indispensabile per l'ingresso nello studio era la disponibilità di campioni di tessuto tumorale e/o sangue per le analisi molecolari.

I pazienti arruolati ricevevano gefitinib per os al dosaggio di 250 mg/die; la risposta è stata valutata con indagine TC dopo due mesi di trattamento in accordo con i criteri RECIST versione 1.0. Coloro che ottenevano una risposta (completa o parziale) oppure una stabilità di malattia continuavano il trattamento fino a progressione o fino a comparsa di una tossicità importante, con rivalutazioni ogni due mesi. La tossicità, indagata con cadenza mensile attraverso l'esame clinico e gli esami ematochimici, è stata valutata in accordo con i criteri NCIC-CTC, versione 2.0. La sopravvivenza è stata calcolata dalla data di inizio della terapia alla data del decesso o dell'ultimo controllo.

2.2.2 Analisi delle mutazioni dei geni EGFR e K-ras

Il DNA genomico è stato estratto da cellule tumorali prelevate da sezioni di tessuto archiviato in formalina. Attraverso l'impiego di specifici primers sono stati amplificati gli esoni compresi tra il 18 e il 21 del gene codificante per EGFR e l'esone 2 del gene per K-ras [10-12, 5]. I frammenti ottenuti con tecnica PCR sono stati sequenziati e analizzati in entrambi i sensi e le mutazioni sono state verificate con tre amplificazioni indipendenti. Le mutazioni sono state, inoltre,

oggetto di indagine ulteriore attraverso un surveyor assay su un Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) [13].

2.2.3 Numero di copie dei geni EGFR e HER2 con tecnica FISH (Fluorescence In situ Hybridization)

Il numero di copie dei geni EGFR ed HER2 per cellula è stato investigato su campioni tumorali usando le sonde LSI EGFR Spectrum orange/CEP7 Spectrum green e LSI HER2 Spectrum orange/CEP17 Spectrum green, rispettivamente (Vysis, Downers Grove, IL, US). Per la classificazione dei campioni sono stati utilizzati i criteri descritti dettagliatamente in due studi pubblicati da Cappuzzo et al, ossia sono stati considerati FISH positivi i campioni altamente polisomici (≥ 4 copie del gene in $\geq 40\%$ delle cellule) e quelli amplificati (rapporto gene/cromosoma ≥ 2 o ≥ 15 copie del gene in $\geq 10\%$ delle cellule) [14].

2.2.4 Espressione immunoistochimica di EGFR

Sezioni di tessuto tumorale paraffinato provenienti da campioni tumorali alla diagnosi sono state analizzate per determinare l'espressione di EGFR, mediante tecnica immunoistochimica, impiegando metodi e criteri già descritti [15]. Sono stati considerati positivi i campioni in cui più del 10% delle cellule presentava una colorazione da moderata (2+) ad intensa (3+). I preparati sono stati valutati da due osservatori in cieco. Se si verificavano discrepanze, il caso veniva discusso al fine di definire il valore più appropriato.

2.2.5 Caratterizzazione genotipica

DNA genomico è stato isolato da campioni di sangue venoso ed amplificato come da altri descritto [16]. I prodotti PCR fluorescenti sono stati fatti correre su elettroforesi capillare automatica based DNA sequencer ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ed analizzati usando Genescan per determinare le dimensioni delle ripetizioni CA dell'introne 1.

2.2.6 Analisi statistica

L'associazione fra caratteristiche cliniche e biologiche è stata testata usando il test standard χ^2 o il test esatto di Fisher. L'impatto delle caratteristiche cliniche e biologiche sul tasso di risposta è stato analizzato usando il modello di regressione logistica. La sopravvivenza complessiva è stata definita per tutti i pazienti come il tempo intercorso tra l'inizio della terapia e la morte per qualsiasi causa o l'ultima data di follow-up. Le curve di sopravvivenza sono state costruite in accordo col metodo di Kaplan Meier e i confronti tra le curve sono stati effettuati utilizzando il log-rank test. Per valutare l'effetto delle caratteristiche cliniche e biologiche sulla sopravvivenza è stato impiegato un modello di regressione di Cox.

Al fine di verificare i possibili cambiamenti nel polimorfismo dell'introne 1 di EGFR [(CA)_n ripetizioni], è stata valutata la possibile deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg fra le frequenze alleliche e genotipiche attese e quelle osservate. I genotipi sono stati divisi in due gruppi: EGFR (CA)₁₆, includente almeno un allele (CA)₁₆, ed EGFR (CA)_{non16}, mancante di allele (CA)₁₆, e confrontati usando il test del χ^2 per la bontà dell'adattamento.

2.3 Risultati

2.3.1 Caratteristiche dei pazienti

Nello studio sono stati arruolati prospetticamente 91 pazienti di etnia caucasica affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule in fase avanzata (Tabella 1).

Il 18.7% dei pazienti ha ottenuto una risposta obiettiva (2 risposte complete e 15 risposte parziali) ed il tasso di controllo della malattia (dato dalla somma delle risposte, complete e parziali, con le stabilità di malattia) è stato del 45%. La sopravvivenza mediana è stata di 10 mesi.

Il sesso femminile e lo stato di non fumatore (< 100 sigarette nell'arco della vita) sono emersi essere associati ad una maggiore probabilità di risposta al trattamento con gefitinib ($p = 0.005$ e $p = 0.010$, rispettivamente). Per quanto riguarda la tossicità, 43 pazienti (47%) hanno presentato tossicità di qualsiasi tipo e grado, di cui 30 (33%) hanno sviluppato tossicità cutanea rappresentata da rash cutaneo. E' stato osservato un ruolo predittivo di risposta della tossicità cutanea ($p = 0.020$) e si è inoltre notato che i pazienti che hanno sviluppato rash cutaneo durante il trattamento hanno avuto una tendenza verso una maggiore sopravvivenza ($p = 0.058$).

2.3.2 Mutazioni dei geni EGFR e K-ras

Le analisi delle mutazioni dei geni codificanti per EGFR e K-ras sono state eseguite su 63 pazienti dei quali erano disponibili campioni di tessuto paraffinato.

Undici pazienti sono risultati mutati a livello del gene EGFR; le mutazioni sono risultate tutte già note: 5 delezioni dell'esone 19 (tre 2235del15, una 2240del12 ed una 2240del18) e 6 mutazioni missenso dell'esone 21 (L858R). Nove (82%) dei pazienti mutati in EGFR hanno avuto una risposta obiettiva al trattamento con gefitinib, mentre 2 non hanno presentato risposta (una stabilità ed una progressione di malattia) ($p < 0.001$). Le mutazioni di EGFR sono risultate associate in maniera significativa al sesso femminile ($p = 0.001$) ed all'essere non fumatore ($p = 0.009$). La sopravvivenza mediana dei

pazienti con mutazione di EGFR è stata di 14 mesi, mentre quella dei pazienti non mutati di 8 mesi ($p = 0.147$) (Tabella 2).

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti.

	N. di pazienti (n = 91)	%
Sesso		
Maschi	56	61.5
Femmine	35	38.5
Età, anni		
Mediana (range)	67 (40-85)	
Istologia		
Adenocarcinoma	70	77
NSCLC non adenocarcinoma	21	29
Stadio		
III	10	11
IV	81	89
PS ECOG		
0	31	34
1	49	54
2	11	12
Fumo*		
Fumatori od ex fumatori	71	78
Non fumatori	20	22

*fumatori (stop al fumo nei 6 mesi precedenti l'inizio della terapia o fumatori attuali), ex fumatori (fumatori fino a 6 mesi prima dell'inizio della terapia), non fumatori (< 100 sigarette nell'arco della vita).

Sette mutazioni di tipo eterozigote sono state evidenziate nel gene K-ras, tutte mutualmente esclusive rispetto alle mutazioni di EGFR. Sei pazienti avevano la sostituzione di un singolo aminoacido nel codone 12 (quattro G12C, una G12A, una G12V) ed uno presentava mutazione sul codone 13 (G13D). Nessuno di questi pazienti ha risposto a gefitinib. Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra le mutazioni di K-ras e le caratteristiche cliniche dei pazienti portatori della mutazione. La sopravvivenza mediana nei pazienti mutati in K-ras è stata di 4 mesi, a differenza di quelli wild-type che invece hanno presentato una sopravvivenza mediana di 12 mesi ($p = 0.507$) (Tabella 2).

2.3.3 Numero di copie dei geni EGFR ed HER2

La valutazione del numero di copie del gene EGFR mediante tecnica FISH è stata effettuata su 54 campioni di tessuto tumorale ed è risultata positiva in 12 pazienti (22%). I pazienti EGFR FISH positivi hanno risposto al trattamento con gefitinib nel 50% dei casi, a differenza del 14% di risposte nei pazienti EGFR FISH negativi. La differenza in termini di risposta al trattamento tra pazienti EGFR FISH positivi e negativi si è rivelata statisticamente significativa ($p = 0.016$); non si è invece osservata una differenza statisticamente significativa in termini di sopravvivenza mediana (Tabella 2).

L'analisi del numero di copie del gene HER2 è stata eseguita su 58 campioni di tessuto tumorale, con positività in 11 pazienti (19%). Il 18% dei pazienti HER2 FISH positivi ha risposto a gefitinib, così come ha risposto il 23% dei pazienti con FISH negativa. Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative in termini di risposta e sopravvivenza (Tabella 2).

E' stata osservata una correlazione statisticamente significativa tra l'amplificazione del gene EGFR e le mutazioni di EGFR ($p = 0.005$). Non sono state rilevate differenze significative in termini di risposta tra i pazienti che presentavano contemporanea FISH positiva di EGFR ed HER2 ($n = 8$) verso gli altri ($n = 46$, EGFR FISH -/HER2 FISH -, EGFR FISH +/HER2 FISH -, EGFR FISH -/HER2 FISH +).

2.3.4 Espressione immunoistochimica di EGFR

L'espressione di EGFR è stata analizzata mediante valutazione immunoistochimica su 59 campioni di tessuto tumorale ed è risultata positiva in 45 pazienti (76%). Il grado di espressione della proteina EGFR non è risultato statisticamente correlabile alla risposta a gefitinib ed alla sopravvivenza (Tabella 2).

2.3.5 Polimorfismi dell'introne 1 del gene EGFR

I polimorfismi dell'introne 1 del gene per EGFR sono stati caratterizzati in 76 pazienti. Sono stati rilevati alleli con lunghezze fra 14 e 21 dinucleotidi. La condizione di eterozigosi è stata osservata in 54 pazienti (71%) e nel 68.5% di

questi (37 pazienti) l'allele più corto consisteva di 16 ripetizioni CA [(CA)₁₆]. I genotipi più comuni sono stati il 16-16 (25%) ed il 16-20 (21%). Venti pazienti sono risultati con un genotipo mancante dell'allele (CA)₁₆ e 19 di questi avevano almeno un allele lungo, con più di 17 dinucleotidi.

Per valutare il ruolo predittivo del polimorfismo dell'introne 1 del gene EGFR, i pazienti sono stati divisi in due sottogruppi, in base ai risultati di un nostro precedente studio [8]: 56 (74%) pazienti con almeno un allele (CA)₁₆ [genotipo (CA)₁₆] e 20 (26%) privi dell'allele (CA)₁₆ [(CA)_{non16}]. In base a questa dicotomia, le frequenze genotipiche non sono risultate significativamente differenti da quelle previste dall'Equilibrio di Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0.052$, $p = 0.974$).

Non sono state evidenziate correlazioni tra i polimorfismi e le caratteristiche cliniche/biologiche dei pazienti. Per quanto riguarda la risposta al gefitinib, non è risultata una differenza significativa in base al tipo di polimorfismo: 14 (25%) dei 56 pazienti con genotipo (CA)₁₆ hanno avuto una risposta obiettiva, a differenza dei pazienti con genotipo (CA)_{non16} in cui solo 2 (10%) su 20 hanno ottenuto risposta ($p = 0.211$). Questi due pazienti con genotipo (CA)_{non16} risultavano, tuttavia, mutati in EGFR. Sebbene la differenza in termini di risposte non ha raggiunto una significatività statistica, è da segnalare che i pazienti con genotipo (CA)₁₆ hanno mostrato un sopravvivenza significativamente più lunga rispetto ai soggetti con genotipo (CA)_{non16} (12 verso 4 mesi, rispettivamente; $p = 0.044$) (Tabella 2).

Tabella 2. Caratteristiche generali, mutazioni dei geni EGFR e K-ras, amplificazione dei geni per EGFR ed HER2, espressione di EGFR e polimorfismo dell'introne 1 di EGFR nei pazienti responsivi e non responsivi a gefitinib.

Caratteristiche (n = 91)	RC + RP n (%)	SS + PD n (%)	p	Sopravv. mediana (mesi)	95% IC	P
Totale	17 (18.7)	74 (81.3)		10	6-13	
Sesso						
Femmine	12 (34)	23 (66)	0.005	12	8-16	0.167
Maschi	5 (9)	51 (91)		7	5-9	
Fumo						
Non fumatori	8 (40)	12 (60)	0.010	12	6-18	0.031
Fumatori o ex fumatori	9 (13)	62 (87)		8	4-12	
Istologia						
Adenocarcinoma	16 (23)	54 (77)	0.107	12	8-16	0.108
Non- Adenocarcinoma	1 (5)	20 (95)		6	3-9	
Tossicità						
Sì	12 (28)	31 (72)	0.057	12	8-16	0.175
No	5 (10)	43 (90)		8	4-12	
Tossicità cutanea						
Sì	10 (33)	20 (67)	0.020	15	8-22	0.058
No	7 (11)	54 (89)		8	5-11	
Mutazioni EGFR, n = 63						
Mutati	9 (82)	2 (18)	< 0.001	14	11-17	0.147
Non mutati	5 (10)	47 (90)		8	4-12	
Mutazioni K-ras, n = 63						
Mutati	0 (0)	7 (100)	0.333	4	0-12	0.507
Non mutati	14 (25)	42 (75)		12	9-15	
EGFR FISH, n = 54						
Positiva	6 (50)	6 (50)	0.016	10	7-13	0.396
Negativa	6 (14)	36 (86)		8	5-11	
HER2 FISH, n = 58						
Positiva	2 (18)	9 (82)	1.000	10	4-15	0.773
Negativa	11 (23)	36 (77)		8	2-14	
EGFR IHC, n = 59						
Positiva	11 (24)	34 (76)	0.260	12	8-16	0.320
Negativa	1 (7)	13 (93)		4	1-7	
Polimorfismi introne 1 EGFR, n = 76						
Genotipo (CA) ₁₆	14 (25)	42 (75)	0.211	12	9-15	0.044
Genotipo (CA) _{non16}	2 (10)	18 (90)		4	1-8	

RC = Risposta Completa; RP = Risposta Parziale; SS = Stazionarietà; PD = Progressione; 95% IC = 95% Intervallo di Confidenza; FISH = fluorescence in situ hybridization; IHC = immunoistochimica.

2.3.6 Analisi multivariata

In un'analisi di regressione logistica comprendente il sesso, l'abitudine al fumo, la tossicità cutanea, EGFR FISH e le mutazioni di EGFR, solo quest'ultimo parametro ha confermato un ruolo predittivo indipendente nel trattamento con gefitinib (Odds Ratio [OR] = 40.2, intervallo di confidenza del 95% 6.14-262.5; $p < 0.001$).

In un'analisi multivariata di Cox includente il sesso, l'abitudine al fumo, la tossicità cutanea, l'istotipo ed il polimorfismo dell'introne 1 di EGFR, l'abitudine al fumo (Hazard Ratio [HR] = 2.0, intervallo di confidenza del 95% 1.1-3.7; $p = 0.027$) ed il polimorfismo (HR = 1.95, intervallo di confidenza del 95% 1.12-3.38; $p = 0.018$) sono risultati rappresentare fattori prognostici indipendenti.

2.4 Discussione e conclusioni

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare il ruolo predittivo di un panel di marcatori molecolari, comprendente le mutazioni dei geni EGFR e K-ras, il numero di copie dei geni EGFR ed HER2, l'espressione immunoistochimica di EGFR ed i polimorfismi dell'introne 1 del gene EGFR nel trattamento con gefitinib di pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule in fase avanzata. Al fine di perseguire tale scopo, tutti questi marcatori sono stati correlati alla risposta ed alla sopravvivenza globale.

Vari studi hanno, in precedenza, documentato che alcune caratteristiche generali del paziente e istologiche del tumore, quali il sesso femminile, l'essere non fumatore e l'istotipo adenocarcinoma, possono correlare in maniera significativa con una maggiore probabilità di risposta al trattamento con inibitori dell'attività tirosino-chinasica di EGFR [2,17-19]. Nello studio, è stato confermato il valore predittivo positivo del sesso femminile e dello stato di non fumatore, ma non quello dell'istologia, probabilmente in relazione alle dimensioni del campione, dato che comunque il 95% dei pazienti con un istotipo non-adenocarcinoma non ha risposto al trattamento con gefitinib.

Gefitinib è un farmaco nel complesso ben tollerato, con effetti collaterali di modesta entità e solitamente rappresentati da tossicità cutanea con rash cutaneo e diarrea. Il rash cutaneo nella maggior parte dei casi si risolve in corso di trattamento o dopo una sospensione temporanea del farmaco. Uno studio di Perez-Soler et al ha evidenziato un potenziale ruolo predittivo della tossicità cutanea nel trattamento con inibitori dell'attività tirosino-chinasica di EGFR, confermato anche dai nostri risultati [20]. È ipotizzabile che gli effetti sulla cute riflettano l'estensione del blocco su EGFR raggiunta a livello delle cellule tumorali: il rash cutaneo potrebbe essere correlato alla saturazione dei legami di EGFR ed alla concentrazione di gefitinib nel tessuto neoplastico. Tuttavia, tale associazione potrebbe sostenere anche l'ipotesi che la sensibilità ai trattamenti con molecole anti-EGFR potrebbe essere influenzata non solo da differenti livelli di espressione del target nel tumore, ma anche da alcuni fattori genetici germinali, propri del paziente, come specifici polimorfismi.

A tal proposito nello studio, in considerazione di trials eseguiti in vitro ed in vivo in cui è stata riscontrata una potenziale correlazione fra l'attività trascrizionale del gene EGFR ed il numero di ripetizioni CA nell'introne 1 [21,22], è stata analizzata la possibile relazione tra tale polimorfismo e l'outcome del trattamento con gefitinib. Per valutarne il ruolo predittivo, considerando i risultati clinici e pre-clinici recentemente ottenuti dal nostro gruppo [9], i pazienti sono stati divisi in due gruppi in base alla presenza o meno dell'allele 16 [genotipo (CA)₁₆ e (CA)_{non16}]. In tale studio le indagini su linee cellulari hanno evidenziato che, dopo esposizione a gefitinib, le linee con genotipo (CA)_{non16} presentavano un'inibizione di crescita cellulare significativamente minore rispetto alle linee cellulari con genotipo (CA)₁₆ ($p = 0.003$), giustificando così i risultati clinici ottenuti in termini di risposta e sopravvivenza. Nei risultati di questa tesi, non è stata osservata alcuna correlazione tra il numero di ripetizioni CA e le caratteristiche cliniche o biologiche dei pazienti. Si è riscontrato, tuttavia, che pazienti mancanti dell'allele (CA)₁₆, ad eccezione di due pazienti mutati in EGFR, andavano generalmente incontro, in corso di trattamento, ad una rapida progressione di malattia e ad una ridotta sopravvivenza, suggerendo un possibile ruolo predittivo negativo dell'assenza dell'allele (CA)₁₆.

Per quanto riguarda i marcatori biologici tissutali, è stato dimostrato da vari ricercatori che le mutazioni di EGFR o la polisomia/amplificazione del gene valutata tramite tecnica FISH, permettono di identificare pazienti affetti da NSCLC probabilmente responsivi al trattamento con gefitinib [2,3,6,23,24]. Nel nostro studio è stata confermata l'associazione tra la risposta a gefitinib e le caratteristiche molecolari. Infatti, l'82% dei pazienti mutati e il 50% di quelli EGFR FISH positivi hanno avuto una risposta obiettiva, a differenza dei pazienti non mutati e con EGFR FISH negativa che hanno ottenuto una risposta, rispettivamente, nel 10% e il 14% dei casi. Si è inoltre osservato, sempre nei pazienti mutati o EGFR FISH positivi un trend di migliore sopravvivenza anche se, probabilmente per l'esiguo campione, non è risultato statisticamente significativo.

L'espressione proteica di EGFR, determinata con tecniche immunoistochimiche, è stata il primo bio-marcatore valutato, quale possibile fattore predittivo di risposta ai trattamenti con inibitori dell'attività tirosino-chinasica di EGFR. Molti studi, tuttavia, non hanno ottenuto risultati positivi in tal senso [6,23,24]. Il nostro studio ha confermato questi dati, suggerendo che l'indagine immunoistochimica non è un metodo ideale per identificare i pazienti potenzialmente responsivi a terapie con EGFR-TKIs, essendo una metodica in cui è difficile la standardizzazione e facilmente suscettibile di valutazioni soggettive.

L'analisi dell'amplificazione genica di HER2 non ha, in questo studio, evidenziato nulla di rilevante, a differenza di uno studio condotto da Cappuzzo et al, in cui i pazienti HER2 FISH positivi hanno evidenziato un vantaggio in risposta [7]. Riteniamo che le esigue dimensioni del nostro campione possano avere limitato i risultati: abbiamo avuto solo 11 pazienti HER2 FISH positivi e solo 8 pazienti con contemporanea polisomia/amplificazione di EGFR ed HER2. Sebbene i dati disponibili tendano nel complesso ad identificare le popolazioni sensibili a gefitinib, la presenza della mutazione del gene K-ras sembra permettere di individuare i pazienti affetti da NSCLC resistenti a tali trattamenti [2,5]. Anche nella nostra casistica i 7 pazienti K-ras mutati non erano responsivi e non mostravano concomitanti mutazioni di EGFR.

I dati del nostro studio suggeriscono che per la valutazione di efficacia degli inibitori dell'attività tirosino-chinasica di EGFR dovrebbero essere indagate sia caratteristiche cliniche che molecolari. Lo studio ha avuto alcune limitazioni. L'acquisizione di campioni tissutali non è sempre stata agevole e in alcuni casi i campioni di tessuto tumorale conservati in paraffina non erano in quantità adeguata per determinare tutti i marcatori molecolari, difficoltà che è stata segnalata da altri ricercatori [23,24]. Oltre a questo, le dimensioni del nostro campione erano piuttosto ridotte e le correlazioni statisticamente significative che sono state riportate necessitano di essere validate in studi futuri di maggiori dimensioni. Infine, dal momento che questo è stato uno studio a singola coorte senza un gruppo di controllo, non è possibile dire se le variabili risultate

statisticamente significative siano veramente fattori predittivi o semplicemente fattori prognostici.

In conclusione, nonostante i limiti sopra menzionati, con questo studio abbiamo confermato che le mutazioni del gene EGFR rappresentano il più importante fattore predittivo di risposta al trattamento con inibitori dell'attività tirosino-chinasica di EGFR. Inoltre, le analisi molecolari effettuate, hanno mostrato che la selezione dei pazienti candidabili al trattamento con gefitinib può essere ottimizzata grazie alla valutazione dell'amplificazione genica di EGFR e del polimorfismo dell'introne 1 dello stesso gene. La mutazione di K-ras si è visto essere un fattore predittivo di resistenza al trattamento con gefitinib. Al fine di migliorare la selezione dei pazienti sono necessari ulteriori studi prospettici, su campioni tissutali adeguati, in cui questi marcatori molecolari vengano valutati insieme ad altri parametri biologici associati a meccanismi di sensibilità o resistenza a tali farmaci.

3. Espressione immunoistochimica di ERCC1/BRCA1 e polimorfismi dei geni di riparo del DNA quali fattori predittivi nel trattamento chemioterapico a base di platino dei pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato

3.1 Razionale dello studio

Nel campo del trattamento medico del NSCLC si è ormai raggiunto un consenso sia sul ruolo della chemioterapia nel trattamento della malattia avanzata sia sull'impiego di regimi di terza generazione [25,26]. Numerosi studi randomizzati hanno dimostrato che l'aggiunta dei farmaci di terza generazione al platino, quali gemcitabina, vinorelbina, docetaxel e paclitaxel, migliora i risultati ottenibili col solo platino o con schemi di seconda generazione a base di platino [26]. Pertanto, questi regimi rappresentano il trattamento standard di prima linea della maggior parte dei pazienti con NSCLC avanzato.

Negli ultimi anni si è cercato di capire quale fosse il miglior schema terapeutico in termini di attività, efficacia e tollerabilità nell'ambito dei regimi a base di platino di terza generazione. Alcuni studi randomizzati hanno quindi confrontato tra loro i regimi di terza generazione a base di platino, evidenziando una sostanziale equivalenza delle diverse combinazioni testate [27-31].

Nell'ambito del trattamento di prima linea del NSCLC avanzato due quesiti risultano ancora aperti, quali la possibilità di rinunciare al cisplatino, ossia l'effettiva superiorità di regimi contenenti cisplatino rispetto a regimi di ultima generazione senza platino, e il reale ruolo dell'aggiunta di un terzo farmaco a regimi a due farmaci. Proprio questi due quesiti sono stati oggetto dello studio FAST, studio italiano multicentrico con disegno fattoriale 2 x 2, in cui 433 pazienti affetti da NSCLC stadio IIIB-IV sono stati randomizzati a ricevere 4 differenti schemi di chemioterapia di prima linea, ossia: (Braccio A) gemcitabina 1250 mg/m² giorni 1,8 + cisplatino 80 mg/m² giorno 1 (GP); (Braccio B) gemcitabina 1250 mg/m² giorni 1,8 + vinorelbina 25 mg/m² giorni

1,8 (GN); (Braccio C) gemcitabina 1000 mg/m² giorni 1,8 + ifosfamide 2 g/m² giorno 1 + cisplatino 80 mg/m² giorno 1 (GIP); (Braccio D) gemcitabina 1000 mg/m² giorni 1,8 + vinorelbina 25 mg/m² giorni 1,8 + ifosfamide 3 g/m² giorno 1 (GIN) [32]. Tutti gli schemi venivano somministrati ogni 3 settimane per un massimo di 6 cicli. Gli obiettivi primari dello studio, secondo il disegno 2 x 2, erano: stimare, in termini di sopravvivenza complessiva, l'efficacia di un regime chemioterapico in cui il platino sia stato sostituito dalla vinorelbina in confronto ad un regime chemioterapico contenente platino considerato standard e l'efficacia di un regime chemioterapico a tre farmaci, contenente ifosfamide, in confronto ad un regime chemioterapico a due farmaci, non contenente ifosfamide, considerato standard.

Sebbene notevoli progressi siano stati fatti negli ultimi anni nel trattamento chemioterapico del NSCLC, questa malattia risulta ancora legata a cattiva prognosi nella maggior parte dei pazienti. Negli ultimi anni, in relazione al progressivo incremento delle conoscenze ed anche grazie all'introduzione delle terapie biologiche, sempre più si è andato ad affermando il concetto di personalizzazione del trattamento, secondo il quale una determinata terapia andrebbe somministrata ad un dato paziente a seconda delle caratteristiche specifiche della neoplasia di cui è affetto e delle caratteristiche proprie di quell'individuo. In particolare, sembra ragionevole ipotizzare che il beneficio del cisplatino sia limitato a tumori con specifiche caratteristiche biologiche. La casistica del protocollo FAST può essere utile, seppur in maniera retrospettiva, per una valutazione ancillare, quale quella di uno studio di fattori biologici predittivi di risposta al cisplatino. Il disegno 2 x 2 dello studio consente la valutazione di tali fattori in una popolazione che ha ricevuto chemioterapia a base di cisplatino (braccio A e C, ossia GP e GIP) e in una popolazione che ha ricevuto un trattamento senza platino (braccio B e D, GN e GIN).

I fattori, al momento, individuati come potenziali predittori di risposta (o al contrario di resistenza) al cisplatino sono essenzialmente rappresentati da *ERCC1* (Excision Repair Cross-Complementing 1), *XPD* (Xeroderma Pigmentosum group D), *XRRC1* e 3 (X-Ray Repair Cross-Complementing

group 1 e group 3) e *BRCA1* (BReast CAncer 1), che rappresentano geni codificanti proteine coinvolte nel meccanismo di riparo del DNA.

Il cisplatino contiene il metallo centrale allo stato di ossidazione 2+, due molecole di ammoniaca (leganti inerti) e due ioni cloruro (leganti labili). Il suo sito preferito, se non esclusivo di attacco, è l'N (7) di Guanina (G) ed Adenina (A). Il suo effetto citotossico è del tutto assimilabile a quello degli agenti alchilanti, attribuibile principalmente alla formazione di addotti al DNA intra- e inter-filamento, in grado di bloccare la replicazione (ostacolando la DNA polimerasi) e la trascrizione (ostacolando la RNA polimerasi) del materiale genetico. E' stato dimostrato che i sistemi di riparo giocano un ruolo importante nel meccanismo d'azione del cisplatino. Infatti, se la cellula è in grado di riparare il danno al DNA causato dal cisplatino, le sue probabilità di sopravvivenza aumentano notevolmente. Analogamente, mutanti di cellule batteriche privi di alcuni sistemi di riparo (riparo per escissione o per ricombinazione) risultano essere molto più sensibili al trattamento con il cisplatino [33].

L'over-espressione, valutata principalmente come mRNA, della proteina ERCC1 ha evidenziato un significato prognostico positivo in pazienti radicalmente operati per una neoplasia polmonare non a piccole cellule [34] e si è visto essere associata alla resistenza alla terapia contenente platino oltre che nel NSCLC [35-37], anche in tumori gastro-enterici [38-40] ed ovarici [41]. Recentemente è stato pubblicato, nel contesto del trattamento adiuvante del NSCLC, un importante studio relativo alla valutazione immuno-istochimica dell'espressione di ERCC1 su 761 campioni tumorali come fattore predittivo del beneficio della chemioterapia adiuvante a base di cisplatino, nei pazienti arruolati nel trial IALT. Nel caso dei pazienti con assenza di espressione di ERCC1 la chemioterapia adiuvante ha confermato il suo beneficio rispetto alla sola osservazione (sopravvivenza mediana di 56 verso 42 mesi; HR: 0.65; 95% CI 0.50-0.86; $p = 0.002$), non così nei pazienti ERCC1 positivi (sopravvivenza mediana di 50 verso 55 mesi; HR: 1.14; 95% CI 0.84-1.55; $p = 0.40$) [42]. In questo trial, così come in un altro sempre condotto su pazienti operati per NSCLC [43], è stato, inoltre, confermato il ruolo prognostico dell'espressione di

ERCC1; infatti, i pazienti ERCC1 positivi o con elevata espressione della proteina presentano una sopravvivenza più lunga rispetto ai pazienti ERCC1 negativi o con bassa espressione. Quindi, come ha commentato Gazdar in un editoriale su NEJM [44], “two faces of Janus” or “a double-edged sword”, dato che l’over-espressione di una proteina del riparo del DNA rappresenta un fattore prognostico positivo in pazienti con NSCLC resecato ed allo stesso tempo un marker di chemio-resistenza e di cattiva prognosi nella malattia avanzata.

Analogamente a ERCC1, anche un’elevata espressione di BRCA1, proteina anch’essa coinvolta nei meccanismi di riparo del DNA, sembra rappresentare un fattore di resistenza al cisplatino, come dimostrato in varie linee cellulari [45,46]. Taron et al hanno dimostrato che il livello di mRNA di BRCA1 è correlato con quello di ERCC1 e che rappresenta un fattore in grado di predire l’outcome di pazienti affetti da NSCLC localmente avanzato, trattati in neoadiuvante con cisplatino e gemcitabina (i pazienti con più alti livelli di BRCA1 hanno dimostrato una sopravvivenza più breve rispetto a quelli con bassi livelli di mRNA) [47]. L’espressione di BRCA1 è stata valutata anche in immuno-istochimica in un piccolo studio, insieme con ERCC1 e Rad51, dove tuttavia non ha dimostrato correlazione né con la risposta né con la sopravvivenza di 33 pazienti con NSCLC avanzato trattati con chemioterapia [48].

L’espressione di ERCC1, così come quella di altre proteine coinvolte nei meccanismi di riparo, quali XPD, XRRC1 e 3, è correlata a specifici polimorfismi (SNPs; Single Nucleotide Polymorphisms) dei loro geni. Alcuni di essi hanno evidenziato una correlazione con la sopravvivenza in pazienti affetti da NSCLC avanzato e trattati con chemioterapia a base di cisplatino. Due comuni polimorfismi di ERCC1, C8092A e 118 C/T, sono stati individuati; il primo è associato con differenti livelli di mRNA, mentre il secondo può condizionarne la stabilità. Tali polimorfismi sono risultati correlati con la sopravvivenza in pazienti affetti da NSCLC avanzato e trattati con chemioterapia a base di cisplatino (C8092 SNP: sopravvivenza maggiore per il genotipo C/C rispetto a C/A o A/A [49]; 118 C/T SNP: sopravvivenza maggiore per il genotipo C/C rispetto a C/T o

T/T [50-52]). Il polimorfismo C8092 è risultato, inoltre, correlato con la tossicità da chemioterapia (i pazienti con almeno una allele A hanno avuto maggiore tossicità gastro-intestinale da cisplatino) [53].

Oltre ai polimorfismi di ERCC1, sono stati studiati anche quelli di altre proteine coinvolte nel sistema di riparo, quali XPD, XRRC1 e 3. Per XPD i due polimorfismi Asp312Asp e Lys751Gln sono stati correlati con la sopravvivenza, con risultati contrastanti [50,51,54,55]. Analogamente, sono stati investigati i polimorfismi di XRRC1 e 3, rispettivamente XRCC1 Arg399Gln [54,55] e XRCC3 Thr241Met [55] che hanno evidenziato una correlazione con la sopravvivenza di pazienti affetti da NSCLC trattati con cisplatino (i polimorfismi GlnGln e MetMet hanno mostrato sopravvivenza maggiore, rispettivamente per XRRC1 e 3, rispetto alle altre varianti).

3.2 Disegno dello studio

Si tratta di uno studio retrospettivo (Bio-FAST) condotto su materiale istologico di archivio relativo a pazienti affetti da NSCLC in stadio IIIB-IV trattati in I linea all'interno del protocollo FAST [32]. Con tale studio si sono voluti analizzare vari fattori predittivi di risposta al cisplatino, quali l'espressione immunoistochimica di EGFR e BRCA1 e i polimorfismi di ERCC1, XPD, XRCC1 e 3. La casistica del protocollo FAST, tenuto conto del suo disegno 2 x 2, ha consentito di valutare tali fattori in gruppo di pazienti che ha ricevuto chemioterapia a base di cisplatino ed in un gruppo che è stato trattato senza platino

L'end-point primario dello studio è rappresentato dalla correlazione fra l'espressione immunoistochimica di EGFR e BRCA1, i polimorfismi di ERCC1, XPD, XRCC1 e 3 e la sopravvivenza globale (calcolata secondo quanto stabilito nel protocollo FAST). Gli end-points secondari dello studio sono rappresentati da: correlazione fra l'espressione immunoistochimica di EGFR e BRCA1, i polimorfismi di ERCC1, XPD, XRCC1 e 3 e la risposta alla chemioterapia (valutata secondo quanto stabilito nel protocollo FAST in accordo ai criteri RECIST versione 1.0); correlazione fra l'espressione immunoistochimica di EGFR e BRCA1, i polimorfismi di ERCC1, XPD, XRCC1 e 3 e la sopravvivenza libera da progressione (calcolata secondo quanto stabilito nel protocollo FAST).

3.3 Materiali e metodi

3.3.1 Pazienti

A partire da Ottobre 2001 fino a Luglio 2006, nello studio FAST sono stati arruolati 433 pazienti seguiti presso i Centri Oncologici di diverse città italiane tra cui Parma, Reggio Emilia, Pisa e Genova. I pazienti inclusi nello studio presentavano i principali seguenti criteri di inclusione:

- Diagnosi istologica o citologica di carcinoma non a piccole cellule in stadio IIIB (per versamento pleurico e/o linfonodi sovraclaveari) o IV;

- Nessuna precedente chemioterapia per la malattia avanzata (esclusa terapia adiuvante/neoadiuvante conclusa da almeno 1 anno);
- Età ≥ 18 anni; Performance Status ≤ 2 della scala ECOG;
- Adeguata riserva midollare e funzionalità epatica e renale,
- Consenso informato scritto;
- Assenza di precedenti neoplasie negli ultimi cinque anni precedenti la randomizzazione (eccezione del carcinoma in situ della cervice uterina e dei tumori cutanei non melanomi) e di comorbidità importanti.

Dei 433 pazienti arruolati nello studio FAST, sono stati inseriti in questo studio retrospettivo coloro per i quali fosse disponibile materiale istologico d'archivio al fine della determinazione dell'espressione immunoistochimica di EGFR e BRCA1 e dei polimorfismi di *ERCC1*, *XPD*, *XRCC1* e 3, attraverso estrazione del DNA. A questo studio hanno collaborato i centri di Parma (12 casi), Reggio Emilia (43 casi), Pisa (21 casi) e Genova (11 casi) per un totale di 87 casi.

3.3.2 Determinazioni immunoistochimiche di *ERCC1* e *BRCA1*

Per la valutazione immunoistochimica, sono state effettuate sezioni di 4 micron di spessore. I preparati sono stati de-paraffinati mediante passaggi in xilene, seguiti da re-idratazione con alcol etilico a concentrazioni decrescenti, acqua fontis e acqua distillata. La reazione immunoistochimica è stata effettuata impiegando le tecniche dell'immunoperossidasi. Lo smascheramento antigenico è stato eseguito mediante EDTA pH 9 in bagno termostato a 98° C per 30 minuti. L'attività delle perossidasi endogene è stata inibita mediante l'immersione dei preparati in una soluzione al 3% di perossido d'idrogeno per 10 minuti. Le sezioni sono state incubate overnight a 4 °C con i seguenti anticorpi primari monoclonali: *ERCC1* (clone 8F1, ditta Neomarkers, diluizione 1:200) e *BRCA1* (clone MS110, ditta Calbiochem, diluizione 1:300). L'immunomarcatura è stata evidenziata utilizzando un sistema polimerico (Dako, ADVANCE, HRP) e i siti di legame sono stati evidenziati con 3,3'-

diaminobenzidina (DAB) come substrato cromogeno. Infine, le sezioni sono state contro-colorate con ematossilina di Harrys. I nuclei delle cellule stromali circostanti il tumore sono stati utilizzati come controllo positivo interno per l'anticorpo ERCC1. Per l'anticorpo BRCA1 sono stati utilizzati come controllo positivo tessuti di mammella normale. Controlli negativi sono stati ottenuti incubando le sezioni con siero normale omettendo l'anticorpo primario.

Due operatori, che non erano a conoscenza dei dati clinici, hanno valutato l'immunomarcatura di ERCC1 e BRCA1, indipendentemente l'uno dall'altro. I casi discordanti sono stati rivisti e quelli privi di valido controllo interno esclusi. Per quanto riguarda ERCC1, l'intensità della marcatura è stata classificata con una scala da 0 a 3, in cui il numero più grande corrispondeva ad una intensità maggiore. Per ogni vetrino è stata calcolata la percentuale di nuclei tumorali positivi ed è stato assegnato un punteggio proporzionale (0 se 0%, 0.1 se dall'1 al 9%, 0.5 se dal 10 al 49% e 1.0 se uguale o maggiore del 50%). Questo punteggio è stato moltiplicato per l'intensità di immunomarcatura per ottenere un punteggio finale semiquantitativo H. Il valore della mediana di tutti i punteggi H, pari a 2, è stato scelto a priori come cut-off per separare i tumori ERCC1-positivi da quelli ERCC1-negativi [42] (Figura 1). Per quanto riguarda BRCA1, più semplicemente è stata valutata la percentuale di nuclei positivi ed è stata fissato al 10% il valore di cut-off al di sopra e al di sotto del quale i tumori sono stati considerati positivi e negativi, rispettivamente [48] (Figura 2).

Figura 1. Analisi immunoistochimica con anticorpo anti-ERCC1 dimostrante intensa positività dei nuclei delle cellule tumorali.

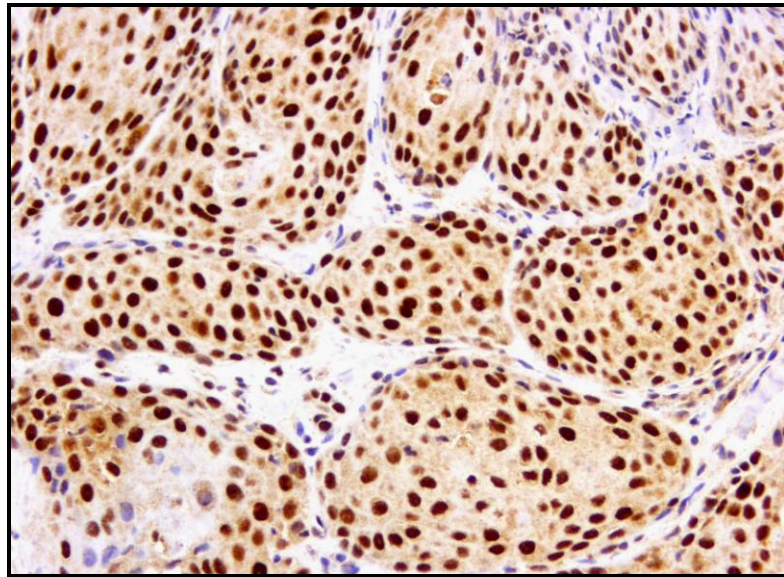
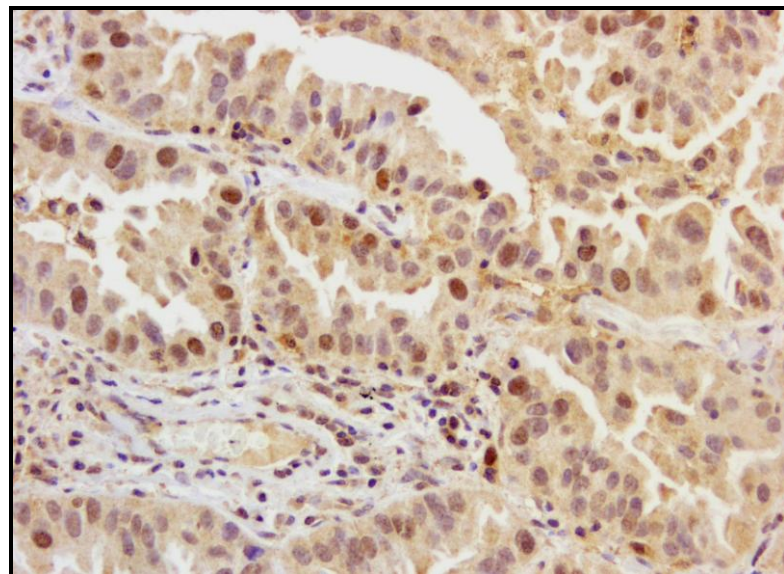


Figura 2. Analisi immunoistochimica con anticorpi anti-BRCA1 dimostrante intensa positività dei nuclei delle cellule tumorali.



3.3.3 Caratterizzazione genotipica

Sono stati esaminati sei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) quali possibili indicatori di risposta o resistenza alla terapia con cisplatino:

- ERCC1 8092C> A (rs3212986), ERCC1 C118T (rs11615)
- ERCC2/XPD Lys751Gln (rs13181)
- XRCC1 Arg399Gln (rs25487)
- XRCC3 Thr241Met (rs861539)

La valutazione dei profili genetici a ciascun locus polimorfico è stata effettuata dopo estrazione del DNA genomico da sezioni istologiche precedentemente de-paraffinate mediante l'uso di kit commerciali [DNeasy (Qiagen, Valencia, CA) secondo le istruzioni del produttore].

L'analisi SNP è stata eseguita utilizzando una tecnica TaqMan di Discriminazione Allelica in PCR Real-Time (Applied Biosystems, Foster City, CA). Tutte le reazioni PCR contenevano 10ng del DNA dei pazienti, 10 µl TaqMan genotipizzazione Master Mix (AB), 0.5 µl sonde e acqua per un volume finale di 20 µl. Le sonde corrispondenti sono stati ottenute da Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com). Appropriati controlli negativi sono stati anche eseguiti. Real-time PCR è stata eseguita su ABI Prism 7700 Sequence sistema di rilevamento (AB) con le seguenti condizioni: uno step di 10 minuti a 95° e 40 cicli di amplificazione (92° per 15 secondi e 60° per 1 min).

3.3.4 Considerazioni statistiche

Nello studio FAST, assumendo che la probabilità cumulativa di sopravvivenza dei pazienti inclusi nel braccio di controllo (con platino), a 2 anni dall'ingresso in studio, sia pari al 15.7%, il trattamento sperimentale (senza platino) viene considerato più efficace nel caso di riduzione relativa del rischio (hazard) di morte di almeno il 25% rispetto al braccio di controllo. Ciò corrisponde ad una probabilità cumulativa di sopravvivenza dei pazienti inclusi nel braccio sperimentale, a 2 anni dall'ingresso in studio, uguale o superiore al 24.8%. Fissando il tasso di errore di I tipo al 5% per un test di ipotesi a due code ed il tasso di errore di II tipo al 20% (con una potenza dell'80%), il disegno prevedeva la necessità di osservare complessivamente 385 decessi. Assumendo, infine, un tasso di perdita al follow-up pari al 5% in entrambi i gruppi e fissando a due anni la durata sia dell'arruolamento che del tempo

minimo di follow-up per tutti i pazienti, è stato fissato a 460 pazienti il numero necessario di pazienti da arruolare (115 pazienti in ciascuno dei quattro bracci di trattamento).

La distribuzione dei pazienti sulla base delle caratteristiche cliniche alla randomizzazione è stata riportata in maniera descrittiva per tutti i gruppi di trattamento utilizzati per stimare l'effetto principale di nostro interesse (terapia con platino vs terapia senza platino). Il test esatto di Fisher è stato utilizzato per confrontare la distribuzione dei pazienti nei diversi gruppi di trattamento.

La durata della sopravvivenza complessiva (calcolata per tutti i pazienti dalla data di randomizzazione in studio fino alla data del decesso per qualsiasi causa) rappresenta la variabile di efficacia principale dello studio, mentre variabili di efficacia secondarie sono: la sopravvivenza libera da progressione di malattia (calcolata per tutti i pazienti dalla data di inizio della terapia fino alla data del primo evento osservato fra progressione, recidiva o decesso per qualsiasi causa), il tasso di risposta obiettiva (stimato dalla proporzione di risposte obiettive osservate, complete + parziali) e la tossicità.

L'analisi principale e quelle secondarie di efficacia si sono basate secondo il principio dell'intention to treat (ITT). Per quanto riguarda la sopravvivenza complessiva e la sopravvivenza libera da progressione, la stima di effetto (terapia con platino vs terapia senza platino) è stata espressa in termini di stima puntuale del rapporto fra gli *hazard* e del relativo intervallo di confidenza al 95% (a due code). La stima è stata calcolata mediante il modello semi-parametrico ad *hazard* proporzionali di Cox ed il test di significatività utilizzato è stato il *likelihood ratio test*. Sono state stimate le curve di sopravvivenza complessiva e sopravvivenza libera da progressione utilizzando la tecnica di Kaplan-Meier.

Per quanto riguarda il tasso di risposta, la valutazione della risposta, per la quale sono stati applicati i criteri RECIST versione 1.0, è stata effettuata dopo 3 e dopo 6 cicli di chemioterapia mediante la ripetizione degli esami strumentali già eseguiti in corso di valutazione basale. La stima di effetto (terapia con platino vs terapia senza platino) è stata espressa in termini di stima puntuale del rapporto fra gli *odds* e del relativo intervallo di confidenza al 95%

(a due code). La stima è stata calcolata mediante il modello di regressione lineare logistica ed il test di significatività utilizzato è stato il *likelihood ratio test*. L'analisi per la tossicità è stata effettuata su tutti i pazienti randomizzati che hanno ricevuto almeno una dose di farmaco. La tossicità del trattamento e gli eventi avversi sono stati codificati secondo i Common Toxicity Criteria (CTC) del National Cancer Institute of Canada (NCIC), versione 2.0.

In merito allo studio Bio-FAST, l'associazione fra caratteristiche cliniche e biologiche è stata testata usando il test χ^2 o il test esatto di Fisher. Le risposte cliniche dei pazienti sono state confrontate usando un test esatto di Fisher a due code. L'analisi di regressione logistica è stata utilizzata per identificare le variabili prognostiche indipendenti che influenzano la risposta clinica. Sono state stimate le curve di sopravvivenza complessiva e sopravvivenza libera da progressione utilizzando la tecnica di Kaplan-Meier. Il confronto fra le curve di sopravvivenza è stato condotto mediante il log-rank test. E' stata effettuata un'analisi multivariata della sopravvivenza globale e libera da progressione usando il modello di regressione di Cox.

3.4 Risultati

3.4.1 Caratteristiche generali

Questo studio è stato condotto su 111 pazienti di cui è stato possibile ottenere tessuto sufficiente per le valutazioni biologiche. Tuttavia, 1 paziente è stato escluso dall'analisi perché non ha ricevuto alcun trattamento chemioterapico. Le caratteristiche dei pazienti sono riportati nella Tabella 3. Nel complesso, non vi sono differenze tra popolazione del Bio-FAST e la popolazione dello studio FAST non studiato per le caratteristiche biologiche.

Abbiamo osservato una risposta parziale o completa in 35 pazienti (tasso di risposta [RR] = 31.8%), 22 di questi trattati con platino e 13 trattati senza platino. Il RR è stato del 38.6% nel braccio con platino e 24.5% nel braccio non-platino ($p = 0.11$). La mediana di sopravvivenza libera da progressione (PFS) e sopravvivenza globale (OS) sono state 6.3 (95%CI 4.3-7.1) e 12.4 (95%CI 9.4-14.5) mesi, rispettivamente. Nel braccio con platino PFS mediana e OS mediana hanno raggiunto 6.6 (95%CI 4.8-7.3) e 11.2 (95%CI 7.1-15.7) mesi, rispettivamente, contro 4.4 (95%CI 3.6-7.3) e 12.5 (95%CI 9.4-15.6) mesi nel braccio senza platino ($p = 0.40$ e $p = 0.70$, per PFS e OS, rispettivamente). Circa la tossicità, nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra i bracci di trattamento (dati non riportati).

3.4.2 Espressione immunoistochimica di ERCC1

Dopo la valutazione immunoistochimica, 58 (54.7%) pazienti sono risultati ERCC1 positivi (per 4 pazienti abbiamo dati mancanti a causa della inadeguatezza del campione). Le caratteristiche dei pazienti in base all'espressione di ERCC1 sono riportati nella Tabella 4.

Nel complesso il RR è stato del 47.9% nei pazienti ERCC1 negativi vs 19% in quelli positivi (odds ratio [OR]: 0.27, 95%CI 0.11-0.66, $p = 0.004$). Nella tabella 5 sono riportati i tassi di risposta secondo l'espressione di ERCC1 nel braccio con platino vs non-platino. Un rilevante interazione è stata evidenziata tra espressione di ERCC1 e il tipo di trattamento (test di interazione, $p = 0.07$).

Tabella 3. Caratteristiche dei pazienti.

Caratteristiche		Bio-FAST		Non studiati		p	Total	
		N	%	N	%		N	%
N. di pazienti		111	25.6%	322	74.4%		433	100%
Età	mediana (range)	63 (37-79)		63 (29-79)		0.22	63 (29-79)	
	≤ 64 anni	62	56.4%	164	53.4%	0.60	226	54.2%
	> 64 anni	48	43.6%	143	46.6%		191	45.8%
Sesso	Maschile	90	81.2%	239	78.6%	0.48	329	79.5%
	Femminile	20	18.2%	65	21.4%		85	20.5%
ECOG PS	0	71	64.5%	183	59.6%	0.36	254	60.9%
	1-2	39	35.5%	124	40.4%		163	39.1%
Stadio	IIIB	28	25.5%	55	17.9%	0.09	83	19.9%
	IV	82	74.5%	252	82.1%		334	80.1%
Istotipo	Squamoso	37	33.6%	80	26.4%	0.15	117	71.7%
	Non-squamoso	73	66.4%	223	73.6%		296	28.3%
Trattamento	Platino	57	51.8%	150	48.9%	0.59	207	49.6%
	Non-Platino	53	48.2%	157	51.1%		210	50.4%

I pazienti ERCC1 negativi hanno avuto una PFS mediana di 7.3 (95%CI 6.5-9.1) mesi, mentre i positivi una PFS mediana di 4.3 mesi (95%CI 3.8-6.3; hazard ratio [HR]: 1.61, 95%CI 1.07-2.44, $p = 0.023$). Le PFS mediane secondo l'espressione di ERCC1 a seconda del trattamento con platino vs non-platino sono riportate in tabella 5 (test di interazione, $p = 0.98$).

I pazienti ERCC1 negativi hanno mostrato una OS più lunga in maniera statisticamente significativa rispetto ai pazienti positivi. I pazienti negativi hanno avuto una OS mediana di 16.4 (95%CI 12.6-23.9) vs 8.5 (95%CI 6.3-11.3) mesi raggiunta dai pazienti positivi (HR: 1.70, 95%CI 1.12-2.58, $p = 0.012$). Le sopravvivenze mediane secondo l'espressione di ERCC1 nel braccio con platino vs non-platino sono riportate in Tabella 5 (test di interazione, $p = 0.45$).

Nell'analisi relativa alla tossicità, non è emersa alcuna associazione tra stato di ERCC1 e tossicità (dati non riportati).

Tabella 4. Caratteristiche dei pazienti in base all'espressione immunoistochimica di ERCC1 e BRCA1.

		Tot		ERCC1 negativo		ERCC1 positivo		Tot		BRCA1 negativo		BRCA1 positivo			
Caratteristiche		N		N	%	N	%	p	N	N	%	N	%	p	
N. di pazienti		106		48	45.3%	58	54.7%		109	53	48.6%	56	51.4%		
Età	mediana				62.8		62.6	0.92			62.3		63	0.66	
	(range)				(37-76)		(45-79)				(37-76)		(45-79)		
	≤ 64 anni	61	26	54.2%	35	60.3%		0.52	62	29	54.7%	33	58.9%	0.66	
	> 64 anni	45	22	45.8%	23	39.7%			47	24	45.3%	23	41.1%		
Sesso	Maschile	87	37	77.1%	50	86.2%		0.22	89	40	75.5%	49	87.5%	0.10	
	Femminile	19	11	22.9%	8	13.8%			20	13	24.5%	7	12.5%		
ECOG PS 0		68	35	72.9%	33	56.9%		0.09	71	26	49.1%	45	80.4%	< 0.001	
1-2		38	13	27.1%	25	43.1%			38	27	50.9%	11	19.6%		
Stadio	IIIB	28	12	25%	16	27.6%		0.76	28	15	28.3%	13	23.2%	0.54	
	IV	78	36	75%	42	72.4%			81	38	71.7%	43	76.8%		
Istotipo	Non Squam	69	37	77.1%	32	55.2%		0.02	72	41	77.4%	31	55.4%	0.02	
	Squam	37	11	22.9%	26	44.8%			37	12	22.6%	25	44.6%		
Platino	No	50	19	39.6%	31	53.4%		0.15	53	27	50.9%	26	46.4%	0.64	
	Si	56	29	60.4%	27	46.6%			56	26	49.1%	30	53.6%		

Tabella 5. Outcome secondo l'espressione IHC di ERCC1 e BRCA1 nel braccio con platino (P) vs non-platino (NP).

		ERCC1		BRCA1	
		positivo	negativo	positivo	negativo
RR	P	14.8%	58.6%	43.3%	30.8%
	NP	22.6%	31.6%	26.9%	22.2%
OR (95%CI)		0.58 (0.15-2.27)	3.19 (0.93-10.9)	2.11 (0.68-6.56)	1.52 (0.44-5.26)
p di interazione		0.07		0.70	
PFS	P	4.4 (2.6-7.4)	7.1 (6.3-9.7)	7.2 (4.4-9.1)	6.5 (3.2-7.0)
	NP	4.1 (2.9-6.7)	7.9 (3.8-9.3)	5.0 (3.8-8.7)	4.3 (2.6-7.3)
HR (95%CI)		0.93 (0.55-1.57)	0.94 (0.52-1.70)	0.90 (0.53-1.54)	0.76 (0.44-1.31)
p di interazione		0.98		0.65	
OS	P	7.8 (3.0-9.8)	15.7 (11.2-20.4)	14.9 (7.1-19)	9.5 (5.8-15.4)
	NP	10.3 (5.1-13.8)	23.8 (11.3-2.85)	13.5 (9.4-23.3)	11.3 (6-17)
HR (95%CI)		1.39 (0.81-2.37)	1.01 (0.55-1.85)	1.11 (0.65-1.91)	1.04 (0.60-1.80)
p di interazione		0.45		0.85	

3.4.3 Espressione immunoistochimica di BRCA1

Dopo la valutazione immunoistochimica, 56 (51.4%) pazienti sono risultati BRCA1 positivi (per 1 paziente abbiamo dati mancanti a causa della inadeguatezza del campione). Le caratteristiche dei pazienti in base all'espressione di BRCA1 sono riportati nella Tabella 4.

Nel complesso il RR è stato del 26.4% nei pazienti BRCA1 negativi vs 35.7% in quelli positivi (OR: 1.69, 95%CI 0.72-3.98, $p = 0.23$). Nella tabella 5 sono riportati i tassi di risposta secondo l'espressione di BRCA1 nel braccio con platino vs non-platino. L'assenza di differenza significativa è stata confermata anche per l'analisi per tipo di trattamento (Tabella 5).

Non c'è stata differenza statisticamente significativa tra i pazienti positivi e negativi anche nella PFS mediana (HR: 0.76, 0.52-1.12, $p = 0.17$): i pazienti positivi hanno avuto una PFS mediana di 6.5 (95%CI 4.4-7.7) vs 5.8 (95%CI 3.8-7.0) mesi in quelli negativi. Considerando i bracci di trattamento, non sono state evidenziate differenze tra i pazienti BRCA1 negativi e positivi (Tabella 5).

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata trovata tra i pazienti BRCA1 positivi e negativi sia nella analisi della sopravvivenza complessiva che nell'analisi per tipo di trattamento (Tabella 5). Nel complesso, i pazienti negativi hanno mostrato una OS mediana di 11.2 (95%CI 6.9-13.9) vs 13.5 (95%CI 9.4-17.9) mesi ottenuti nei pazienti positivi (HR: 0.71, 95%CI 0.47 - 1.06, $p = 0.093$).

Nell'analisi relativa alla tossicità, non è emersa alcuna associazione tra stato di BRCA1 e tossicità (dati non riportati).

3.4.4 Polimorfismi dei geni di riparazione del DNA

La genotipizzazione è stata eseguita con successo nella maggior parte dei campioni di DNA (Tabelle 6 e 7). Discrepanze non sono state osservate nei campioni analizzati in doppio (circa 10%) e tutti i dati di genotipizzazione sono stati inclusi nell'analisi finale. Tutti i polimorfismi studiati sono risultati in equilibrio secondo il modello di Hardy-Weinberg e le frequenze confrontabili con quelle riportate nella popolazione caucasica.

ERCC1 G8092T e C118T

Per il polimorfismo G8092T, le frequenze di G/G, T/G e T/T sono state 40.8%, 46.9% e 12.3%, rispettivamente (dati mancanti da 12 pazienti a causa della inadeguatezza del DNA per la determinazione). I pazienti con genotipo G/G sono stati confrontati con pazienti con genotipo T/G o T/T (T/-).

Per il codone ERCC1 118, le frequenze di T/T, C/T e C/C sono state 31.9%, 43.9% e 24.2%, rispettivamente (dati mancanti da 19 pazienti a causa di inadeguatezza per la determinazione del DNA). I pazienti con genotipo C/C sono stati confrontati con pazienti con genotipi C/T o T/T (T/-).

Non ci sono state differenze statisticamente significative nelle frequenze genotipiche dei due polimorfismi nei diversi sottogruppi di età, sesso, stadio, istologia ed trattamento, ad eccezione del performance status (Tabella 6).

Per il polimorfismo G8092T, il RR è stato del 27.5% per i pazienti G/G e 36.2% per i pazienti T/- (OR: 0.59, 95%CI 0.24-1.46, $p = 0.25$). Per ERCC1 118 i pazienti con genotipo C/C hanno avuto un RR di 36.4% vs 33.3% raggiunto dai pazienti T/- (OR: 1.26, 95%CI 0.45-3.51, $p = 0.66$).

Nessuna differenza significativa è emersa nella sopravvivenza tra i genotipi diversi per entrambi i polimorfismi.

I pazienti con genotipo G/G hanno avuto una sopravvivenza libera da progressione di 7.7 (95%CI 4.4-9.3) vs 5.6 (95%CI 3.6-7.1) mesi raggiunto dai pazienti T/- (HR: 0.67, 95%CI 0.44-1.01, $p = 0.056$). I pazienti con genotipo G/G hanno avuto una sopravvivenza non statisticamente più lunga dei pazienti T/T o T/G: 13.9 (95%CI 9.2-19) vs 11.2 (95%CI 7.7-15.3) mesi, rispettivamente (HR: 0.90, 95%CI 0.59-1.36, $p = 0.604$).

Per ERCC1 118, i pazienti C/C e T/- hanno ottenuto una sopravvivenza libera da progressione di 7.3 (95%CI 3.8-9.7) e 6.3 (95%CI 4.0-7.2) mesi, rispettivamente (HR: 0.85, 95%CI 0.52-1.39, $p = 0.523$). Infine, i pazienti con C/C hanno raggiunto una sopravvivenza mediana di 16.3 (95%CI 10.3-32.5) vs 11.3 (95%CI 7.1-14.5) mesi riportato dai pazienti T /- (HR: 0.62, 95%CI 0.37-1.03; $p = 0.062$).

Nella Tabella 8, sono riportati RR, PFS e OS secondo i genotipi di ERCC1 in trattamento con platino vs non-platino. Circa la tossicità, nessuna differenza è stata rivelata tra i diversi genotipi di ERCC1 (dati non riportati).

XPD_ERCC2 Lys751Gln

A proposito di questo polimorfismo, 37 (38.1%) dei pazienti erano eterozigoti, 37 (38.1%) omozigoti Lys/Lys e 23 (23.8%) omozigoti Gln/Gln (dati mancanti da 13 pazienti a causa di inadeguatezza per la determinazione del DNA). I pazienti con genotipo Lys/Lys sono stati confrontati con pazienti con genotipi Lys/Gln e Gln/Gln (Gln/-). Le caratteristiche dei pazienti in base al genotipo XPD_ERCC2 sono riportate in Tabella 7.

I pazienti con genotipo Lys/Lys hanno avuto un RR di 40.5% vs 28.3% riportato dai pazienti con genotipo Gln/- (OR: 1.55, 95%CI 0.64-3.77, $p = 0.33$).

A proposito della PFS, i pazienti con genotipo Lys/Lys hanno avuto una minore sopravvivenza libera da progressione (5.1 mesi, 95%CI 3.7-9.1) rispetto ai pazienti Gln/Gln e Lys/Gln (6.5 mesi, 95%CI 3.9-7.4; HR: 0.78, 95%CI 0.51 -1.20, $p = 0.255$).

Circa la sopravvivenza globale, i pazienti con genotipo Lys/Lys hanno raggiunto una OS mediana di 13.8 (95%CI 5.6-18.2) contro 11.3 (95%CI 8-15.5) mesi ottenuta dai pazienti con genotipo Gln/- (HR: 0.99, 95%CI 0.64-1.51, $p = 0.948$).

Nella Tabella 9, sono riportati RR, PFS e OS secondo i genotipi XPD in trattamento con platino vs non-platino. Circa la tossicità, nessuna differenza è stata rivelata tra i diversi genotipi di XPD (dati non riportati).

XRCC1 Arg399Gln e XRCC3 Thr241Met

Per il polimorfismo XRCC1, le frequenze dei genotipi Arg/Arg, Gln/Arg e Gln/Gln sono state 51.6%, 36.6% e 11.8%, rispettivamente (dati mancanti da 17 pazienti a causa della inadeguatezza del DNA per la determinazione). I pazienti con genotipo Gln/Gln sono stati confrontati con pazienti con i genotipi Arg/Arg o Gln/Arg (Arg/-).

Per il polimorfismo XRCC3, le frequenze dei genotipi Met/Met, Thr/Met e Thr/Thr sono state 19.6%, 41.2% e 39.2%, rispettivamente (dati mancanti da 13 pazienti a causa di inadeguatezza per la determinazione del DNA). I pazienti con genotipo Met/Met sono stati confrontati con i pazienti con genotipi Thr/Met o Thr/Thr (Thr/-).

Non ci sono state differenze statisticamente significative nelle frequenze genotipiche dei due polimorfismi nei diversi sottogruppi di età, sesso, performance status, stadio, istologia e trattamento (Tabella 7).

Per il polimorfismo XRCC1, i pazienti Gln/Gln hanno avuto un RR di 36.4% vs 31.7% riportato dai pazienti Gln/Arg e Arg/Arg (OR: 1.22, 95%CI 0.32-4.64, $p = 0.78$). Anche per XRCC3 non è emersa alcuna differenza tra i differenti polimorfismi in RR (31.6% e 33.3% per Met/Met e Thr/-, rispettivamente; OR: 0.91, 95%CI 0.30-2.75, $p = 0.86$).

Nessuna differenza significativa è emersa nella sopravvivenza tra i diversi genotipi sia per XRCC1 che per XRCC3.

I pazienti con genotipo Gln/Gln hanno raggiunto una PFS mediana di 3.9 (95%CI 2-8.7) vs 6.3 (95%CI 4.3-7.4) mesi per i pazienti con genotipo Arg/- (HR: 0.83, 95%CI 0.41-1.70, $p = 0.61$). I pazienti con genotipo Gln/Gln hanno ottenuto una OS mediana di 20.4 (95%CI 7.8-38.7) mesi, mentre i pazienti con genotipo Arg/Arg o Arg/Gln hanno ottenuto una OS mediana di 11.3 (95%CI: 8-15.4) mesi. Questa differenza è risultata statisticamente significativa (HR: 0.47, 95%CI 0.23-0.95, $p = 0.036$).

La PFS mediana è stata di 6.2 (95%CI 3.5-8.7) e 6.5 (95%CI 3.9-7.3) mesi, in pazienti con genotipo Met/Met e Thr/-, rispettivamente (HR: 1.11, 95%CI 0.65-1.89, $p = 0.704$). La sopravvivenza globale mediana è stata di 12.5 (95%CI 4.9-23.8) e 12.4 (95%CI 9.2-15.3) mesi nei pazienti Met/Met e Thr/-, rispettivamente (HR: 1.0, 95%CI 0.59-1.71, $p = 0.996$).

Nella Tabella 9, sono riportati RR, PFS e OS secondo i genotipi di XRRC1 e 3 in trattamento con platino vs non-platino. Circa la tossicità, nessuna differenza è stata rivelata tra i diversi genotipi di XRCC1 e 3 (dati non riportati).

Tabella 6. Caratteristiche dei pazienti in base ai polimorfismi di ERCC1.

		ERCC1 8092					ERCC1 118						
		Tot	G/G		T/-		Tot	C/C		T/-			
Caratteristiche		N	N	%	N	%	p	N	N	%	N	%	p
N. di pazienti		98	40	40.8%	58	59.2%		91	22	24.2%	69	75.8%	
Età	Mediana			62.4		63.2	0.63			60.2		63.5	0.10
	(range)			(45-78)		(37-79)				(37-79)		(45-78)	
	≤ 64 anni	54	22	55%	32	55.2%	0.99	51	16	72.7%	35	50.7%	0.07
> 64 anni	44	18	45%	26	44.8%	40		6	27.3%	34	49.3%		
Sesso	Maschile	81	34	85%	47	81%	0.61	75	18	81.8%	57	82.6%	0.93
	Femminile	17	6	15%	11	19%		16	4	18.2%	12	17.4%	
PS	0	61	20	50%	41	70.7%	0.04	57	18	81.8%	39	56.5%	0.03
	1-2	37	20	50%	17	29.3%		34	4	18.2%	30	43.5%	
Stadio	IIIB	24	12	30%	12	20.7%	0.29	24	5	22.7%	19	27.5%	0.66
	IV	74	28	70%	46	79.3%		67	17	77.3%	50	72.5%	
Istotipo	Non Squam	62	27	67.5%	35	60.3%	0.47	57	13	59.1%	44	63.8%	0.69
	Squam	36	13	32.5%	23	39.7%		34	9	40.9%	25	36.2%	
Platino	No	49	19	47.5%	30	51.7%	0.68	45	12	54.5%	33	47.8%	0.58
	Si	49	21	52.5%	28	48.3%		46	10	45.5%	36	52.2%	

Tabella 7. Caratteristiche dei pazienti in base ai polimorfismi di XPD e XRCC1 e 3.

		XPD_ERCC2					XRCC1					XRCC3						
		Tot	Lys/Lys	Gln/-		p	Tot	Gln/Gln	Arg/-		p	Tot	Met/Met	Thr/-		p		
Caratteristiche		N	N	%	N	%	N	N	%	N	%	N	N	%	N	%		
N. di pazienti		97	37	38.1%	60	61.9%		93	11	11.8%	82	88.2%		97	19	19.6%	78	80.4%
Età	Mediana			61.9		63.6	0.31		61.1		63	0.46		59.9		63.7	0.07	
	(range)			(37-78)		(49-79)			(37-72)		(45-79)			(45-76)		(37-79)		
	≤ 64 anni	53	20	54.1%	33	55%	0.93	52	6	54.5%	46	56.1%	0.92	53	14	73.7%	39	50%
	> 64 anni	44	17	45.9%	27	45%		41	5	45.5%	36	43.9%		44	5	26.3%	39	50%
Sesso	M	80	30	81.1%	50	83.3%	0.78	76	8	72.7%	68	82.9%	0.41	80	16	84.2%	64	82%
	F	17	7	19.9%	10	16.7%		17	3	27.3%	14	17.1%		17	3	15.8%	14	18%
PS	0	60	22	59.5%	38	63.3%	0.70	58	7	63.6%	51	62.2%	0.93	60	13	68.4%	47	60.3%
	1-2	37	15	40.5%	22	36.7%		35	4	36.4%	31	37.8%		37	6	31.6%	31	39.7%
Stadio	IIIB	24	11	29.7%	13	21.7%	0.37	22	4	36.4%	18	22%	0.29	24	2	10.5%	22	28.2%
	IV	73	26	70.3%	47	78.3%		71	7	63.6%	64	78%		73	17	89.5%	56	71.8%
Istotipo	Non Squam	62	24	64.9%	38	63.3%	0.88	59	7	63.6%	52	63.4%	0.99	62	12	63.2%	50	64.1%
	Squam	35	13	35.1%	22	36.7%		34	4	36.4%	30	36.6%		35	7	36.8%	28	35.9%
Platino	No	48	16	43.2%	32	53.3%	0.33	46	5	45.5%	41	50%	0.78	48	11	57.9%	37	47.4%
	Si	49	21	56.8%	28	46.7%		47	6	54.5%	41	50%		49	8	42.1%	41	52.6%

Tabella 8. Outcome in base ai polimorfismi di ERCC1 nel braccio con platino (P) vs non-platino (NP).

	ERCC1 8092		ERCC1 C118T	
	G/G	T/-	C/C	T/-
RR OR (95%CI)	1.78 (0.42-7.54)	2.39 (0.79-7.26)	1.46 (0.25-8.52)	2.13 (0.75-6.04)
p di interazione	0.75		0.72	
PFS HR (95%CI)	0.90 (0.48-1.70)	0.94 (0.48-1.37)	0.61 (0.26-1.41)	1.13 (0.70-1.82)
p di interazione	0.81		0.21	
OS HR (95%CI)	1.12 (0.60-2.11)	1.12 (0.65-1.92)	0.89 (0.36-2.19)	1.50 (0.92-2.45)
p di interazione	0.99		0.32	

Tabella 9. Outcome in base ai polimorfismi di XPD e XRCC1 e 3 nel braccio con platino (P) vs non-platino (NP).

	XPD LYS751GLN		XRCC1		XRCC3	
	Lys/Lys	Gln/-	Gln/Gln	Arg/-	Met/Met	Thr/-
RR OR (95%CI)	1.75 (0.44-7.0)	2.06 (0.65-6.54)	0.89 (0.36-2.19)	1.22 (0.48-3.13)	1.76 (0.24-12.69)	2.05 (0.76-5.51)
p di interazione	0.86		0.10		0.89	
PFS HR (95%CI)	0.83 (0.42-1.62)	0.90 (0.54-1.51)	0.20 (0.05-0.76)	0.97 (0.63-1.51)	0.59 (0.22-1.53)	0.93 (0.59-1.46)
p di interazione	0.84		0.03		0.40	
OS HR (95%CI)	1.11 (0.57-2.17)	1.13 (0.67-1.91)	1.07 (0.28-4.05)	1.11 (0.71-1.73)	1.21 (0.47-3.12)	1.10 (0.70-1.75)
p di interazione	0.98		0.96		0.87	

3.5 Discussione e conclusioni

Lo studio italiano multicentrico FAST è un trial con disegno fattoriale 2x2 i cui obiettivi erano: 1) il confronto fra chemioterapia con platino e senza platino, 2) il confronto fra terapia a due e tre farmaci, quale approccio terapeutico di prima linea nei tumori polmonari non a piccole cellule in stadio avanzato [32].

Tra i due obiettivi dello studio quello preso in considerazione nella stesura di questo progetto è stato la valutazione dell'efficacia di un regime chemioterapico contenente vinorelbina in sostituzione del cisplatino rispetto ad un regime standard a base di cisplatino. I risultati hanno evidenziato una sopravvivenza globale (11.3 vs 9.7 mesi; HR = 1.23; 95%CI 1.01-1.49, $p = 0.044$) ed una sopravvivenza libera da progressione (6.4 vs 4.9 mesi; HR: 1.26, 95%CI 1.04-1.53, $p = 0.020$) in maniera statisticamente significativa a favore della terapia con platino. Dall'analisi dei dati relativi agli eventi avversi è emerso che tutti quelli di tipo ematologico si sono verificati in modo significativamente più frequente nel braccio trattato con platino. Anche le tossicità di ordine non ematologico si sono manifestate maggiormente nel braccio con platino (tuttavia solo nausea/vomito e tossicità neurologica in modo significativo), ad eccezione di quella epatica e della diarrea che, seppur non significativamente, sono state riscontrate con maggiore frequenza nel braccio senza platino. Nell'insieme emerge un profilo di tossicità a sfavore del platino, anche se complessivamente di grado accettabile.

I risultati ottenuti nello studio FAST risultano in linea con quelli disponibili in letteratura. Dati di risposta e sopravvivenza, ancora deludenti, rappresentano quanto comunemente raggiungibile con la chemioterapia standard nel NSCLC avanzato [25-31]. In merito al confronto platino vs non-platino, tema quanto mai dibattuto in ambito di oncologia polmonare, vari studi sono stati pubblicati [56-59]. Da ricordare, in particolar modo, sono i risultati di una meta-analisi, condotta da D'Addario et al [59], in cui sono stati raccolti 37 studi randomizzati di fase II e III, per un totale di 7633 pazienti, con l'obiettivo di confrontare l'efficacia e la tossicità di chemioterapie contenenti platino rispetto a

chemioterapie prive di platino nel trattamento del NSCLC in fase avanzata. Gli autori hanno riportato un tasso di risposta obiettiva significativamente maggiore per i regimi contenenti platino, come nel nostro studio anche se in maniera non statisticamente significativa, per i quali è stato dimostrato, inoltre, un vantaggio anche in termini di sopravvivenza a 1 anno (come nello studio FAST). La tossicità è risultata generalmente maggiore per i regimi a base di platino; in particolare, effetti collaterali ematologici, tossicità renale, nausea e vomito sono risultati significativamente più frequenti nei pazienti sottoposti a platino, mentre non è emersa una differenza significativa per quanto riguarda neurotossicità, neutropenia febbrile e morti tossiche. Le conclusioni di questa meta-analisi possono essere assolutamente in linea con quelle del nostro studio. Dato il miglior profilo di tossicità, regimi privi di platino possono rappresentare una valida opzione per quei pazienti in cui la risposta tumorale non rappresenta l'obiettivo principale del trattamento ed in cui la tossicità del platino può rappresentare fattore di rischio (pazienti con performance status più scadente). I regimi a base di platino, al contrario, possono essere preferiti nei pazienti con un buon performance status e con uno stadio di malattia meno avanzato. Da considerare, inoltre, relativamente alla tossicità, che la recente introduzione di agenti anti-emetici più efficaci può consentire la riduzione della percentuale di pazienti con nausea-vomito da platino.

Se da un lato la scelta del trattamento può essere fatta in base alle considerazioni cliniche sopra indicate, ci siamo posti il quesito se, in un periodo di progressivo incremento delle conoscenze della biologia della cellula tumorale, non fosse possibile pensare ad una selezione del trattamento (platino vs non-platino) in base a specifiche caratteristiche di sensibilità della malattia. La disponibilità di un considerevole numero di dati relativi a pazienti trattati con o senza platino ci ha permesso di sviluppare l'idea di un sottostudio biologico, Bio-FAST, che avesse lo scopo di valutare l'espressione tumorale di alcuni geni, quali fattori predittivi di risposta.

Questo studio ha preso in considerazione un sottogruppo di pazienti costituitosi sulla base della disponibilità di materiale istologico, idoneo per la valutazione immunoistochimica di ERCC1 e BRCA1 e per la determinazione dei

polimorfismi di ERCC1, XPD, XRCC1 e 3, scelti quali potenziali fattori predittivi di sensibilità al cisplatino.

Il sottogruppo di 111 pazienti coinvolti nello studio Bio-FAST ha mostrato caratteristiche sovrapponibili alla popolazione complessiva ed ha ottenuto risultati in linea con quelli del trial FAST.

L'analisi immunoistochimica condotta su ERCC1 e BRCA1 ha avuto in entrambi i casi una buona resa diagnostica. La percentuale di pazienti positivi per ERCC1 è risultata essere in linea con il dato di letteratura [42]. Per quanto riguarda BRCA1 il confronto con la letteratura risulta essere più limitato dal momento che quasi tutti gli studi pubblicati hanno valutato l'espressione di BRCA1 mediante mRNA [47, 60]. Un unico studio ha determinato l'espressione immunoistochimica di BRCA1 nel NSCLC ed ha riportato una percentuale di tumori positivi pari al 90% su un totale di soli 31 pazienti [48].

Nello studio Bio-FAST, è emersa una sostanziale discordanza tra l'espressione immunoistochimica di ERCC1 e BRCA1. L'unico dato disponibile in letteratura è difficilmente confrontabile, anche se apparentemente in contrasto, in quanto è relativo alla presenza di correlazione emersa tra i livelli di mRNA dei due geni [47, 60].

I risultati ottenuti per l'espressione IHC di ERCC1 ci consentono di affermarne il ruolo prognostico; infatti, indipendentemente dal trattamento a cui sono stati sottoposti, i pazienti ERCC1-negativi hanno mostrato un vantaggio significativo sia in termini di risposta che di sopravvivenza complessiva e libera da progressione di malattia. Per quanto riguarda BRCA1, al contrario, i pazienti positivi hanno mostrato un trend in sopravvivenza migliore nei confronti dei pazienti negativi. I dati ottenuti per ERCC1 confermano quelli riportati da altri studi nel NSCLC avanzato, nei quali, tuttavia, è stato valutato il ruolo di ERCC1 solo in pazienti trattati con cisplatino e gemcitabina [35, 37]. Il dato ottenuto per BRCA1 appare differente dalle aspettative, anche se è da sottolineare il fatto che BRCA1 potrebbe anche rappresentare un fattore di sensibilità alla vinorelbina [46]. Globalmente, inoltre, è da considerare il fatto che i risultati potrebbero anche essere condizionati dall'espressione di altri fattori, quale, in particolare, RRM1 (ribonucleotide reduttasi M1), noto marker predittivo della

terapia con gemcitabina, farmaco che hanno ricevuto tutti i pazienti della nostra casistica [43].

Dal confronto fra i due bracci di trattamento non possiamo concludere circa un ruolo predittivo di ERCC1 per il trattamento con platino. Solo relativamente alla risposta, infatti, l'interazione fra fattore e trattamento è risultata significativa, non per quanto riguarda la sopravvivenza. Questi dati confermano quanto ottenuto, utilizzando i livelli di ERCC1 mRNA, da Lord et al. [35] e da Ceppi et al [37], in casistiche retrospettive, e dal gruppo spagnolo in uno studio prospettico [61]. Per quanto riguarda BRCA1 non vi sono risultati confrontabili in letteratura nella malattia metastatica; va ricordato che nella malattia in stadio precoce, le evidenze per BRCA1 appaiono opposte rispetto ad ERCC1 (i pazienti BRCA1-positivi sembrano avere peggiore prognosi) [60]. Pertanto, per quanto riguarda BRCA1 sono necessari ulteriori studi.

E', quindi, possibile selezionare i pazienti da sottoporre a platino in base all'espressione di ERCC1? Ossia, sarebbe corretto somministrare il platino solo ai pazienti negativi, avviando i positivi ad una terapia meno tossica senza platino? A questo quesito, al momento, non possiamo dare una risposta certa e definitiva con il nostro studio. Infatti, i pazienti ERCC1-negativi trattati con platino nel nostro studio hanno evidenziato un maggior tasso di risposta rispetto a quelli trattati senza platino, differenza che, tuttavia, non ha raggiunto, probabilmente per la numerosità del campione, una significatività statistica, a fronte di sopravvivenze sovrapponibili. Anche il dato ottenuto per i pazienti ERCC1-positivi in termini di risposta ulteriormente sottolinea come la terapia con platino faccia la differenza nei pazienti in cui il sistema di riparo è meno efficiente (ERCC1-negativi), confermando quanto ottenuto anche in setting di terapia adiuvante [42].

Purtroppo anche le varie analisi condotte sui 5 differenti polimorfismi studiati non hanno consentito di mettere in luce un potenziale fattore predittivo di trattamento con platino. Solo il genotipo Gln/Gln di XRCC1 ha evidenziato una sopravvivenza globale maggiore rispetto al genotipo Arg/-, così come un potenziale ruolo predittivo in PFS (test di interazione, $p = 0.03$).

La scarsa numerosità del campione rappresenta il principale limite dello studio, il quale, tuttavia, ha il merito di essere il primo in cui l'analisi immunoistochimica e l'analisi per i polimorfismi dei geni di riparo stata effettuata in un braccio di trattamento senza platino.

In conclusione, la terapia a base di platino rappresenta ancora lo standard di trattamento nella neoplasia polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato, che va, tuttavia, riservata per quei pazienti con buon performance status e con miglior situazione di malattia. Accanto a criteri clinici di selezione, la determinazione immunoistochimica di ERCC1 rappresenta una metodica di facile applicazione in grado di selezionare i pazienti con miglior outcome e che potrebbero trarre maggior beneficio da una terapia più aggressiva con platino. Tale determinazione non può essere al momento considerata routinaria, ma la conferma prospettica in casistiche più ampie dei nostri risultati potrebbe consentire in futuro la personalizzazione del trattamento in base alla espressione di questa proteina.

4. Correlazione dei polimorfismi e dell'attività della citidina deaminasi con l'outcome dei pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) avanzato trattati con platino-gemcitabina

4.1 Razionale dello studio

Il tumore del polmone è la principale causa di morte per cancro nel mondo. Il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) rappresenta più dell'85% dei tumori polmonari ed circa due terzi dei pazienti affetti da NSCLC viene diagnosticato in fase avanzata [1]. Nonostante i recenti progressi nel trattamento del NSCLC, la maggior parte dei pazienti riceve in prima linea un regime chemioterapico a base di platino. Questo approccio terapeutico con platino associato ad un agente di terza generazione, come la gemcitabina, presenta una limitata efficacia e tossicità significativa.

Nel tentativo di migliorare l'attività e l'efficacia dei regimi terapeutici attuali, è stato sostenuto un approccio di farmaco-genetica; infatti, negli ultimi anni, una serie di studi biologici molecolari sono stati effettuati allo scopo di selezionare agenti chemioterapici in base al profilo di espressione genica dei pazienti. L'obiettivo principale della farmaco-genetica è l'identificazione dei genotipi coinvolti nelle variazioni clinicamente significative della risposta ai farmaci. La farmaco-genetica può ridurre la variazione nella risposta al trattamento dei singoli pazienti, personalizzando le terapie in base al profilo genetico.

La gemcitabina è un analogo della deossicitidina con provata attività nei confronti di un ampio spettro di tumori; la doppietta gemcitabina-cisplatino è uno dei regimi più ampiamente utilizzati nel trattamento del NSCLC in stadio avanzato.

La citidina deaminasi (CDA) è il principale enzima inattivante di gemcitabina e il suo ruolo fondamentale nelle attività/tossicità della gemcitabina è stata dimostrata da diversi studi pre-clinici e clinici [62-66]. La up-regulation

del CDA svolge un ruolo nella resistenza alla gemcitabina, mentre una diminuzione della sua attività recettoriale porta ad un aumento della tossicità [62-64]. Inoltre, tre polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nella regione codificante del CDA (CDA 79A>C, 208G>A, e CDA 435C>T) sono stati correlati con l'attività e la tossicità/risposta del CDA in pazienti trattati con gemcitabina [63,67]. In particolare, in uno studio precedente, è stato scoperto che il CDA A79C è un marker predittivo di risposta, tossicità, tempo di progressione e sopravvivenza in 65 pazienti con NSCLC avanzato trattati con gemcitabina e cisplatino [67].

Pertanto, l'obiettivo di questo studio è stato di valutare se questo SNP potesse influenzare la deaminazione della gemcitabina e l'esito clinico in un gruppo più ampio di pazienti con NSCLC trattati con chemioterapia a base di gemcitabina/platino, arruolando 126 pazienti da 2 diverse istituzioni italiane.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Criteri di selezione dei pazienti

Questo studio ha coinvolto due unità di oncologia medica, quella dell'Ospedale Civile di Livorno e quella dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma. Erano ammissibili pazienti mai trattati con chemioterapia con NSCLC provato citologicamente o istologicamente e stadio clinico IIIB-IV; i pazienti dovevano avere anche i seguenti criteri: età > 18 anni, aspettativa di vita di almeno 3 mesi, adeguata riserva di midollo osseo (leucociti $\geq 4.0 \times 10^9/l$, conta piastrinica $\geq 100 \times 10^9/l$), funzionalità epatica (bilirubinemia ≤ 1.5 mg/dl, alanina amino-transferasi/aspartato amino-transferasi < 3 volte il limite superiore al normale) e funzione renale (livello di creatinina $\leq 1,5$ mg/dl).

I principali criteri di esclusione erano infezioni attive, neoplasie concomitanti o un secondo tumore maligno primario, recente infarto miocardico, angina instabile, metastasi cerebrali sintomatiche o ipercalcemia. Un consenso informato scritto è stato ottenuto da ciascun paziente. Lo studio è stato condotto secondo le linee guida Good Clinical Practice e in conformità con la Dichiarazione di Helsinki del World Medical Association.

4.2.2 Criteri di valutazione

La valutazione pre-trattamento ha incluso anamnesi, esame fisico, valutazione del performance status, la conta delle cellule del sangue, esami chimici di routine, tomografia computerizzata (TC) del torace e dell'addome.

Valutazione della risposta tumorale è stata effettuata attraverso la TAC ogni tre cicli. Le risposte sono state valutate in base a criteri RECIST, versione 1.0. Le tossicità ematologiche e non ematologiche sono state registrate ai giorni 1 e 8 di ogni ciclo di trattamento. E' stato segnalato il grado di tossicità peggiore per ciascun paziente in tutti i cicli di chemioterapia. Gli effetti di tossicità sono stati valutati utilizzando i criteri del National Cancer Institute (NCI-CTC versione 3.0).

L'analisi dei campioni è stata effettuata in cieco rispetto al risultato clinico.

4.2.3 Trattamento

Il regime chemioterapico consisteva in cisplatino 80 mg/m² tramite infusione per 60 minuti il giorno 1 del ciclo e gemcitabina 1.200 mg/m² somministrata per via endovenosa in 30 minuti il giorno 1 e 8, o carboplatino AUC5 infuso per 60 minuti il giorno 1 e gemcitabina 1.000 mg/m² somministrato per via endovenosa in 30 minuti il giorno 1 e 8, entrambi i regimi ogni 3 settimane per un massimo di 6 cicli. Il trattamento è stato sospeso in caso di progressione della malattia, gravi tossicità o secondo la decisione del paziente o del medico.

4.2.4 Raccolta dei campioni, isolamento del DNA e genotipizzazione

Il DNA è stato isolato dal sangue (N=126) o dai campioni tumorali paraffinati (N=38), utilizzando il microDNA-kit (Qiagen, Hilden, Germania). Le rese e l'integrità del DNA sono stati controllati a 260-280nm con NanoDrop®-1000-Detector (NanoDrop-Technologies, Wilmington, USA).

I polimorfismi del CDA A79C (rs # 2072671) e C145T (rs # 1048977) sono stati studiati attraverso i Taqman® sonde-based assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizzando specifici primers e sonde ottenuti da Applied Biosystems (C__25472931_20, e C__7477307_30, rispettivamente). Le reazioni di PCR sono state effettuate utilizzando 20 ng di DNA diluito in acqua 5.94 µl di acqua libera da DNAsi-RNA, con 6.25 µl di TaqMan Universal PCR Master Mix e 0.31 µl della miscela, compresi i primers e le sonde, in un volume totale di 12.5 µl. Dopo il ciclo termico, lo strumento ABIPRISM-7500-HT ha determinato il contenuto allelico di ogni campione nella piastra leggendo la fluorescenza generata, utilizzando il software SDS-2.0.

4.2.5 Analisi dell'attività enzimatica della CDA

L'attività della CDA è stata misurata in campioni di sangue, come descritto in precedenza. I globuli rossi sono stati congelati e conservati a -20°C. Per la misurazione delle attività della CDA i globuli rossi sono stati lisati mescolando 10 µl di sospensione di globuli rossi scongelati con 100 microlitri di acqua bi-deionizzata, lasciati in ghiaccio per 20 minuti e centrifugati per 10

minuti a 20000 g a 4°C. Il surnatante è stato utilizzato come estratto citoplasmatico greggio contenente l'enzima CDA. Per la determinazione dell'attività dell'enzima 20 µl di questo estratto è stato mescolato con 170 µl di buffer (50 mM β-mercapto-etanolo in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0) e il substrato gemcitabina (concentrazione finale, 250 µM). La miscela di reazione è stata incubata a 37°C per 15 e 30 minuti per assicurare che l'attività enzimatica in un range lineare; dopo l'incubazione la reazione è stata bloccata con 50 µl di acido tricloroacetico al 40% (concentrazione finale, 8%), centrifugata e il surnatante è stato neutralizzato con 400 µl di triottilammina/1,1,2-tricloro-trifluoroetano (1:4) e pronti per l'analisi HPLC. Per l'identificazione del prodotto, dFdU, è stato utilizzato un metodo HPLC a fase inversa a coppia ionica leggermente modificato, impiegando una colonna Acqua C18 (Phenomenex), come fase mobile il reagente PIC B7 (Waters Chromatography, Etten-Leur, Paesi Bassi) con l'aggiunta di 3,5% di aceto-nitrile, a pH 2,8, ad un flusso di 1 ml/min. Il sistema consisteva di una pompa Gynkotek modello 480 (Dionex GmbH, Germania), un sistema automatico di iniezione Midas (Spark Holland, Paesi Bassi) e un rilevatore a lunghezza d'onda fisso Gynkotek UVD 170U (Dionex GmbH, Germania) impostato alle lunghezze d'onda di 254 e 280 nm. Le rette di calibrazione di dFdU sono state preparate in acqua e trattati analogamente ai campioni nel range di 0.5 - 200 µM. Le aree dei picchi sono state quantificate utilizzando il software di acquisizione dati Chromeleon vs 6.7 (Dionex GmbH, Germania). Il metodo HPLC è risultato lineare ($r^2 > 0,99$) nel range analitico ed il limite di quantificazione (0.5 µmol/l) era corrispondente al limite inferiore della curva di calibrazione. I tempi di ritenzione di gemcitabina e dFdU erano, rispettivamente, di 7.1 e di 13.5 minuti. La formazione di dFdU è stata normalizzata per la concentrazione di proteine, misurata con il saggio di Bradford (Sigma, St Louis, MO, USA).

4.2.6 Analisi statistica

Le informazioni demografiche e cliniche sono state confrontate con il genotipo, mediante il test χ^2 di Pearson (per variabili categoriche). Per aumentare il potere statistico di analisi e in accordo con il nostro precedente

studio, abbiamo definito i pazienti che hanno raggiunto una risposta completa (CR) o risposta parziale (PR) come "rispondenti", ed i pazienti con malattia stabile (SD) o malattia progressiva (PD) come "non-rispondenti". Ulteriori analisi sono state effettuate raggruppando i pazienti con CR, PR e SD (definiti come "pazienti con beneficio clinico") vs. pazienti con PD ("pazienti senza beneficio clinico").

TTP è stata calcolata dalla data di registrazione alla data di evidenza clinica e/o radiologica di progressione o morte, qualunque cosa sia avvenuta prima, mentre l'OS è stata calcolata a partire dal giorno di inizio del trattamento fino all'end-point (morte o censiti).

E' stato impiegato il metodo di Kaplan-Meier per tracciare TTP e OS e il log-rank test è stato utilizzato per confrontare le curve in analisi univariata. I fattori inclusi in analisi univariata sono stati il genotipo, il sesso (maschio vs femmina); performance status (PS 0 vs 1-2); età ($\leq$ mediana vs. $>$ mediana); stadio clinico (IIIB vs IV) e istologia (adenocarcinoma incluso bronchiolo-alveolare vs epidermoide).

Per quanto riguarda i polimorfismi, le analisi statistiche sono state effettuate raggruppando i pazienti secondo i tre diversi genotipi per ogni polimorfismo. Ulteriori analisi sono state effettuate 1) combinando i genotipi omozigoti ed eterozigoti quando avevano la stessa direzione di effetto (per esempio, entrambi avevano ridotto o aumentato il tempo di sopravvivenza rispetto al gruppo di riferimento) e 2) unendo le varianti alleliche associate con i risultati peggiori ("genotipi-rischio").

Le frequenze genotipiche sono state controllate per l'accordo con quelli previsti sotto l'equilibrio di Hardy-Weinberg attraverso il *SNP-analyzer-software* (<http://snp.istech21.com/snpanalyzer/2.0/>), mentre il linkage disequilibrium (LD) è stato calcolato e tracciato utilizzando il *Innate Immunity PGA, NHLBI Program LD-Plotter tool*.

Le variabili prognostiche di OS in analisi univariata sono state incluse nell'analisi multivariata, utilizzando il modello proporzionale di rischio di Cox per identificare i fattori di significato indipendente. Nell'analisi multivariata, una procedura step-down è stata utilizzata in base al test di rapporto di

verosimiglianza ed i rapporti di rischio sono stati calcolati per stimare la grandezza e la direzione dell'effetto.

I dati sono stati analizzati utilizzando il software statistico SPSS / PC+17,0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Valori di p tra 0.05 e 0.1 sono stati considerati marginalmente suggestivi di una associazione ("trend verso una significativa correlazione"), ma solo $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi. Tuttavia, nelle analisi univariata per i risultati clinici secondo i polimorfismi, una correzione di Bonferroni ha richiesto una $p < 0.05/3 = 0.017$ per la significatività statistica. Inoltre, abbiamo stimato FPRP (false positive report probability) usando il metodo di Wacholder et al.

4.3 Risultati

4.3.1 Caratteristiche dei pazienti e trattamento

Da novembre 2006 a febbraio 2009, sono stati arruolati un totale di 126 pazienti caucasici consecutivi, affetti da NSCLC in stadio avanzato. La maggioranza dei pazienti era in stadio IV (85.7%), mentre 18 (14.3%) avevano una malattia in stadio IIIB (Tabella 10).

Il follow-up mediano per i pazienti è stato di 25 mesi (range da 10 a 63 mesi). Nel complesso, OS mediana è stata di 10.0 mesi (95%CI 7.3-12.7) e TTP mediano di 6.0 mesi (95%CI 4.9-7.1).

Il sesso è risultato significativamente associato alla risposta ed alla sopravvivenza. Lo stadio clinico IIIB è risultato associato con la risposta (61.1 vs 21.9%; $p = 0.001$), ma non con la sopravvivenza. Al contrario, un PS = 0 è risultato associato con un TTP significativamente più lungo (7.0 mesi, 95%CI 5.7-8.3 vs 5.0 mesi, 95%CI 3.9-6.1; $p = 0.027$) e OS (16.0 mesi, 95%CI 10.5-21.5 vs 8.0 mesi, 95%CI 5.9-10.1; $p < 0.001$), mentre i pazienti affetti da adenocarcinoma hanno evidenziato OS e TTP significativamente più lunghi rispetto ai pazienti con carcinoma epidermoide (TTP mediano, 6.0 mesi, 95%CI 1.4-6.6 vs 4.0 mesi, 95%CI 4.6-7.4; $p = 0.025$; OS mediana, 13.0 mesi, 95%CI 8.0-18.0 vs. 8.0 mesi, 95%CI 4.8-11.2; $p = 0.003$). Nessuna differenza significativa è stata osservata per quanto riguarda l'OS nei pazienti trattati con cisplatino e carboplatino (Tabella 10).

4.3.2 Informazioni del genotipo

La genotipizzazione è stata eseguita con successo nella stragrande maggioranza dei campioni di DNA (Tabella 11). Nessuna discrepanza è stata osservata nei campioni analizzati in doppio (circa il 10%) e tutti i dati di genotipizzazione sono stati inclusi nell'analisi finale.

Il genotipo wild-type CDA-A79A ha una frequenza del 36.5%, mentre le varianti eterozigote A/C e omozigote C/C una frequenza del 49.6% e il 13.9%, rispettivamente. In termini di polimorfismo C145T-CDA, il wild-type (C/C) è stato trovato nel 52.1% dei casi, mentre le varianti eterozigote C/T e T/T sono state

osservate nel 38.5% e 9.4% dei casi, rispettivamente. La distribuzione di tutti questi polimorfismi e le frequenze alleliche sono riportati nella Tabella 11.

Precedenti studi non hanno mostrato differenze di polimorfismi analizzati nei tumori e nei tessuti normali. Tuttavia, poiché l'aberrazione cromosomica nelle cellule tumorali potrebbe portare a genotipi alterati, abbiamo effettuato studi preliminari di polimorfismi CDA in 38 campioni accoppiati di linea germinale e di DNA tumorale, mostrando genotipi interindividuali identici tra tessuti normali e maligni. Pertanto, per tutti i restanti pazienti arruolati in questo studio la genotipizzazione è stata effettuata nel DNA estratto da campioni di sangue disponibile.

Non è stato evidenziato nessun linkage disequilibrium (LD) ($r^2 = 0,056$) tra i polimorfismi CDA-A79C e CDA-C145T; i polimorfismi hanno evidenziato di seguire l'equilibrio di Hardy-Weinberg e le frequenze di genotipi sono risultate paragonabili a quelle riportate in precedenti studi in popolazioni caucasiche e nei database NCBI e NCI-SNP500.

Nessuna correlazione significativa è stata rilevata tra genotipo e l'età, PS, sesso, istologia e stadio clinico (dati non riportati).

Tabella 10. Caratteristiche dei pazienti.

Caratteristiche	Pazienti n (%)	Risposta n (%)	p	TTP mesi (95%CI)	P	OS mesi (95%CI)	p
N. di pazienti	126	34 (25.8)		6.0 (4.9-7.1)		10.0 (7.3-12.7)	
Età, mediana							
≤ 63 anni	64 (50.8)	18 (28.1)	0.926	6.0 (4.4-7.6)	0.441	12.0 (8.8-15.2)	0.896
> 63 anni	62 (49.2)	16 (25.8)		6.0 (4.3-7.7)		10.0 (7.2-12.8)	
Sesso							
Maschile	89 (70.6)	19 (21.3)	0.047	5.0 (3.8-6.2)	0.010	9.0 (6.6-11.4)	0.004
Femminile	37 (29.4)	15 (40.5)		8.0 (5.7-10.3)		17.0 (13.4-20.6)	
Stadio							
IIIB	18 (14.3)	11 (61.1)	0.001	7.0 (5.7-8.3)	0.111	21.0 (14.3-27.7)	0.098
IV	108 (85.7)	23 (21.9)		5.0 (3.9-6.1)		10.0 (7.6-12.4)	
ECOG PS							
0	51 (40.5)	18 (32.7)	0.763	7.0 (5.4-8.6)	0.027	16.0 (10.5-21.5)	< 0.001
1-2	75 (59.5)	19 (25.3)		5.0 (3.9-6.1)		8.0 (5.9-10.1)	
Istotipo #							
ADK	66 (52.4)	17 (25.8)	0.932	6.0 (4.6-7.1)	0.025	13.0 (8.0-18.0)	0.003
Squamoso	31 (24.6)	7 (22.69)		4.0 (1.4-6.6)		8.0 (4.8-11.2)	
Altro	29 (23.0)						
Terapia							
Cisplatino	100(79.4)	28 (28.0)	0.798	6.0 (4.9-7.1)	0.527	11.0 (8.1-13.8)	0.680
Carboplatino	26 (20.6)	6 (23.1)		7.0 (2.2-11.8)		10.0 (0.1-20.0)	

Statistica è stata condotta per adenocarcinoma vs istologia squamosa

Tabella 11. Risultati clinici in base a polimorfismo e attività di CDA.

Polimorfismi e attività	Pazienti n (%)	HWE p	Frequenze Alleliche	Polimorfismi	Pazienti n (%)	Risposta n (%)	p	TTP mesi (95%CI)	p	OS mesi (95%CI)	p
CDA-A79C				CDA-A79C							
AA	42 (36.5)	0.941	A 0.61	AA-AC	99 (86.1)	28 (28.3)	0.304	6.0 (4.8-7.2)	0.001	11.0 (8.2-13.8)	0.001
AC	57 (49.6)		C 0.39	CC	16 (13.9)	2 (12.5)		3.0 (1.6-4.4)		5.0 (2.7-7.3)	
CC	16 (13.9)										
CDA-C145T				CDA-C145T							
CC	61 (52.1)	0.866	C 0.71	CC-CT	106(90.6)	28 (26.4)	0.816	6.0 (4.8-7.2)	0.164	10.0 (7.1-12.9)	0.025
CT	45 (38.5)		T 0.29	TT	11 (9.4)	2 (18.2)		2.0 (--4.3)		5.0 (2.0-8.0)	
TT	11 (9.4)										
CDA- combinaazione											
AA-CC	22 (19.5)				22 (19.5)	7 (31.8)	0.285	6.0 (4.6-7.4)	0.027	14.0 (7.8-20.2)	0.001
altri	85 (75.2)				85 (75.2)	22 (25.9)		5.0 (3.4-6.6)		10.0 (7.6-12.4)	
CC-TT	6 (5.3)				6 (5.3)	0 (0.0)		2.0 (0.9-3.1)		5.0 (3.2-6.7)	
CDA attività											
bassa	61 (51.3)					23 (37.7)	0.006	8.0 (6.5-9.5)	<0.001	19.0(14.3-23.7)	<0.001
alta	58 (48.7)					8 (13.8)		3.0 (2.0-4.0)		6.0 (4.6-7.5)	

HWE, Hardy-Weinberg equilibrium

4.3.3 Correlazione tra polimorfismi e outcome clinico

Nessuna correlazione significativa è stata osservata tra i genotipi CDA e la risposta obiettiva, mentre una tendenza verso una associazione significativa ($p = 0.10$, test di Pearson- χ^2 su due code) è stata osservata raggruppando pazienti con beneficio clinico rispetto a pazienti senza beneficio clinico. In particolare, il 75.9% dei pazienti con il genotipo CDA-A79A e CDA-A79C hanno sperimentato un beneficio clinico rispetto al 56.3% dei pazienti con CDA-C79C.

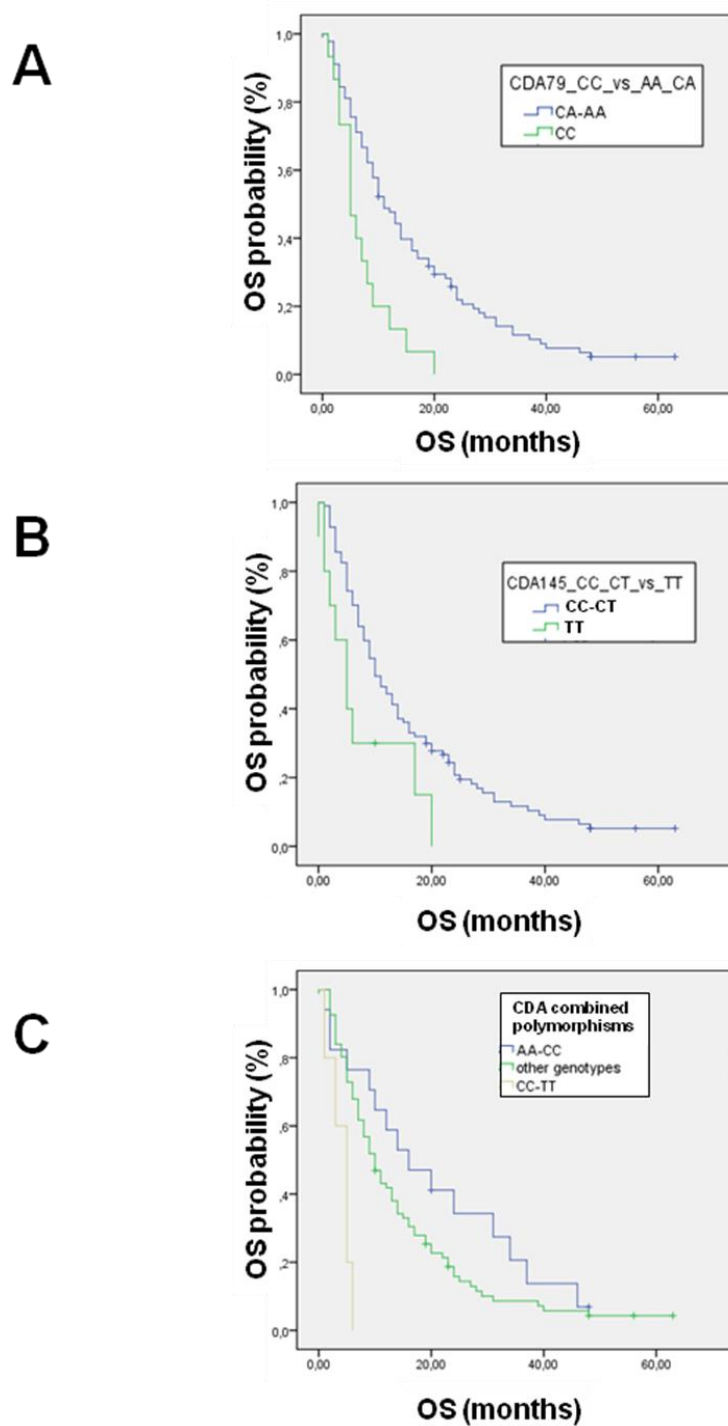
All'analisi univariata, il polimorfismo CDA-A79C è stato associato con differenti TTP e OS. In particolare, TTP significativamente più lungo è stato osservato in pazienti con il genotipo CDA-A79A (7.0 mesi, 95%CI 5.4-8.6) e A79C (6.0 mesi 95%CI 4.5-7.5), rispetto ai pazienti portatori della variante CDA-C79C che hanno avuto un TTP medio di 3.0 mesi (95%CI 1.6-4.4; $p = 0.005$). Allo stesso modo, i pazienti con genotipo CDA-C79C hanno avuto una prognosi peggiore, con 5.0 mesi (95%CI 4.0-16.5) di OS mediana, rispetto ai pazienti con il genotipo CDA-A79A (14.0 mesi, 95%CI 8.4-19.6) e A79C (10.0 mesi, 95%CI 6.9-13.1) ($p = 0.004$). Differenze significative ($p = 0.001$) sia per TTP e OS sono state osservate nel gruppo di pazienti portatori di CDA-A79A + CDA-A79C vs pazienti con CDA-C79C (Tabella 11 e Figura 3A).

Il polimorfismo CDA-C145T ha rivelato un trend verso una significativa associazione con TTP ($p = 0.098$) e OS ($p = 0.079$). I pazienti che portano le varianti CDA-C145C, CDA-C145C e CDA-T145T avevano TTP mediano di 5.0 mesi (95%CI 3.5-6.5), 6.0 mesi (95%CI 3.9-8.1) e 2.0 mesi (95%CI 0.6- 4.3). Allo stesso modo, una sopravvivenza più breve di 5.0 mesi (95%CI 2.0-8.0) è stato osservata in pazienti con il genotipo CDA-T145T, rispetto ai pazienti con il CDA-C145C con una OS mediana di 10.0 mesi (95%CI 6.8-13.2), identica all'OS degli eterozigoti (10 mesi, 95%CI 5.5-14.5). Le analisi raggruppate dei pazienti CDA-C145C + C145T vs pazienti CDA-T145T hanno evidenziato una $p = 0.025$ (Figura 3B).

Poiché CDA-A97C e C145T potrebbero avere un effetto additivo sull'attività della CDA, abbiamo ulteriormente studiato l'effetto della combinazione "rischio-genotipo" sull'OS. Gli alleli "deleterii" hanno incluso CDA-

C79C e CDAT145T, tutti legati a brevi OS. Queste combinazioni sono state analizzate in 113 pazienti (pazienti non valutabili per entrambi i polimorfismi sono stati esclusi) ed i pazienti che portavano il CDA-C79C + CDAT145T hanno avuto un OS significativamente più breve (Figura 3C).

Figura 3. Curve di sopravvivenza in base al genotipo di CDA.



4.3.4 Correlazione tra genotipo e CDA attività enzimatica

L'analisi delle attività CDA è stata eseguita con successo nella maggior parte dei campioni (N=124). Non è stata riscontrata differenza statistica nei valori CDA tra maschi e femmine, età ≤ 63 e età > 63 anni e le altre caratteristiche cliniche (dati non riportati).

L'attività media enzimatica in pazienti wild-type (CDA-A79A) è stata 8963.9 ± 6614.9 pmol/hr/mg di proteine, mentre nei pazienti portatori di CDA-A79C e del genotipo CDA-C79C l'attività media è stata 11686.5 ± 9339.9 e 15450.6 ± 10155.6 pmol/hr/mg di proteine, rispettivamente ($p = 0.009$ al test di Kruskal-Wallis). L'analisi statistica con il test di Mann-Whitney ha evidenziato anche una differenza significativa ($p = 0,019$) tra pazienti CDA-A79A+CDA-A79C e portatori del genotipo CDA-C79C (Figura 4A).

Al contrario, non vi sono differenze statisticamente significative ($p = 0.256$) nell'attività di CDA in pazienti con i genotipi CDA-C145C, CDA-C145T e CDA-T145T (ad esempio, 9888.8 ± 7789.7 , 11954.7 ± 9279.2 e $13955.8 \pm 9.523.4$ pmol/hr/mg proteine, rispettivamente), così come il gruppo di pazienti CDA-C145C+CDA-C145T vs. i pazienti CDA-T145T ($p = 0.121$).

Tuttavia, il "rischio-genotipo" è stato associato ad una attività significativamente più alta di CDA (18368.5 ± 10281.7 pmol/ hr/mg di proteine) vs pazienti portatori di tutti gli altri genotipi ($p = 0.039$).

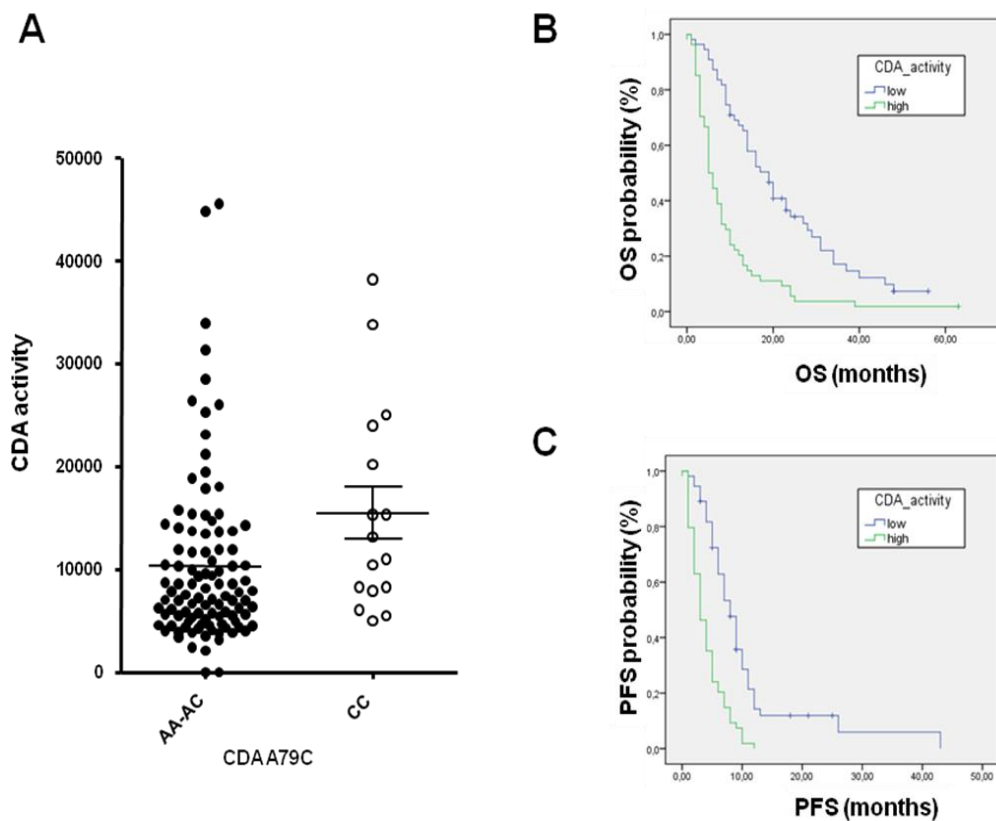
4.3.5 Correlazione tra attività enzimatica e outcome clinico

L'attività mediana del CDA in tutti i 124 pazienti è stata di 8243.6 (range, 23.2-45566.3) pmol/hr/mg di proteine. Usando questo valore come cut-off, i pazienti con bassa attività CDA hanno avuto un tasso di risposta significativamente più alto, un più lungo TTP ed un più a lungo OS rispetto ai pazienti con elevata attività del CDA (Tabella 11, Figura 4B).

Una bassa attività del CDA è stata anche significativamente associata a beneficio clinico; 56 dei 61 pazienti (91.8%) con bassa attività CDA ha raggiunto PR o SD vs. 30 pazienti su 58 (51.7%) con alta attività CDA ($p < 0.001$).

Allo stesso modo, una differenza significativa tra attività media del CDA ($p = 0.007$) è stata rilevata raggruppando i pazienti con risposta (7641.3 ± 5626.7 pmol/hr/mg) vs pazienti con SD e PD (12447.7 ± 9360.6 pmol/hr/mg), come così come raggruppando i pazienti con beneficio clinico (9556.5 ± 8502.8 pmol/hr/mg) vs. pazienti con PD (15440.5 ± 8156.9 pmol/hr/mg, $p < 0.001$).

Figura 4. A) Correlazione fra genotipo CDA A79C e attività; B) Curve di sopravvivenza in base all'attività del CDA.



4.3.6 Analisi multivariata

Per valutare il rischio di progressione della malattia e morte abbiamo effettuato due analisi di regressione di Cox inserendo tutte le variabili significativamente associate a TTP e OS nel modello univariato.

Tra i polimorfismi (Tabella 12), solo la variante CDA-C79C ha mostrato una significativa associazione con i rischi di progressione e di morte. Sesso, PS e istologia non sono risultati predittori indipendenti di TTP e OS. Il modello di regressione dei rischi proporzionali di Cox utilizzato per l'analisi multivariata ha confermato il significato prognostico del genotipo CDA 27. In particolare, una bassa attività del CDA è stata significativamente associata a ridotto rischio di morte (HR 0.527, 95%CI 0.327-0.957, $p = 0.034$) così come un ridotto rischio di progressione (HR 0.339, 95%CI 0.188-0.612, $p < 0.001$).

Tabella 12. Analisi multivariata per sopravvivenza globale (OS) e tempo libero da progressione (TTP).

Variabili per OS		Hazard ratio (95%CI)	p
Sesso	Femminile	0.675 (0.371-1.227)	0.197
	Maschile	1 (ref.)	
PS	0	0.759 (0.420-1.372)	0.362
	1-2	1 (ref.)	
Istotipo	Adenocarcinoma	0.656 (0.376-1.145)	0.138
	Squamoso	1 (ref.)	
CDA-A79C	AA -AC	0.375 (0.168-0.834)	0.016
	CC	1 (ref.)	
CDA-C145T	CC- CT	0.559 (0.327-1.798)	0.152
	TT	1 (ref.)	
CDA attività	Bassa	0.527 (0.318-0.957)	0.034
	Alta	1 (ref.)	
Variabili per TTP		Hazard ratio (95%CI)	p
Sesso	Femminile	0.792 (0.446-1.404)	0.424
	Maschile	1 (ref.)	
PS	0	1.077 (0.598-1.937)	0.805
	1-2	1 (ref.)	
Istotipo	Adenocarcinoma	0.739 (0.433-1.261)	0.267
	Squamoso	1 (ref.)	
CDA-A79C	AA -AC	0.446 (0.218-0.913)	0.027
	CC	1 (ref.)	
CDA attività	Bassa	0.339 (0.188-0.612)	<0.001
	Alta	1 (ref.)	

4.3.7 Analisi di tossicità

Tra i 126 pazienti valutabili per la tossicità, 56 pazienti (44.4%) hanno sviluppato tossicità ematologica (anemia, neutropenia e / o trombocitopenia), di cui 13 di grado 2 (23.2%), mentre il 53.6% e del 23.2% aveva grado 3 e 4 . Per quanto riguarda la tossicità non-ematologica, 29 pazienti (23.0%), vomito, debolezza, nausea, parestesie, tinnito e/o tossicità epatica/renale.

I pazienti sono stati raggruppati in pazienti con tossicità rispetto a pazienti senza tossicità (0 vs 1+). Ulteriori analisi sono state effettuate raggruppando i pazienti con tossicità ematologica di grado 0-3 vs pazienti con tossicità ematologica "alta" (grado 4). Nessuna correlazione significativa è stata osservata tra la tossicità e le caratteristiche cliniche della maggior parte dei pazienti, TTP o OS. Tuttavia, i pazienti trattati con carboplatino-gemcitabina hanno sperimentato più elevata incidenza di tossicità ematologica ($p = 0.028$), mentre una certa risposta è stata associata a grave tossicità ematologica; 9 dei 14 pazienti rispondenti (64.3%) che hanno manifestato tossicità ematologica di grado 4 hanno avuto un PR vs 25 dei 112 (22.3%) che non hanno ottenuto PR ($p = 0.003$).

Le correlazioni tra i polimorfismi e la tossicità sono descritte nella Tabella 13. Non è stata osservata nessuna correlazione raggruppando i pazienti in base a tossicità ematologica 0 vs 1+. Al contrario, la frequenza di tossicità non-ematologica è stata significativamente più bassa nei pazienti che portavano il genotipo CDA C79C+CDA-T145T. Tuttavia, nessuna associazione significativa è stata riportata tra l'attività del CDA e la tossicità non ematologica, come pure tra entrambe le tossicità ematologiche 0 vs 1+ e 0-3 vs 4.

Tabella 13. Tossicità secondo i polimorfismi di CDA e attività enzimatica.

Polimorfismo	Tossicità ematologica (0 vs 1+)	p	Tossicità non-ematologica (0-1 vs 1+)	p
CDA-A79C				
AA-AC	63 vs 42	0.777	84 vs 23	0.999
CC	9 vs 7		13 vs 3	
CDA-C145T				
CC-CT	65 vs 47	0.106	85 vs 27	0.449
TT	9 vs 2		10 vs 1	
CDA-combinazione				
AA-CC	14 vs 9	0.947	14 vs 9	0.046
Altri	54 vs 36		73 vs 17	
CC-TT	4 vs 2		6 vs 0	
CDA attività				
Bassa	36 vs 28	0.958	49 vs 15	0.983
Alta	35 vs 25		47 vs 13	

4.4 Discussione e conclusioni

Questo studio ha valutato l'impatto dei polimorfismi di CDA e la sua attività sull'outcome di pazienti con NSCLC avanzato e ha suggerito che l'attività enzimatica di CDA è un biomarker candidato di attività e di efficacia nei pazienti trattati con regimi di platino-gemcitabina. I recenti progressi nel trattamento del NSCLC avanzato sono stati ottenuti attraverso la scoperta di farmaci altamente attivi in sottogruppi selezionati di pazienti [2,10,11]. Tuttavia, una sfida attuale della ricerca è anche quella di trovare biomarcatori predittivi di efficacia per i regimi di chemioterapia standard.

La variabilità interindividuale della tossicità sottolinea anche la necessità di nuovi marcatori di farmacogenetica per selezionare i pazienti prima della terapia. Numerosi studi hanno valutato diversi biomarcatori in grado di predire la risposta alle terapie attuali e diverse alterazioni genetiche ed epigenetiche, come mutazioni genetiche, amplificazioni, stato di polimorfismo o alterata espressione genica o proteica, sono state associate a sensibilità o resistenza alla gemcitabina e, tra questi, appaiono bersaglio attraente alcuni polimorfismi germinali [68].

Il ruolo dello di SNP CDA è stato evidenziato per la prima volta da Sugiyama et al. [65] che hanno riportato che i pazienti con aplotipo CDA * 3, ad esempio, il sinonimo G208A (Ala70Thr), hanno avuto una clearance inferiore di gemcitabina e un aumento nell'incidenza di neutropenia di grado ≥ 3 . Tuttavia, la variante Ala70Thr non è mai stata rilevata nella popolazione caucasica, mentre la frequenza dell'allele del polimorfismo CDA A79C nel presente studio era $> 10\%$ [66,67], rendendolo un possibile polimorfismo più rilevante clinicamente.

Nel nostro precedente studio su 65 pazienti con NSCLC, il genotipo CDA A79A wild-type è stato correlato con beneficio clinico, più lunghi TTP e OS e più grave tossicità ematologica [67]. Questi dati sono risultati in parte concordi con quelli riportati da Farrell et al [69]. I risultati su 538 pazienti radicalmente operati con tumore al pancreas trattati all'interno dello studio randomizzato RTOG9704 hanno mostrato una correlazione tra il genotipo CDAA79A ed una

più grave tossicità ematologica, ma non con l'esito del trattamento [69]. Nel presente studio, sia il CDA A79C e che C435T non sono stati marcatori predittivi di attività o di tossicità del trattamento. Tuttavia, abbiamo confermato le nostre osservazioni precedenti; infatti pazienti portatori del genotipo di CDA A79A o A79C hanno avuto un aumento statisticamente significativo in TTP e OS rispetto ai pazienti con genotipo CDA C79C. Inoltre, i pazienti con genotipo CDA T435T hanno mostrato una OS più breve rispetto ai pazienti portatori del genotipo wild-type o la variante eterozigote; infine, il gruppo di pazienti con CDA C79C + T435T hanno mostrato TTP e OS significativamente più brevi.

Questi dati sono in parziale accordo con i risultati riportati da Okazaki et al. in cui 154 pazienti con adenocarcinoma pancreatico potenzialmente resecabile che ricevettero in neoadiuvante gemcitabina concomitante a radioterapia con (N = 70) o senza (n = 84) gemcitabina-cisplatino come terapia di induzione. Sei SNP, inclusi CDA A79C e C435T, hanno mostrato deboli associazioni con OS. Tuttavia, quando questi SNP sono stati analizzati in combinazione, un effetto gene-dosaggio è stato osservato, e all'aumentare del numero di alleli a rischio la OS diminuiva [70].

Le discrepanze osservate negli studi di farmacogenetica potrebbero anche derivare dal sistema complesso e solo parzialmente chiarito di regolazioni genetiche ed epigenetiche del gene CDA che potrebbe alterare l'attività fenotipica di questo enzima. Pertanto, un altro importante risultato del presente studio è stato che l'attività enzimatica di CDA, come rilevato da HPLC, è stata correlata sia con l'attività che con l'efficacia di platino-gemcitabina. In particolare, i pazienti con i livelli più bassi di attività CDA hanno riportato un tasso complessivo di risposta significativamente più alto rispetto ai pazienti con alta attività. Inoltre, i pazienti con bassa attività CDA hanno sperimentato un aumento statisticamente significativo in TTP e OS rispetto ai pazienti ad alta attività, confermato come fattore prognostico indipendente all'analisi multivariata.

A nostra conoscenza, questa è la prima prova sul ruolo predittivo dell'attività enzimatica di CDA in termini di outcome nei pazienti con NSCLC trattati con chemioterapia a base di gemcitabina. Uno studio preliminare in 40

pazienti con cancro al pancreas ha riportato una correlazione simile tra alta attività di CDA e progressione dopo trattamenti a base di gemcitabina [71].

Questi risultati possono avere importanti applicazioni cliniche, come la modulazione della dose di gemcitabina in base all'attività CDA. Degno di nota, l'analisi HPLC è un test semplice ed economico, facilmente trasportabile e fattibile in qualsiasi laboratorio.

Anche se in assenza di un gruppo di controllo, i risultati del presente studio sono importanti anche per ipotizzare il ruolo predittivo dell'attività enzimatica di CDA in questo contesto clinico specifico. L'end-point primario era OS, ma i dati aggiuntivi su risposta, beneficio clinico e TTP suggeriscono che l'attività CDA è predittiva di attività.

Nello studio di Ciccolini et al. [64], i pazienti con bassa attività di CDA hanno sperimentato una grave tossicità ematologica. Tuttavia, nel presente studio, la tossicità ematologica e non-ematologica è stata registrata solo nei giorni 1 e 8 di tutti i cicli di chemioterapia. Pertanto, una grave tossicità ematologica, verificatasi al giorno 15, non è stata riportata tra i dati clinici e non siamo riusciti a correlare questi dati con genotipi di CDA e attività. Tuttavia, il fatto che non abbiamo osservato casi con attività enzimatica molto bassa di CDA potrebbe spiegare l'assenza di gravi eventi avversi nella nostra popolazione. Al contrario, la correlazione di attività CDA con fattori di efficacia (OS e TTP) potrebbe essere il risultato di disintossicazione differenziale del farmaco da parte del fegato e le cellule tumorali, che possono verificarsi anche con piccole variazioni di attività enzimatica.

In conclusione, anche se selezionati polimorfismi di CDA hanno confermato il loro ruolo nella previsione di TTP e OS, l'analisi dell'attività CDA è emerso come il più forte indicatore predittivo di efficacia di terapia a base di platino-gemcitabina.

5. Fattori biologici predittivi nel trattamento chemioterapico con pemetrexed nella neoplasia polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato

5.1 Razionale dello studio

Pemetrexed, un antifolato di recente scoperta che ha mostrato in vitro di avere come bersaglio almeno tre differenti enzimi coinvolti nel pathway dei folati [timidilato sintetasi (TS), diidrofolato reduttasi (DHFR), e glicinamide ribonucleotide formil transferasi (GARFT)], è dotato di attività antitumorale nei confronti di vari tipi di tumore. Questa molecola è stata approvata per il trattamento del mesotelioma pleurico in fase avanzata e nel trattamento di prima e seconda linea del carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) in stadio avanzato [72-74].

Nei protocolli NVALT-7 e GOIRC 02/2006 il farmaco rappresenta il braccio di riferimento, quale agente singolo, ed è combinato al carboplatino nel braccio sperimentale nel trattamento di seconda linea dei tumori polmonari non a piccole cellule. Questo sottostudio biologico rappresenta un'indagine di ricerca traslazionale condotta con lo scopo di caratterizzare dal punto di vista molecolare i pazienti arruolati negli studi NVALT-7 e GOIRC 02/2006 al fine di identificare gruppi di pazienti che presentano beneficio differente con trattamento a base di pemetrexed.

Alcuni studi effettuati in vitro hanno evidenziato che linee cellulari di tumore esprimenti elevati livelli di TS o di DHFR sono meno sensibili al pemetrexed, suggerendo che un'iper-espressione di tali enzimi potrebbe correlare con una ridotta efficacia del farmaco [75]. Ulteriori studi hanno dimostrato che l'espressione della TS è un fattore prognostico nel NSCLC [76]. Il gene per la TS ha un numero variabile di sequenze ripetute (variable number of tandem repeats, VNTR) ed un polimorfismo in un singolo nucleotide (SNP) nella regione 5'-untranslated, che sembrano essere correlati con la sua espressione.

Oltre ai geni per i tre enzimi citati (TS, GARFT e DHFR), esistono altri geni associati alla resistenza nei confronti dei farmaci inibitori dei folati che potrebbero essere oggetto di studi con lo scopo di identificare fattori biologici predittivi di risposta al pemetrexed. Alcune linee cellulari hanno mostrato aver acquisito resistenza nei confronti degli antifolati modulando quei meccanismi cellulari responsabili dell'uptake o della ritenzione dei rispettivi agenti. Per esempio, la resistenza agli antifolati è stata attribuita ad una ridotta poliglutamazione degli antifolati derivante da una scarsa espressione della foli-poli-glutamato sintetasi (FPGS) o da un'aumentata attività dell'enzima glutamil idrolasi (GGH) [77,78]. L'aggiunta di glutamati normalmente aumenta l'affinità di alcuni antifolati per i loro bersagli, derivandone una maggiore azione inibitoria rispetto ai composti non glutamati. Alterazioni nell'espressione o nell'attività dei carrier dei folati (reduced folate carrier, RFC) sono anch'esse associate ad una resistenza nei confronti degli antifolati in relazione ad una compromissione del loro up-take [77].

Da considerare, inoltre, che la TS catalizza una reazione importante nella proliferazione cellulare: la metilazione di dUMP in dTMP grazie al 5,10-metilentetraidrofolato (5,10-metileneTHF) come donatore di metili. L'inibizione della TS avviene quando si forma un complesso ternario stabile tra farmaco inibente, enzima e donatore di metili. Un'inibizione ottimale della TS richiede elevate concentrazioni cellulari di 5,10-metileneTHF e ciò spiega il fatto che studi clinici hanno dimostrato un'elevata attività antitumorale quando il 5-FU, anch'esso farmaco inibitore della TS, viene associato all'acido folinico, precursore del 5,10-metileneTHF. La concentrazione intracellulare del 5,10-metileneTHF è regolata dall'attività della metilen-tetraidrofolato reduttasi (MTHFR), un enzima che gioca un ruolo chiave nel metabolismo dei folati. Questo enzima catalizza la conversione irreversibile del 5,10-metileneTHF in 5,10-metil-tetraidrofolato (5,10-metilTHF), il donatore di metili nella sintesi della metionina a partire dall'omocisteina.

La più comune mutazione della MTHFR è una sostituzione C 3 T nel paio di basi 677 che causa una sostituzione della valina in alanina nell'enzima funzionale [79,80]. Questa singola sostituzione può essere individuata poiché

reduce la stabilità dell'enzima; è una mutazione autosomica recessiva e individui omozigoti per la mutazione C677T (i.e. T/T) presentano una minore attività della MTHFR nei linfociti ed una ridotta stabilità dell'enzima (da ciò deriva la dicitura "MTHFR termolabile"). La frequenza del polimorfismo C677T della MTHFR varia a seconda della razza e del gruppo etnico. Analisi su popolazioni caucasiche ed asiatiche hanno mostrato quote di omozigosi (TT) del 12% e fino al 50% di eterozigosi (C/T).

Un secondo frequente polimorfismo nel gene della MTHFR è una transizione 1298 A>C nell'esone 7, che esita in una sostituzione dell'alanina con l'acido glutammico in all'interno di un dominio di regolazione della proteina. L'allele 1298C porta ad una ridotta attività dell'enzima, sebbene non agli stessi livelli dell'allele 677T. Individui che sono eterozigoti per entrambi gli alleli 677T e 1298C hanno una riduzione dell'attività della MTHFR pari al 40-50% ed un profilo biochimico simile a quello presente negli omozigoti 677T.

I polimorfismi nel gene per la MTHFR (677C>T e 1298A>C), associati a una ridotta attività dell'enzima, dovrebbero portare a concentrazioni maggiori di 5,10-metileneTHF con conseguente formazione e stabilizzazione dei complessi ternari ad azione inibitoria. Quindi, pazienti che presentano mutazioni degli alleli dovrebbero essere più sensibili ai farmaci inibitori della TS, quale pemetrexed, rispetto ai pazienti con un genotipo wild-type [79,80].

Dal momento che tutti questi geni mostrano polimorfismi funzionali, la loro indagine potrebbe permettere l'identificazione di genotipi specifici associati ad attività e tossicità del trattamento con pemetrexed. Nel nostro progetto pertanto le analisi su cellule di sangue periferico includeranno: 1) SNPs e VNTR della regione enhancer del promotore di TS (TSER); 2) SNPs nei geni per MTHFR, RFC, GGH. Data la presenza nel braccio sperimentale del platino, è stato inoltre valutato il polimorfismo di XPD Lys751Gln.

5.2 Disegno dello studio

Valutare il ruolo dei polimorfismi dei geni TS, MTHFR, RFC, GGH nel predire l'efficacia e la tossicità nei confronti del trattamento con pemetrexed in pazienti affetti da NSCLC avanzato arruolati negli studi NVALT-7 e GOIRC 02/2006.

End-point primario: La correlazione tra i polimorfismi dei geni TS, MTHFR, RFC, GGH e la sopravvivenza libera da progressione (PFS) in pazienti affetti da NSCLC avanzato arruolati negli studi NVALT-7 e GOIRC 02/2006. .

End-points secondari: La correlazione tra i polimorfismi dei geni TS, MTHFR, RFC, GGH e la risposta al trattamento in pazienti affetti da NSCLC avanzato arruolati negli studi NVALT-7 e GOIRC 02/2006; la correlazione tra i polimorfismi dei geni TS, MTHFR, RFC, GGH e la sopravvivenza globale (OS) in pazienti affetti da NSCLC avanzato sia arruolati negli studi NVALT-7 e GOIRC 02/2006; la correlazione tra i polimorfismi dei geni TS, MTHFR, RFC, GGH e la tossicità in pazienti affetti da NSCLC avanzato arruolati negli studi NVALT-7 e GOIRC 02/2006.

Per ogni paziente è stato prelevato un campione di sangue (almeno 10 ml, pari a circa 2 provette da emocromo). Tutti i campioni sono stati immediatamente inviati al laboratorio di riferimento oppure stoccati dai centri partecipanti ad una temperatura di almeno -20° C ed inviati periodicamente. Tutti i campioni inviati al laboratorio di riferimento sono stati crio-conservati in azoto liquido in apposite provette. Qualora disponibili, sono state ottenute sezioni di tessuto tumorale incluso in paraffina dalle quali è stato estratto DNA genomico per le analisi dei polimorfismi, con l'intenzione di verificare il matching tra genotipo del tessuto normale (sangue – germline) e tumorale (somatico).

5.3 Materiali e metodi

5.3.1 Pazienti

Questo studio di farmacogenetica multicentrico ha coinvolto un numero di pazienti arruolati nei Paesi Bassi e Italia. In particolare, 127 pazienti sono stati arruolati in Olanda nell'ambito di un studio randomizzato di fase II di pemetrexed confrontato con pemetrexed e carboplatino in pazienti pretrattati con NSCLC avanzato (NVALT-7) [81], 46 pazienti sono stati arruolati in uno studio identico italiano (GOIRC 02/2006) [82] e 35 pazienti sono stati trattati con analoghi regimi impiegati fuori protocollo presso l'Oncologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma.

Criteri di eleggibilità principali sono stati: diagnosi di NSCLC avanzato, progressione della malattia dopo la terapia di prima linea a base di platino, Adequate riserva midollare e funzionalità epatica e renale.

I pazienti hanno ricevuto pemetrexed da solo (500 mg/m²) o in combinazione con carboplatino (AUC5). Cicli sono stati ripetuti ogni 3 settimane per un massimo di 4 cicli.

Un consenso informato scritto è stato ottenuto da ciascun paziente. Lo studio è stato condotto secondo le linee guida Good Clinical Practice e in conformità con la Dichiarazione di Helsinki del World Medical Association.

5.3.2 Analisi molecolare dei polimorfismi dei geni per TS, MTHFR, RFC, GGH

I geni/polimorfismi candidati sono stati selezionati attraverso un approccio funzionale al fine di valutare i determinanti noti per modulare meccanismo di azione del farmaco. Pertanto, abbiamo utilizzato i seguenti criteri: 1) che il gene fosse parte di un percorso per i quali esiste una base scientifica credibile per sostenere il suo coinvolgimento nell'attività del farmaco, 2) che il gene abbia un consolidato, ben documentato polimorfismo genetico; 3) che la frequenza del polimorfismo sia abbastanza alta in modo che il suo effetto sul risultato clinico possa essere significativo, 4) che il polimorfismo abbia un certo grado di probabilità di alterare la funzione del gene in modo

biologicamente rilevante, e che 5) studi precedenti abbiano mostrato una correlazione significativa del polimorfismo candidato con l'outcome clinico.

Il DNA genomico è stato isolato da cellule del sangue venoso periferico e, qualora disponibile, da tessuto tumorale fissato e incluso in paraffina, mediante kit commerciale (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen, Hilden, Germania) in base alle istruzioni del produttore, e le rese del DNA e l'integrità sono stati controllati a 260-280nm con NanoDrop®-1000-Detector (NanoDrop-Technologies, Wilmington, DE, USA).

Il genotipo TSER è stato valutato mediante PCR della regione enhancer (5'UTR) del gene TS utilizzando un primer in avanti e un primer reverse, come descritto [83]. Tutti gli altri polimorfismi sono stati valutati con test Taqman®-sonde-based utilizzando il PRISM-7500 Sequence Detection System ABI strumento equipaggiato con la versione 1.3.0 del software SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Queste reazioni PCR sono state eseguite utilizzando 1,2 ml di campione di DNA e 5 ml di reagenti, in un volume totale di reazione di 6,2 microlitri. La miscela di reazione ha subito le seguenti condizioni termo ciclistico: 95°C per 10 min, 40 cicli di amplificazione a 92°C per 15 secondi seguita da fase finale ricottura e l'estensione a 60°C per 1 minuto, come precedentemente descritto [84] (vedi anche Metodi capitolo 3 e 4).

Tutti i campioni sono stati analizzati in doppio. I risultati delle indagini molecolari sono stati interpretati in maniera indipendente, non a conoscenza dei dati clinici del paziente.

5.3.3 Analisi statistica

Per quanto riguarda i polimorfismi, le analisi statistiche sono state effettuate raggruppando i pazienti secondo i tre diversi genotipi per ogni polimorfismo. Ulteriori analisi sono state effettuate combinando i genotipi omozigoti ed eterozigoti quando avevano la stessa direzione di effetto (per esempio, entrambi avevano ridotto o aumentato il tempo di sopravvivenza rispetto al gruppo di riferimento).

Le frequenze genotipiche sono state controllate per l'accordo con quelli previsti sotto l'equilibrio di Hardy-Weinberg attraverso il *SNP-analyzer-software*

(<http://snp.istech21.com/snpanalyzer/2.0/>), mentre il linkage disequilibrium (LD) è stato calcolato e tracciato utilizzando il *Innate Immunity PGA, NHLBI Program LD-Plotter tool*.

Le informazioni demografiche e cliniche sono state confrontate con il genotipo, mediante il test χ^2 di Pearson (per variabili categoriche).

La risposta tumorale è stata valutata con TC ogni 2 cicli. Le risposte sono state valutate utilizzando i criteri di valutazione di risposta RECIST, versione 1.0. Le peggiori tossicità ematologiche e non ematologiche sono state registrate e valutate utilizzando NCIC-CTC versione 3.0.

Per aumentare il potere statistico di analisi e in accordo con il nostro precedente studio, abbiamo definito i pazienti che hanno raggiunto una risposta completa (CR) o risposta parziale (PR) come "rispondenti", ed i pazienti con malattia stabile (SD) o malattia progressiva (PD) come "non-rispondenti". Ulteriori analisi sono state effettuate raggruppando i pazienti con CR, PR e SD (definiti come "pazienti con beneficio clinico") vs pazienti con PD ("pazienti senza beneficio clinico").

PFS è stata calcolata dalla data di registrazione alla data di evidenza clinica e/o radiologica di progressione o morte, qualunque cosa sia avvenuta prima, mentre l'OS è stata calcolata a partire dal giorno di inizio del trattamento fino all'end-point (morte o censiti).

E' stato impiegato il metodo di Kaplan-Meier per tracciare PFS e OS e il log-rank test è stato utilizzato per confrontare le curve in analisi univariata. Le variabili prognostiche di PFS e OS in analisi univariata sono stati inclusi nell'analisi multivariata utilizzando il modello di rischio proporzionale di Cox. I dati sono stati analizzati utilizzando il software SPSS-17 (SPSS, Inc.). Tutte le analisi sono state a due code e $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. Dal momento che questo è stato uno studio retrospettivo esplorativo, nessuna correzione per test multipli è stata effettuata.

5.4 Risultati

5.4.1 Caratteristiche dei pazienti

Un totale di 208 pazienti consecutivi, affetti da NSCLC avanzato, sono stati valutati per questo studio (tra cui 127 pazienti considerati nello studio [81]). La maggioranza dei pazienti di stadio IV (81.2%), mentre 39 (18.8%) avevano malattia in stadio IIIB (Tabella 14).

Il follow-up mediano è stato di 13.5 mesi (range 3.1-40.5 mesi). Il tasso di risposta è stato del 18%; PFS mediana è stata di 3.8 mesi (95%CI 3.2-4.4) e la OS mediana di 9.4 mesi (95%CI 7.7-11.1). I risultati in base alle caratteristiche cliniche sono riportati in Tabella 14.

Da segnalare, nei pazienti valutati per l'analisi del polimorfismo alcuna significativa differenza di tasso di risposta, PFS mediana e OS è stata osservata tra i due regimi. Questi risultati sono stati simili ai dati ottenuti in 479 pazienti della analisi combinata dei due studi randomizzati [82]. Infatti, le caratteristiche dei pazienti qui analizzati non erano diverse da quelle della popolazione degli studi NVALT-7-GOIRC-02.2006 studi (risultati non mostrati).

La mancanza di differenze significative nei risultati tra i due gruppi ci hanno spinto a effettuare la valutazione genotipizzazione sui dati raccolti. Abbiamo anche effettuato l'analisi di correlazione dei polimorfismi con l'outcome per gruppo di trattamento specifico.

5.4.2 Informazioni del genotipo

La genotipizzazione è stata eseguita con successo nella maggior parte dei campioni di DNA (Tabella 15). Discrepanze non sono state osservate nei campioni analizzati in doppio (circa 10%), e tutti i dati di genotipizzazione sono stati inclusi nell'analisi finale. Le frequenze dei genotipi erano comparabili con quelle riportati nelle popolazioni caucasiche in NCBI/NCI-SNP500 database.

Nessuna correlazione è stata trovata tra genotipi e istologia del tumore (ad esempio, nessuna relazione significativa è stata trovata tra i genotipi di TS e istologia del tumore, squamoso vs non-squamoso). Allo stesso modo, nessuna

correlazione significativa è stata rilevata tra i genotipi ed età, sesso, PS o stadio (dati non riportati).

5.4.3 Correlazione tra polimorfismi e outcome clinico

Non sono state osservate correlazioni significative tra i diversi polimorfismi e la risposta, ma un trend verso una significativa associazione ($p = 0.081$) è stato osservato nei pazienti con genotipo MTHFR-T677T vs pazienti con genotipo MTHFR-C677C o MTHFR C677T (Tabella 15). In particolare, il 35% dei pazienti portatori del genotipo MTHFR-T677T ha dimostrato risposta clinica rispetto al 16% dei pazienti con genotipo MTHFR-C677C o MTHFR C677T-pazienti (Tabella 15). Analogamente, non sono state osservate correlazioni significative tra polimorfismi e beneficio clinico.

All'analisi univariata, il polimorfismo MTHFR C677T, è stato associato con differente PFS e OS (Figura 5). Significativa più lunga sopravvivenza libera da progressione è stata osservata nei pazienti portatori della variante MTHFR-T677C (5.4 mesi, 95%CI 3.6-7.2), rispetto ai pazienti portatori del genotipo MTHFR-C677C o MTHFR C677T, che hanno mostrato una PFS mediana di 3.4 mesi (95%CI 2.7-4.1, $p = 0.012$). Allo stesso modo, i pazienti con il polimorfismo MTHFR-T677T hanno avuto una prognosi migliore, con una OS mediana 16.4 mesi (95%CI 7.7-125,0), rispetto ai pazienti con genotipo MTHFR-C677C o MTHFR C677T (8.5 mesi, 95%CI 6.8-10.2) ($p = 0.026$).

Nessuna associazione significativa è stata osservata con tutti gli altri polimorfismi. Allo stesso modo, nessuna associazione è stata trovata tra genotipi e tossicità correlata (dati non riportati), che è stato valutato considerando qualsiasi tossicità correlata alla chemioterapia (ematologica e non-ematologica; grado 0-1 vs grado 2-3).

Tabella 14. Caratteristiche dei pazienti.

Caratteristiche	Tutti i Pazienti n (%)	Pazienti n (%)#	Risposta n (%)#	<i>P</i>	PFS mesi (95%CI)	<i>p</i>	OS mesi (95%CI)	<i>P</i>
	208	192	35		3.8 (3.2-4.4)		9.4 (7.7-11.1)	
Età								
≤ 65 anni	136 (65.4)	126 (66.6)	23 (18.2)	0.990	3.3 (2.8-3.8)	0.145	8.8 (6.9-10.7)	0.330
> 65 anni	72 (34.6)	66 (33.4)	12 (18.2)		4.9 (4.0-5.7)		10.8 (7.1-14.5)	
Sesso								
Maschile	131 (63.0)	119 (38.0)	20 (16.8)	0.515	4.1 (3.2-5.0)	0.605	8.7 (5.5-11.8)	0.369
Femminile	77 (37.0)	73 (62.0)	15 (20.5)		3.6 (2.8-4.4)		9.4 (7.7-11.1)	
Stadio								
IIIB	39 (18.8)	36 (18.7)	8 (22.2)	0.491	4.9 (3.4-6.3)	0.096	12.2 (10.5-13.9)	0.134
IV	169 (81.2)	156 (81.3)	27 (17.3)		3.5 (2.9-4.1)		8.5 (7.0-10.0)	
Istotipo								
Squamoso	49 (25.8)	45 (25.9)	5 (11.1)	0.143	2.9 (2.7-3.1)	0.030	9.4 (6.2-12.6)	0.751
Non-Squamoso	141 (74.2)	129 (74.1)	27 (20.9)		4.3 (3.7-4.9)		9.4 (6.9-11.9)	
ECOG-PS								
0	71 (34.1)	69 (35.9)	6 (8.7)	0.018	4.9 (3.5-6.3)	0.038	12.6 (10.4-14.8)	0.038
1-3	137 (65.9)	123 (64.1)	29 (23.6)		3.3 (2.5-4.1)		8.0 (6.5-9.5)	
Terapia								
Pemetrexed	115 (55.3)	105 (54.7)	23 (11.4)	0.147	4.1 (3.3-4.9)	0.472	8.5 (6.2-10.8)	0.392
Pemetrexed + Carbo	93 (44.7)	87 (45.3)	12 (13.8)		3.4 (2.4-4.4)		10.1 (7.5-11.1)	

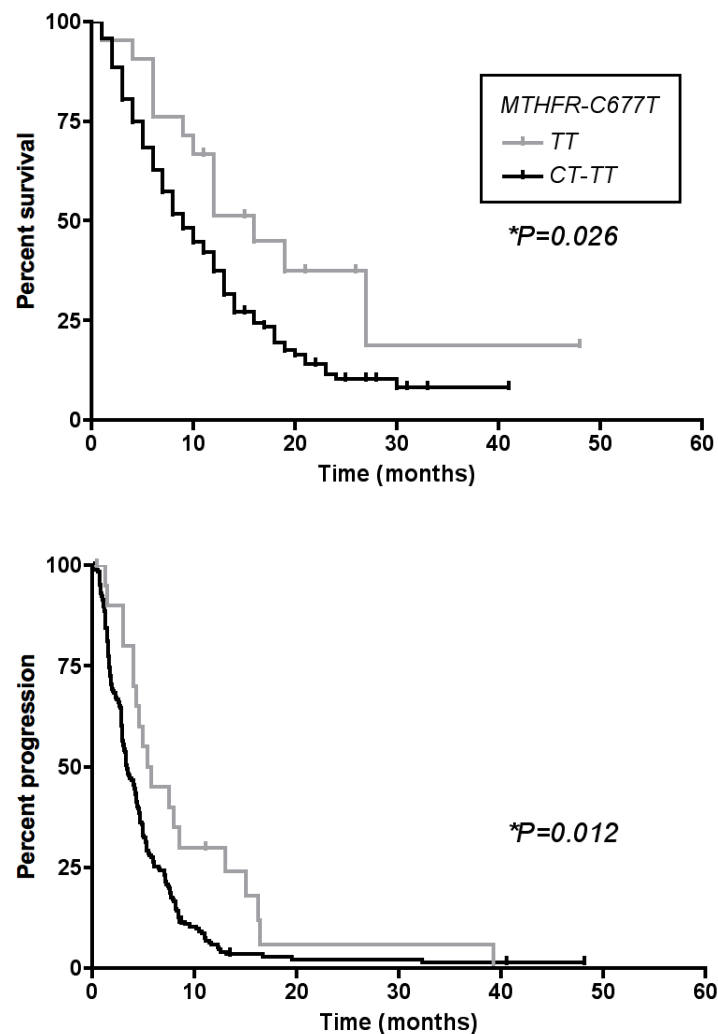
I dati delle caratteristiche cliniche erano disponibili per I 208 pazienti (eccetto per l'istologia per 174) mentre I dati di risposta erano disponibile per 192 pazienti (35 PR and 157 SD + PD).

Tabella 15. Risultati clinici in base ai differenti polimorfismi.

Polimorfismo	Pazienti n (%)	Frequenze Alleliche	Polimorfismo	Pazienti n (%)	Risposta n (%)	p	PFS mesi (95%CI)	p	OS mesi (95%CI)	P
	208			192	35		3.8 (3.2-4.4)		9.4 (7.7-11.1)	
XPD-Lys751Gln			XPD-Lys751Gln							
LysLys = AA	88 (42.3)	A 0.62	AA-AC	159 (82.8)	29 (22.3)	0.994	4.0 (3.3-4.7)	0.117	9.6 (7.4-11.8)	0.060
LysGln = AC	83 (39.9)	C 0.38	CC	33 (17.2)	6 (18.2)		3.3 (2.8-3.8)			
GlnGln = CC	37 (17.8)									
MTHFR-C677T			MTHFR-C677T							
CC	95 (45.7)	C 0.68	CC-CT	172 (82.7)	28 (16.3)	0.081	3.4 (2.7-4.1)	0.012	8.5 (6.8-10.2)	0.026
CT	92 (44.2)	T 0.32	TT	20 (17.3)	7 (35.0)		5.4 (3.6-7.2)		16.4 (7.7-25.0)	
TT	21 (10.1)									
RFC-G80A			RFC-G80A							
GG	81 (38.9)	G 61.5	GG-GA	161 (77.4)	26 (16.1)	0.148	3.6 (3.0-4.2)	0.746	9.4 (7.4-11.3)	0.634
GA	94 (45.2)	A 38.5	AA	31 (22.6)	9 (29.0)		4.4 (2.5-6.3)		11.5 (6.8-16.2)	
AA	33 (15.9)									
RFC-exon6-SNP			RFC-exon6-SNP							
CC	84 (40.4)	C 63.3	CC-CT	165 (79.3)	30 (18.2)	0.966	3.9 (3.3-4.6)	0.268	9.6 (7.4-11.9)	0.291
CT	95 (45.7)	T 36.7	TT	27 (20.7)	5 (18.5)		3.5 (2.1-4.9)		8.0 (1.8-14.2)	
TT	29 (13.9)									
GGH-C452T			GGH-C452T							
CC	168 (80.8)	C 88.5	CC-CT	185 (88.9)	33 (17.8)	0.823	3.7 (3.1-4.2)	0.252	9.4 (7.6-11.2)	0.736
CT	32 (15.4)	T 11.5	TT	7 (11.1)	2 (28.6)		5.6 (4.6-6.6)		8.3 (5.7- 17.6)	
TT	8 (3.8)									
TSER*			TSER*							
bassa	123 (59.1)		Bassa	123 (59.1)	17 (14.9)	0.212	3.5 (2.7-4.2)	0.455	8.7 (6.1-11.3)	0.811
Alta	85 (40.9)		Alta	85 (40.9)	18 (23.1)		4.3 (3.1-5.5)		9.6 (7.5-11.7)	

*TSER bassa e alta si riferisce a genotipo con bassa espressione (TSER 2R/2R + TSER 2R/3R) e a genotipo con alta espressione (TSER 3R/3R)

Figura 5. Curve di sopravvivenza in base al polimorfismo MTHFR-C677T.



5.4.4 Analisi multivariata

Per valutare il rischio di progressione e di morte sono state condotte due analisi di regressione proporzionale di Cox, inserendo tutte le variabili significativamente associate con PFS e OS nel modello univariato (Tabella 16).

Queste analisi hanno confermato il significato prognostico del polimorfismo MTHFR C677T. In particolare, il genotipo MTHFR-C677C/C677T ha mostrato una significativa associazione sia con il rischio di progressione (HR 1.94, 95%CI 1.15-3.28, $p = 0.012$) e il rischio di morte (HR 2.00, 95%CI 1.12 -

3.54, $p = 0.018$). L'istologia squamosa è risultata un predittore significativo di aumento del rischio di progressione (HR 1.41, 95%CI 1.01-1.99, $p = 0.046$). Al contrario, PS = 0 è risultato significativamente associato con un rischio ridotto di morte (HR = 0.67, 95%CI 0.48-0.94, $p = 0.021$) e ha rivelato un trend verso una riduzione del rischio di progressione (HR 0.72, 95%CI 0.52 -0.99, $p = 0.050$).

Tabella 16. Fattori associati con OS e PFS all'analisi multivariata.

Variabili per OS		Hazard ratio (95%CI)	p
ECOG-PS	0	0.67 (0.48-0.94)	0.021
	1-3	1 (ref.)	
MTHFR-C677T	CC-CT	2.00 (1.12-3.54)	0.018
	TT	1 (ref.)	
Variabili per PFS		Hazard ratio (95%CI)	p
ECOG-PS	0	0.72 (0.52-0.99)	0.050
	1-3	1 (ref.)	
Istotipo	Squamoso	1.41 (1.01-1.99)	0.046
	Non-Squamoso	1 (ref.)	
MTHFR-C677T	TT	1.94 (1.15-3.28)	0.012
	CC-CT	1 (ref.)	

5.4.5 Correlazione tra polimorfismi e outcome clinico per gruppo di trattamento

Dato che i polimorfismi potrebbero avere effetti differenziali nei pazienti trattati nei due regimi, abbiamo ulteriormente esplorato l'effetto dei polimorfismi sui risultati clinici per gruppo di trattamento. Queste analisi sono state effettuate in 114 e 94 pazienti trattati con pemetrexed da solo o con pemetrexed-carboplatino, rispettivamente.

Abbiamo confrontato le caratteristiche demografiche di base di questi gruppi, che non mostrano differenze significative per età, sesso, stadio, istologia e PS.

All'analisi univariata per gruppo di trattamento (Tabella 17), il polimorfismo XPD-Lys751Gln è risultato significativamente associato sia con PFS che OS nel gruppo dei pazienti trattati con la combinazione di carboplatino-pemetrexed. In particolare, il genotipo XPD-Gln751Gln è risultato associato ad una minore sopravvivenza libera da progressione ($p = 0.021$) e OS ($p = 0.044$). Al contrario, non sono state rilevate correlazioni significative per questo genotipo nei pazienti trattati con pemetrexed da solo.

Al contrario, il polimorfismo MTHFR-T677T è stato associato significativamente ad una più lunga sopravvivenza libera da progressione ($p = 0.027$) nei pazienti trattati con pemetrexed. La tendenza verso una significativa associazione con una più lunga OS nei pazienti trattati con carboplatino-pemetrexed ($p = 0.066$), così come i precedenti risultati, hanno suggerito un possibile ruolo di questo polimorfismo come fattore predittivo di una migliore prognosi. Nessuna associazione significativa è stata osservata per la risposta e per tutti gli altri polimorfismi in entrambi i gruppi di trattamento.

Tabella 17. Risultati clinici in base ai differenti polimorfismi per braccio di trattamento.

Pazienti trattati con Pemetrexed						Pazienti trattati con Carboplatino-Pemetrexed				
Polimorfismi	Pazienti	PFS mesi	p	OS mesi	p	Pazienti	PFS mesi	p	OS mesi	P
	n (%)	(95%CI)		(95%CI)		n (%)	(95%CI)		(95%CI)	
	114	4.1 (3.3-4.9)		8.5 (6.2-10.8)		94	3.4 (2.4-4.4)		10.1 (7.5-11.1)	
XPB-Lys751Gln										
AA-AC	94 (82.5)	4.1 (3.2-5.0)	0.874	8.7 (5.4-12.0)	0.484	77 (81.9)	4.0 (3.0-5.0)	0.021	11.8 (9.2-14.4)	0.044
CC	20 (17.5)	3.8 (1.6-6.0)		7.0 (4.8-9.2)		17 (18.1)	2.8 (1.7-3.9)		7.8 (2.6-13.0)	
MTHFR-C677T										
CC-CT	100 (87.7)	3.7 (2.8-4.5)	0.027	9.6 (6.0-13.1)	0.202	87 (92.6)	3.3 (2.8-3.9)	0.207	9.6 (7.2-11.9)	0.066
TT	14 (12.3)	5.4 (3.3-7.5)		8.5 (6.2-10.8)		7 (7.4)	7.5 (1.0-14.0)		18.5 (14.2-22.8)	
RFC-G80A										
GG-GA	93 (81.6)	4.1 (3.3-4.9)	0.413	8.3 (6.0-10.6)	0.304	82 (87.2)	3.3 (2.7-3.9)	0.665	10.3 (7.3-13.3)	0.662
AA	21 (18.4)	4.0 (2.1-5.9)		11.5 (6.3-17.0)		12 (12.8)	5.3 (4.6-5.0)		10.1 (4.4-15.8)	
RFC-exon6-SNP										
CC-CT	95 (83.3)	4.2 (3.3-5.1)	0.327	8.7 (6.2-11.2)	0.496	84 (89.4)	3.4 (2.4-4.4)	0.541	11.6 (8.0-15.2)	0.537
TT	19 (16.7)	3.5 (1.7-5.3)		6.3 (2.9-9.7)		10 (10.6)	2.9 (2.6-6.1)		10.0 (4.4-15.6)	
GGH-C452T										
CC-CT	110 (96.5)	4.1 (3.3-4.9)	0.358	8.5 (5.8-11.2)	0.143	90 (95.7)	3.3 (2.5-4.1)	0.087	10.1 (7.1-13.1)	0.184
TT	4 (3.5)	2.8 (0.9-6.4)		0.8 (--8.4)		4 (4.3)	5.9 (1.7-13.6)		18.5 (2.7-34.3)	
TSER										
bassa	64 (56.1)	3.7 (2.6-4.7)	0.882	8.0 (3.9-12.1)	0.792	59 (62.8)	3.3 (2.7-4.9)	0.301	9.6 (6.3-12.9)	0.544
alta	50 (43.9)	4.2 (2.8-5.6)		8.5 (5.5-11.5)		35 (37.2)	4.9 (2.5-7.3)		11.6 (8.0-15.2)	

5.4 Discussione e conclusioni

Con il crescere delle possibilità terapeutiche nel NSCLC, lo sviluppo di predittori molecolari è divenuto di crescente importanza. Pemetrexed rappresenta un'opzione terapeutica di crescente utilizzo, indicato nel trattamento di prima o seconda linea del NSCLC avanzato nel caso di istologia non squamosa [73,74]. Non esistono al momento noti fattori predittivi, oltre all'istologia, in grado di identificare un sottogruppo di pazienti che possano beneficiare maggiormente rispetto ad altri del trattamento con pemetrexed.

Gli studi NVALT-7 e GOIRC 02/2006 hanno testato la combinazione carboplatino-pemetrexed verso pemetrexed da solo in due studi paralleli gemelli in seconda linea, combinati in un'analisi pooled [81,82]. Nello studio olandese il trattamento sperimentale di combinazione ha dimostrato un tempo alla progressione significativamente più lungo (4.2 vs 2.8 mesi, HR 0.67; 95%CI 0.51-0.89; $p = 0.005$) rispetto al trattamento standard con solo pemetrexed [81]. Lo studio Italiano non ha dimostrato tuttavia alcuna differenza in TTP; l'analisi combinata, pianificata a priori per valutare con adeguata potenza statistica l'eventuale impatto in OS, non ha dimostrato alcun vantaggio dall'aggiunta del carboplatino alla monoterapia con pemetrexed [82].

La popolazione di questi due studi ha rappresentato la casistica per studiare eventuali fattori predittori molecolari del trattamento con pemetrexed. Ai pazienti di questi due studi di cui era disponibile un prelievo di sangue basale, sono stati aggiunti pazienti trattati con pemetrexed al di fuori dei due studi. Sono stati considerati i geni/polimorfismi attraverso un approccio funzionale al fine di valutare i determinanti noti per modulare meccanismo di azione di pemetrexed.

Il nostro studio ha mostrato una correlazione significativa fra l'allele MTHFR 677T e una maggiore sopravvivenza libera da progressione e globale in pazienti trattati con pemetrexed. Tale differenza è clinicamente rilevante dato che i pazienti con genotipo TT, che rappresentano circa il 10% della popolazione in studio, hanno mostrato sopravvivenze libera da progressione e globale circa doppie rispetto ai pazienti con genotipo eterozigote o wild-type. In

assenza di un gruppo di controllo non trattato con pemetrexed, non è possibile tuttavia definire il ruolo prognostico o predittivo del beneficio con pemetrexed di tale polimorfismo.

Esistono altri studi in letteratura che hanno valutato alcuni dei polimorfismi da noi studiati nell'ambito del NSCLC. Due recenti studi hanno valutato i polimorfismi dei geni RFC e GGH, oltre che FPGS [85,86]. Il primo ha esaminato 48 pazienti con NSCLC che hanno ricevuto pemetrexed e bevacizumab e ha trovato una relazione significativa tra il polimorfismo dell'esone 6 (2522) C>T in SCL19A1 (RFC) e la sopravvivenza libera da progressione e tra il polimorfismo (1307) IVS1 C>T γ -glutamyl idrolasi (GGH) e la sopravvivenza globale [85]. Inoltre, 4 differenti polimorfismi sono stati associati significativamente con la tossicità e in particolare con la tossicità ematologica. Il polimorfismo dell'esone 6 è risultato correlato significativamente alla sopravvivenza nel secondo studio condotto su 54 pazienti trattati con pemetrexed e gemcitabina [86]. In questo stesso studio anche il polimorfismo GGH IVS (1042) è stato correlato con il beneficio clinico.

Studi simili sono stati condotti anche nell'ambito della patologia testa collo [87,88]. Nel primo sono stati testati TS e MTHFR in 32 pazienti trattati con pemetrexed, cetuximab e radioterapia, senza evidenziare alcuna correlazione significativa [87]. Nel secondo, condotto sempre dallo stesso gruppo in pazienti che avevano ricevuto pemetrexed e bevacizumab, è emerso un potenziale ruolo del polimorfismo MTHFR A1298C, dato che pazienti con genotipo AA hanno mostrato peggiore sopravvivenza [88].

Nessun altro polimorfismo da noi studiato ha mostrato differenze significative, salvo XPD; il genotipo Gln751Gln è risultato associato a una minore sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale nel caso di aggiunta del carboplatino a pemetrexed. Tale polimorfismo è stato valutato insieme con quelli di XRCC3, ERCC1, GARFT, DHFR e TS retrospettivamente in una casistica Italiana di 80 pazienti trattati con carboplatino e pemetrexed [89]. In questo studio non è emersa alcuna correlazione significativa fra l'outcome dei pazienti e i differenti polimorfismi; analogamente a quanto emerso

nella nostra casistica, tenuto conto della bassa tossicità, non sono emerse correlazioni significative con gli eventi avversi ematologici e non.

E' necessario mettere in evidenza alcune difficoltà con l'approccio del gene candidato nel predire l'esito dei risultati clinici. In primo luogo, la conoscenza dei polimorfismi funzionali germinali aumenta continuamente e tutti i nuovi polimorfismi funzionali dovrebbero essere valutati in nuove sperimentazioni cliniche. Ciò è in conflitto con l'approccio del gene candidato, che mira a mantenere il numero di mutazioni valutata bassa, soprattutto per minimizzare l'over-fitting di test multipli. In secondo luogo, la valutazione di marcatori genetici potenzialmente predittivi è di solito inserito in clinica come protocollo secondario, come nel nostro caso, e la valutazione dei polimorfismi funzionale non è progettata specificatamente per questo scopo. In terzo luogo, l'interpretazione dei dati è ostacolata dall'eterogeneità della popolazione, dai farmaci concomitanti.

Considerando i nostri dati e quanto ottenuto in letteratura, probabilmente studi clinici prospettici dovrebbero essere condotti al fine di validare il polimorfismo germinale di MTHFR quale potenziale marcatore prognostico o predittivo del trattamento con pemetrexed nel NSCLC.

6. Conclusioni

Nella pratica clinica, ancora oggi, nella scelta terapeutica del NSCLC avanzato un dato schema di terapia viene scelto tenendo conto di alcuni fattori clinici come l'età, il performance status, la presenza di co-morbidità e valutando i profili di tossicità dei vari regimi, lontani quindi da una situazione di specifica individualizzazione. Il progetto che ho sviluppato in questi 4 anni è stato volto ad identificare fattori predittivi di risposta ai diversi tipi di trattamento (chemioterapico e biologico) impiegati nella terapia del NSCLC avanzato con il fine quindi di individuare sottopopolazioni di pazienti che possono beneficiare di uno specifico trattamento rispetto ad altre.

Il mio progetto si è articolato in quattro sottoprogetti relativi a quattro differenti tipi di terapie utilizzate nel trattamento del NSCLC avanzato ed esattamente gefitinib, cisplatino, gemcitabina e pemetrexed.

Il primo progetto "Panel di marcatori molecolari predittivi nel trattamento con gefitinib di pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato" condotto all'inizio del dottorato ha consentito di confermare il ruolo predittivo delle mutazioni di EGFR nel trattamento con EGFR TKIs ed in particolare con gefitinib. Tale studio è stato pubblicato sulla rivista Lung Cancer [90]. Attualmente proprio tali mutazioni, sulla base di studi prospettici successivi, sono entrate nella pratica clinica e rappresentano un elemento fondamentale di scelta terapeutica di prima linea nel NSCLC.

Il secondo progetto "Espressione immunoistochimica di ERCC1/BRCA1 e polimorfismi dei geni di riparo del DNA quali fattori predittivi nel trattamento chemioterapico a base di platino dei pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato" condotto su una casistica abbastanza limitata rappresenta, tuttavia, l'unico studio in cui potenziali fattori predittivi di risposta al platino (ERCC1, BRCA1 e i polimorfismi di ERCC1, XPD, XRCC1-3) sono stati valutati anche in un braccio di controllo di pazienti non trattati con platino. Questo studio è stato presentato in sessione plenaria in occasione del Congresso Nazionale di Oncologia nel 2010 [91] e sarà oggetto di prossima pubblicazione. Dai risultati emerge un ruolo prognostico dell'espressione

immunoistochimica di ERCC1; ossia i pazienti negativi hanno outcome migliore indipendentemente dal trattamento eseguito. Si segnala, anche se in maniera statisticamente non significativa, interazione tra espressione immunoistochimica di ERCC1 e la risposta al trattamento, indicando che i pazienti ERCC1 negativi hanno maggiore tasso di risposta quando trattati con platino. Dal nostro studio non emergono tuttavia dati significativi circa gli altri fattori studiati ed in particolare i vari polimorfismi, per i quali esistono dati contrastanti in letteratura, non hanno mostrato alcun ruolo prognostico-predittivo.

Il terzo progetto ha valutato la “Correlazione dei polimorfismi e dell’attività della citidina deaminasi con l’outcome dei pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule avanzato trattati con platino-gemcitabina”. In tale progetto sono stati evidenziati un ruolo significativo del polimorfismo CDA 79 e, soprattutto, dell’attività enzimatica di CDA nel predire l’outcome dei pazienti trattati con platino e gemcitabina. Questo studio è stato pubblicato sulla rivista *Annals of Oncology* [92]. I risultati ottenuti sono originali ed interessanti e possono rappresentare la base per uno studio randomizzato nel quale scegliere il trattamento sulla base dell’attività di CDA.

Il quarto progetto “Fattori biologici predittivi nel trattamento chemioterapico con pemetrexed nella neoplasia polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato” ha testato alcuni polimorfismi quali potenziali predittori del trattamento con pemetrexed. Questo studio rappresenta uno sottostudio biologico di due studi clinici (NVALT-7 e GOIRC 02/2006) che hanno testato l’aggiunta di carboplatino a pemetrexed nel trattamento di seconda linea del NSCLC. Molto esigui sono i dati disponibili in letteratura circa fattori predittivi al trattamento con pemetrexed e la nostra casistica rappresenta la più numerosa disponibile. Il nostro studio ha mostrato una correlazione significativa fra l’allele MTHFR 677T e una maggiore sopravvivenza libera da progressione e globale in pazienti trattati con pemetrexed. Tale differenza è clinicamente rilevante dato che i pazienti con genotipo TT, che rappresentano circa il 10% della popolazione in studio, hanno mostrato sopravvivenze libera da progressione e globale circa doppie rispetto ai pazienti con genotipo eterozigote o wild-type. Considerando i nostri dati e quanto ottenuto in letteratura,

probabilmente studi clinici prospettici dovrebbero essere condotti al fine di validare il polimorfismo germinale di MTHFR quale potenziale marcatore prognostico o predittivo del trattamento con pemetrexed nel NSCLC.

Le mutazioni di EGFR rappresentano attualmente una realtà imprescindibile nella scelta terapeutica del NSCLC. Vari sono i dati già disponibili in particolare su ERCC1, in parte, da noi confermati. Sicuramente più originali ed interessanti sono i nostri risultati relativi a CDA e MTHFR. Proprio questi ultimi sono meritevoli di studi clinici prospettici di validazione.

7. Bibliografia

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90
2. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160-1174.
3. Bunn PA Jr, Dziadziuszko R, Varella-Garcia M, et al. Biological markers for non-small cell lung cancer patient selection for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:3652-3656.
4. Jänne PA, Engelman JA, Johnson BE. Epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer: implications for treatment and tumor biology. *J Clin Oncol* 2005;23:3227-3234.
5. Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2005;2:e17.
6. Dziadziuszko R, Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr. Selecting lung cancer patients for treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization - why, when, and how? *Clin Cancer Res* 2006;12(Suppl 14):4409-4415.
7. Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Shigematsu H, et al. Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small cell lung cancer patients. *J Clin Oncol* 2005;23:5007-5018.
8. Han SW, Jeon YK, Lee KH, et al. Intron 1 CA dinucleotide repeat polymorphism and mutations of epidermal growth factor receptor and gefitinib responsiveness in non-small-cell lung cancer. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17:313-319.
9. Tiseo M, Capelletti M, De Palma G, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Intron-1 polymorphism predicts gefitinib outcome in advanced non-small cell lung cancer. *J Thor Oncol* 2008;3:1104-1111.

10. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in Epidermal Growth Factor Receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-2139.
11. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-1500.
12. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13306-13311.
13. Jänne PA, Borrás AM, Kuang Y, et al. A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening. *Clin Cancer Res* 2006;12:751-758.
14. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:643-655.
15. Loprevite M, Tiseo M, Chiaramondia M, et al. Buccal mucosa cells as “in vivo” model to evaluate gefitinib activity in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:6518-6526.
16. McInerney JM, Wilson MA, Strand KJ, Chrysogelos SA. A strong intronic enhancer element of the EGFR gene is preferentially active in high EGFR expressing breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2001;80:538-549.
17. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:2237-2246.
18. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer. *JAMA* 2003;290:2149-2158.
19. Pérez-Soler R, Chachoua A, Hammond LA, et al. Determinants of tumor response and survival with Erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:3238-3247.
20. Perez-Soler R, Saltz L. Cutaneous adverse effects with HER1/EGFR-targeted agents: is there a silver lining? *J Clin Oncol* 2005;23:5235-5246.

21. Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, et al. An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res* 2004;64:9139-9143.
22. Nomura M, Shigematsu H, Li L, et al. Polymorphism, mutations and amplification of EGFR gene in non-small cell lung cancer. *PLOS Med* 2007;4:715-727.
23. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer – molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005;353:133-144.
24. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib in phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:5034-5042.
25. Non-Small Cell Lung Cancer Collaborative Group: Chemotherapy in non-small cell lung cancer: A meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. *BMJ* 1995;311:899-909.
26. Waters JS, O'Brien MER. The case for the introduction of new chemotherapy agents in the treatment of advanced non small cell lung cancer in the wake of the findings of The National Institute of Clinical Excellence (NICE). *Br J Cancer* 2002;87:481-490.
27. Kelly K, Crowley J, Bunn PA Jr et al. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: A Southwest Oncology Group trial. *J Clin Oncol* 2001;19:3210-3218.
28. Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M et al. Phase III randomized trial comparing three platinum based doublets in advanced Non Small Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:4285-4291.
29. Schiller JH, Harrington D, Belani C et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002;346:92-98.
30. Fossella F, Pereira JR, Von Pawel J et al. Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations vs vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small cell lung cancer: The TAX 326 Study Group. *J Clin Oncol* 2003;21:3016-3024.

31. Smit EF, Van Meerbeeck J, Lianes P et al. Three-arm randomized study of two cisplatin-based regimens and paclitaxel plus gemcitabine in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a phase III trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Group-EORTC 08975. *J Clin Oncol* 2003;21:3909-3917.
32. Boni C, Tiseo M, Boni I, et al. Triplets versus doublets, with or without cisplatin, in the first-line treatment of stage IIIB-IV non-small cell lung cancer (NSCLC) patients: a multicenter randomized factorial trial (FAST). *Br J Cancer*, in press.
33. Beljanski V, Marzilli LG, Doetsch PW. DNA damage-processing pathways involved in the eukaryotic cellular response to anticancer DNA cross-linking drugs. *Mol Pharmacol* 2004;65:1496-1506.
34. Simon GR, Sharma S, Cantor A, et al. ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with non-small cell lung cancer. *Chest* 2005;127:978-983
35. Lord RV, Brabender J, Gandara D, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:2286-2291.
36. Rosell R, Danenberg KD, Alberola V, et al. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:1318-1325.
37. Ceppi P, Volante M, Novello S, et al. ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. *Ann Oncol* 2006;17:1818-1825.
38. Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998;16:309-316.
39. Shirota Y, Stoecklacher J, Brabender J, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001;19:4298-4304.

40. Joshi MB, Shirota Y, Danenberg KD, et al. High gene expression of TS1, GSTP1, and ERCC1 are risk factors for survival in patients treated with trimodality therapy for esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2215-2221.
41. Li Q, Yu JJ, Mu C, et al. Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2000;20:645-652.
42. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *NEJM* 2006;355:983-991.
43. Zheng Z, Chen T, Li X, et al. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *NEJM* 2007;356:800-808.
44. Gazdar AF. DNA repair and survival in lung cancer – the two faces of Janus. *NEJM* 2007;356:771-773.
45. Husain A, He G, Venkatraman ES, et al. BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* 1998;58:1120--1123.
46. Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, et al. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 2003;63:6221-6228.
47. Taron M, Rosell R, Felip E, et al. BRCA m RNA expression levels as an indicator of chemo-resistance in lung cancer. *Hum Mol Genet* 2004;13:2443-2449.
48. Wachters FM, Wong LS, Kampinga HH, et al. ERCC1, hRad51, and BRCA1 protein expression in relation to tumour response and survival of stage III/IV NSCLC patients treated with chemotherapy. *Lung Cancer* 2005;50:211-219.
49. Zhou W, Gurubhagavatula S, Liu G, et al. Excision repair cross-complementation group 1 polymorphism predicts overall survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2004;10:4939-4943.

50. Isla D, Sarries C, Rosell R, et al. Single nucleotide polymorphisms and outcome in docetaxel cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004;15:1194-203.
51. Ryu JS, Hong YC, Han HS, et al. Association between polymorphisms of ERCC1 and XPD and survival in non-small-cell lung cancer patients treated with cisplatin combination chemotherapy. *Lung Cancer* 2004;44:311-6.
52. Su D, Ma S, Liu P, et al. Genetic polymorphisms and treatment response in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007; 56:281-288.
53. Suk R, Gurubhagavatula S, Park S, et al. Polymorphisms in ERCC1 and grade 3 or 4 toxicity in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1534-1538.
54. Gurubhagavatula S, Liu G, Park S et al. XPD and XRCC1 genetic polymorphisms are prognostic factors in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22:2594-2601.
55. de las Peñas R, Sanchez-Ronco M, Alberola V, et al. Polymorphism in DNA repair gene modulate survival in cisplatin/gemcitabine-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 2006;17:668-675.
56. Gridelli C, Gallo C, Shepherd FA et al. Gemcitabine plus vinorelbine compared with cisplatin plus vinorelbine or cisplatin plus gemcitabine for advanced non-small cell lung cancer : a phase III trial of the Italian GEMVIN Investigators and the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2003;21:3025-3034.
57. Smit EF, van Meerbeeck JP, Lianes P et al. Three-arm randomized study of two cisplatin based regimens and paclitaxel plus gemcitabine in advanced non small cell lung cancer: a phase III trial of the European organization for research and treatment of cancer. Lung Cancer Group EORTC 08975. *J Clin Oncol* 2003;21:3909-3917.
58. Georgoulas V, Ardavanis A, Tsiadaki X et al. Vinorelbine plus cisplatin versus docetaxel plus gemcitabine in advanced non small cell lung cancer: a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2005;23:2937-2945.

59. D'Addario G, Pintilie M, Leighl NB, et al. Platinum-based versus non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of the published literature. *J Clin Oncol* 2005;23:2926-2936.
60. Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, et al. BRCA1: a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer. *PLoS ONE* 2007;2:e1129.
61. Cobo M, Isla D, Massuti B et al. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:2747-2754.
62. Eliopoulos N, Cournoyer D, Momparler RL, et al. Drug resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine, 2',2'-difluorodeoxycytidine, and cytosine arabinoside conferred by retroviral-mediated transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;42:373-378.
63. Wong A, Soo RA, Yong WP, et al. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine. *Drug Metab Rev* 2009; 41:77-88.
64. Ciccolini J, Dahan L, André N, et al. Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. *J Clin Oncol* 2010;28:160-165.
65. Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, et al. Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients: the impact of a cytidine deaminase polymorphism. *J Clin Oncol* 2007;25:32-42.
66. Gilbert JA, Salavaggione OE, J Yuan, et al. Gemcitabine pharmacogenomics: cytidine deaminase and deoxycytidylate deaminase gene resequencing and functional genomics. *Clin Cancer Res* 2006;12:1794-1803.
67. Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2008 ;14:1797-1803.
68. Danesi R, Altavilla G, Giovannetti E, Rosell R. Pharmacogenomics of gemcitabine in non-small-cell lung cancer and other solid tumors. *Pharmacogenomics* 2009;10:69-80.
69. Farrell J, Bae K, Guha C, et al. Correlation of cytidine deaminase single nucleotide polymorphisms and toxicity from gemcitabine in patients with

- pancreatic cancer from RTOG 9704. Proc ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium 2009; A:115.
- 70.Okazaki T, Javle M, Tanaka M, et al. Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity. Clin Cancer Res 2010;16:320-329.
 - 71.Dahan L, Ciccolini J, Duluc M, et al. Evaluation of extensiveness in CDA as a marker of treatment failure in digestive cancer patients treated with gemcitabine- based chemotherapy. Proc ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium 2010; A:118.
 - 72.Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, et al. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. J Clin Oncol 2003;21:2636-44.
 - 73.Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. J Clin Oncol 2004;22:1589-97.
 - 74.Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2008;26(21):3543-51.
 - 75.Schultz RM, ChenVJ, Bewley JR, Roberts EF, Shih C,Dempsey JA. Biological activity of the multitargeted antifolate, MTA (LY231514), in human cell lines with different resistance mechanisms to antifolate drugs. Semin Oncol 1999;26:68-73.
 - 76.Takehara A, Kawakami K, Ohta N, et al. Prognostic significance of the polymorphisms in thymidylate synthase and methylene-tetrahydrofolate reductase gene in lung cancer. Anticancer Res 2005;25:4455-61.
 - 77.Wang Y, Zhao R, Goldman ID. Decreased expression of the reduced folate carrier and folypolyglutamate synthetase is the basis for acquired resistance to the pemetrexed antifolate (LY231514) in an L1210 murine leukemia cell line. Biochem Pharmacol 2003;65:1163-70.
 - 78.Rhee MS, Ryan TJ, Galivan J. Glutamyl hydrolase and the multitargeted antifolate LY231514. Cancer Chemother Pharmacol 1999;44:427-32.

79. Bailey LB, Gregory JF 3rd. Polymorphisms of methylene-tetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 1999;129:919-22.
80. Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Del Rio E, M. Baiget M. Methylene-tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy? *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;57:835-40.
81. Smit EF, Burgers SA, Biesma B, et al.. Randomized phase II and pharmacogenetic study of pemetrexed compared with pemetrexed plus carboplatin in pretreated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:2038-2045.
82. Tiseo M, A. Ardizzoni, L. Boni, et al. Pemetrexed versus pemetrexed plus carboplatin in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *Journal of Thoracic Oncology (Suppl.)*, 2011.
83. Mauritz R, Giovannetti E, Beumer IJ, et al. Polymorphisms in the enhancer region of the thymidylate synthase gene are associated with thymidylate synthase levels in normal tissues but not in malignant tissues of patients with colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2009;8:146-154.
84. Giovannetti E, Zucali PA, Peters GJ, et al. Association of polymorphisms in AKT1 and EGFR with clinical outcome and toxicity in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Mol Cancer Ther* 2010;9:581-593.
85. Adjei AA, Mandrekar SJ, Dy GK, et al: Phase II trial of pemetrexed plus bevacizumab for second-line therapy of patients with advanced non-small-cell lung cancer: NCCTG and SWOG study N0426. *J Clin Oncol* 2010;28:614-619.
86. Adjei AA, Salavaggione OE, Mandrekar SJ, et al. Correlation between polymorphisms of the reduced folate carrier gene (SLC19A1) and survival after pemetrexed-based therapy in non-small cell lung cancer: a North Central Cancer Treatment Group-based exploratory study. *J Thorac Oncol* 2010;5:1346-1353.

87. Argiris A, Karamouzis MV, Smith R, et al. Phase I trial of pemetrexed in combination with cetuximab and concurrent radiotherapy in patients with head and neck cancer. *Ann Oncol.* 2011;22:2482-2488.
88. Argiris A, Karamouzis MV, Gooding WE, et al. Phase II trial of pemetrexed and bevacizumab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29:1140-1145.
89. Metro G, Chiari R, Mare M, et al. Carboplatin plus pemetrexed for platinum-pretreated, advanced non-small cell lung cancer: a retrospective study with pharmacogenetic evaluation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;68:1405-1412.
90. Tiseo M, Rossi G, Capelletti M, et al. Predictors of gefitinib outcomes in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): study of comprehensive panel of molecular markers. *Lung Cancer* 2010;67:355-360.
91. Ardizzoni A, Tiseo M, Baldini E, et al. Triplets versus doublets with or without cisplatin in the first-line treatment of stage IIIB-IV non-small cell lung cancer (NSCLC) patients: final clinical and biomarker results of the “FAST” multicenter randomized GOIRC study. 12° Congresso Nazionale di Oncologia Medica (Roma, 6 – 8 novembre 2010) in *Tumori (Suppl.):* 2, 2010.
92. Tibaldi C, Giovannetti E, Tiseo M, et al. Correlation of cytidine deaminase polymorphisms and activity with clinical outcome in gemcitabine-/platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 2011 Jun 7.

Un sentito ringraziamento a tutti coloro che mi hanno consentito di condurre e portare a termine questo progetto.

In particolare, ringrazio il Prof. Cesare Bordi, il Prof. Enrico Maria Silini, il Prof. Guido Rindi e tutto il personale dell'Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma senza i quali non sarebbe stata possibile questa tesi.

Ringrazio il Dr. Giulio Rossi dell'Anatomia Patologica del Policlinico di Modena, la Dr. ssa Elisa Giovannetti della VU University Medical Center di Amsterdam ed il Dr. Carmelo Tibaldi dell'Oncologia Medica dell'Ospedale di Livorno con i quali ho condiviso piacevolmente parte di questo progetto.

Ringrazio la Dr. ssa Elena Spiritelli e la Dr. ssa Paola Bordi che con impegno e passione mi hanno aiutato in questa tesi.

Ringrazio il Dr. Luca Boni dell'Istituto Tumori Toscano, la Dr. ssa Roberta Camisa e la Dr. ssa Elena Rapacchi dell'Oncologia Medica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma che con il loro aiuto hanno reso possibile questo progetto.

Infine, ringrazio il Dr. Andrea Ardizzoni per il suo supporto, i suoi stimoli ed i suoi insegnamenti quotidiani.