



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN

" Medicina Molecolare "

CICLO XXXIII

**Applicazione della biopsia liquida su pazienti affetti da
cancro del colon retto metastatico KRAS, NRAS e BRAF wild-
type.**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Prisco Mirandola

Tutore:

Chiar.mo Prof. Roberto Perris

Dottorando: Adele Busico

Anni Accademici 2017/2018 – 2019/2020

INDICE

ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	
1.1 Epidemiologia del cancro del colon-retto	5
1.2 Eziologia, fattori di rischio e patogenesi del CRC	6
1.2.1 Sindromi ereditarie	7
1.2.2 Fattori di rischio	9
1.2.3 CRC sporadici e patogenesi	10
1.3 Anatomia Patologica (WHO, 2019)	14
1.4 Diagnosi e stadiazione	16
1.4.1 Modalità di diffusione	19
1.5 Strategie terapeutiche	19
1.5.1 Malattia localizzata	19
1.5.2 Malattia metastatica: mCRC	20
1.5.2.1 Farmaci molecolari	21
1.5.3 Terapia di mantenimento	24
1.6 Biomarcatori molecolari prognostici e predittivi	25
1.6.1 RAS	26
1.6.2 BRAF	28
1.6.3 Instabilità dei microsatelliti (MSI)	29
1.6.4 HER2	30
1.6.5 NTRK	30
1.6.6 Mutazioni di PIK3ca e PTEN	31
1.7 La biologia molecolare nella gestione dei pazienti mCRC	32
1.7.1 La caratterizzazione molecolare nella pratica clinica	33
1.7.1.1 Tecnologie NGS	35
1.7.2 La sfida della biopsia liquida	37
2. SCOPO DEL PROGETTO	40
3. MATERIALI E METODI	

3.1 Pazienti e tumori	43
3.1.1 Studio Cricket	43
3.1.2 Studio Valentino	43
3.2 Preparazione dei campioni	45
3.3 Preparazione delle librerie NGS	47
3.4 Sequenziamento NGS	55
4. RISULTATI	
4.1 Studio Cricket	59
4.2 Studio Valentino	66
5. DISCUSSIONE	
5.1 Studio Cricket	80
5.2 Studio Valentino	83
6. CONCLUSIONI	86
7. BIBLIOGRAFIA	87

ABSTRACT

Il cancro del colon-retto (CRC) è uno dei tipi di cancro più comuni ed una delle principali cause di morte in tutto il mondo; il 30% dei nuovi casi viene diagnosticato come carcinoma coloretale metastatico (mCRC). L'uso dei farmaci target anti-EGFR, quali *cetuximab* e *panitumumab*, ha dimostrato di poter incrementare i risultati della chemioterapia citotossica. Diversi studi hanno dimostrato che non tutti i pazienti beneficiano di questi farmaci e che la presenza di mutazioni a carico dei geni *KRAS* e *NRAS* determinano resistenza a questi anticorpi quindi l'utilizzo è ristretto ai soli pazienti RAS^{wt}. Recentemente, risultati preliminari hanno evidenziato la rilevanza biologica del DNA tumorale circolante (ctDNA) come strumento estremamente sensibile per documentare l'eterogeneità tumorale rispetto al prelievo tissutale; inoltre mediante prelievi ripetuti potrebbe essere possibile valutare l'evoluzione molecolare del tumore per poter guidare potenziali strategie di adattamento della terapia.

In questo lavoro è stata valutata l'applicazione della biopsia liquida mediante NGS in due studi clinici: lo studio CRICKET che è stato progettato per valutare prospetticamente la strategia di rechallenge con cetuximab + irinotecan come trattamento di terza linea per i pazienti che hanno avuto una risposta iniziale e poi una progressione; a tal scopo è stato valutato il ctDNA di 25 pazienti per indagare la presenza di potenziali meccanismi di resistenza acquisita agli anticorpi monoclonali anti-EGFR; lo studio ha mostrato che i pazienti con mutazione di *KRAS* non beneficiano della strategia di rechallenge ed ha dimostrato la fattibilità dell'utilizzo della biopsia liquida per monitorare l'andamento della malattia durante il trattamento; lo studio Valentino è stato progettato per valutare quale sia la terapia di mantenimento più efficace tra panitumumab in monoterapia e la combinazione di panitumumab con 5-FU/Lv ed è stata condotta l'analisi NGS su ctDNA di 190 pazienti per valutare in modo prospettico l'importanza clinica delle alterazioni rilevate nel ctDNA e il loro ruolo come driver e come meccanismi potenzialmente farmacologici; i primi dati relativi ci mostrano come la biopsia liquida sia in grado di evidenziare l'eterogeneità intratumorale del CRC che è sostanzialmente trascurata dalle biopsie tumorali. Per il colon-retto, l'utilizzo della biopsia liquida è raccomandata solo all'interno degli studi clinici e di laboratorio, ma è auspicabile l'introduzione nella pratica clinica di routine, in un'ottica di miglioramento della stratificazione e personalizzazione delle terapie mediante un monitoraggio non invasivo della progressione della malattia in tempo reale.

1. Introduzione

1.1 Epidemiologia del cancro del colon-retto

Il cancro del colon-retto (CRC) è uno dei tipi di cancro più comuni ed una delle principali cause di morte in tutto il mondo con quasi 900.000 decessi all'anno; si stima che nel 2018 siano stati diagnosticati 1,8 milioni di casi di cancro del colon-retto. Inoltre, il 30% dei nuovi casi viene diagnosticato come carcinoma coloretale metastatico (mCRC) al momento della visita iniziale. L'incidenza di questa neoplasia è in costante aumento e ciò è dovuto ad un invecchiamento della popolazione ma anche a fattori di rischio quali abitudini alimentari scorrette dei paesi ad alto reddito, obesità, mancanza di esercizio fisico. I tassi di incidenza più alti si registrano in Australia, Europa, Nuova Zelanda e Nord America.

Si prevede che l'incidenza del CRC in tutto il mondo aumenterà fino a 2-5 milioni di nuovi casi nel 2035 (Dekker et al., 2019).

Secondo i dati ISTAT, in Italia, i decessi per il tumore del colon-retto sono stati quasi 20.000 (11.000 negli uomini e 9.000 nelle donne). Nel 2019 ci sono state circa 50000 nuove diagnosi di CRC e rappresentano la terza neoplasia negli uomini (14%) e la seconda nelle donne (12%) ed è la seconda causa di morte sia negli uomini (11%) che nelle donne (12%). (Figura 1.1)

A

Rango	Maschi	Femmine	Tutta la popolazione
1°	Prostata (19%)	Mammella (30%)	Mammella (14%)
2°	Polmone (15%)	Colon-retto (12%)	Colon-retto (13%)
3°	Colon-retto (14%)	Polmone (12%)	Polmone (11%)
4°	Vescica* (12%)	Tiroide (5%)	Prostata (10%)
5°	Stomaco (4%)	Utero corpo (5%)	Vescica* (8%)

B

Rango	Maschi	Femmine	Tutta la popolazione
1°	Polmone (27%)	Mammella (17%)	Polmone (12%)
2°	Colon-retto (11%)	Colon-retto (12%)	Colon-retto (7%)
3°	Prostata (8%)	Polmone (11%)	Mammella (4%)
4°	Fegato (7%)	Pancreas (8%)	Pancreas (4%)
5°	Stomaco (6%)	Stomaco (6%)	Fegato (4%)

Figura 1.1 A) Primi cinque tumori più frequentemente diagnosticati e proporzione sul totale dei tumori (esclusi i carcinomi della cute) per sesso nel 2019 in Italia. * Comprende sia tumori infiltranti sia non infiltranti. B) Prime cinque cause di morte oncologica e proporzione sul totale dei decessi oncologici per sesso. Pool AIRTUM 2010-2015.

La distribuzione del tumore del colon-retto è molto disomogenea e riflette l'andamento degli screening oncologici, grazie ai quali è evidente una riduzione dell'incidenza e della mortalità negli anni recenti nella fascia oggetto di screening (50-69 anni) e negli ultrasettantenni (-1,6% negli uomini e -1% nelle donne) (Siegel et al., 2020). (Figura 1.2)

Il carcinoma del colon-retto presenta complessivamente una prognosi favorevole rispetto a molti altri tumori solidi; la sopravvivenza a 5 anni è pari al 65%, senza differenze tra maschi e femmine. Presenta valori elevati tra i pazienti giovani, passando dal 69% tra 15 e 44 anni al 54% tra gli anziani (75+). La sopravvivenza dopo 10 anni dalla diagnosi risulta leggermente inferiore rispetto a quella a 5 anni, con valori pari al 64% per il colon e al 58% per il retto, omogenea tra uomini e donne. (AIOM-AIRTUM, 2019).

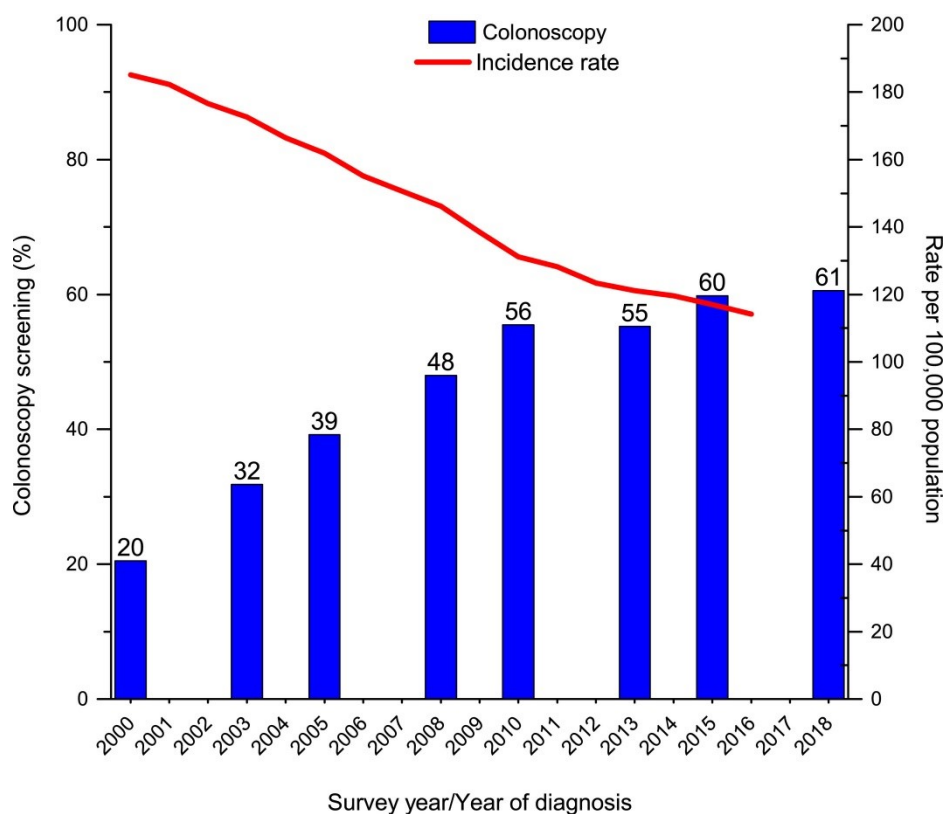


Figura 1.2. Tendenze nella prevalenza della colonscopia (dal 2000 al 2018) e nei tassi di incidenza del cancro del colon-retto (dal 2000 al 2016), adulti di età ≥ 50 anni, Stati Uniti. (Siegel et al., 2020)

1.2 Eziologia, fattori di rischio e patogenesi del CRC

L'eziologia del cancro del colon-retto è molto complessa e l'interazione tra fattori ambientali e fattori genetici gioca un ruolo importante nello sviluppo della patologia (Rawla et al., 2019).

Il cancro del colon-retto si manifesta in due forme principali: circa l'80% dei casi sono di natura sporadica che non presentano storia familiare e sono dovute a mutazioni somatiche del DNA; mentre circa il 20% è di tipo familiare, indicando la presenza di una suscettibilità genetica.

I pazienti con una storia familiare di polipi adenomatosi o CRC hanno un rischio aumentato di sviluppare un CRC: avere un parente di primo grado affetto da CRC raddoppia il rischio di sviluppare CRC rispetto alla popolazione media.

In questa categoria rientrano anche le forme ereditarie che sono dovute a mutazioni germinali identificate: le sindromi genetiche più comuni sono la sindrome da poliposi adenomatosa familiare (FAP) e la sindrome del cancro coloretale ereditario non poliposico (HNPCC), nota come sindrome di Lynch (Segelman, 2012).

1.2.1 Sindromi ereditarie

Le sindromi ereditarie rappresentano circa il 7-10% e includono la sindrome HNPCC e sindromi da poliposi le cui alterazioni genetiche sono note (Tabella 1.1) (De Rosa et al., 2015)

Syndrome	Gene	Hereditary
Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC)	MLH1, MSH2, MSH6, MLH3, MSH3 and PMS2	Dominant
Turcot Syndrome (TS)	MMR or APC	Dominant or Recessive
Familial Adenomatous Polyposis (FAP)	APC gene	Dominant
MUTYH-associated polyposis (MAP)	MUTYH	Recessive
Peutz-Jeghers syndrome (PJS)	STK11/LKB1	Dominant
PTEN hamartoma tumors syndrome (PHTS)	PTEN	Dominant
Juvenile polyposis syndrome (JPS)	SMAD4-BMPRIA	Dominant
Polymerase Proofreading-Associated Polyposis (PPAP)	POLD1-POLE	Dominant

Tabella 1.1 Geni coinvolti nelle sindromi ereditarie CRC

Sindrome di Lynch

La sindrome ereditaria più comune è il cancro coloretale ereditario non poliposico (HNPCC), nota come sindrome di Lynch, che rappresenta circa il 5% di tutti i casi.

Come la maggior parte delle sindromi CRC ereditarie, dal punto di vista genetico anche la sindrome di Lynch ha un'ereditarietà autosomica dominante. L'80% dei pazienti con sindrome di Lynch presenta mutazioni germinali dei *geni del mismatch repair (MMR)* soprattutto *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* e *hPMS2*; inoltre la maggior parte di questi tumori presenta una

instabilità dei microsatelliti. Circa il 20% ha il rischio di sviluppare CRC entro i 50 anni e circa il 50% di possibilità di svilupparlo entro i 70 anni. La condizione aumenta anche il rischio di sviluppare cancro esofageo, endometriale, dell'intestino tenue, delle ovaie e dello stomaco (Bonadonna et al., 2011). Meno dell'1% degli 800.000 americani stimati con la sindrome di Lynch conosce la loro condizione perché la diagnosi genetica viene solitamente effettuata dopo una diagnosi di cancro. Numerose organizzazioni internazionali quali *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*, *American Society for Clinical Oncology (ASCO)*, suggeriscono di testare la sindrome di Lynch in tutti i pazienti con diagnosi di CRC o tumore dell'endometrio (Gupta et al., 2019; Sepulveda et al., 2017)

Sindromi da poliposi

La poliposi adenomatosa familiare (FAP) è la seconda sindrome predisponente più frequente, sebbene rappresenti meno dell'1% di tutti i casi. I pazienti con FAP presentano migliaia di polipi adenomatosi precancerosi che crescono entro 10-12 anni. Man mano che questi adenomi crescono, la loro possibilità di cancerogenesi aumenta, al punto che quelli con FAP hanno un rischio quasi del 100% di sviluppare CRC entro i 40 anni.

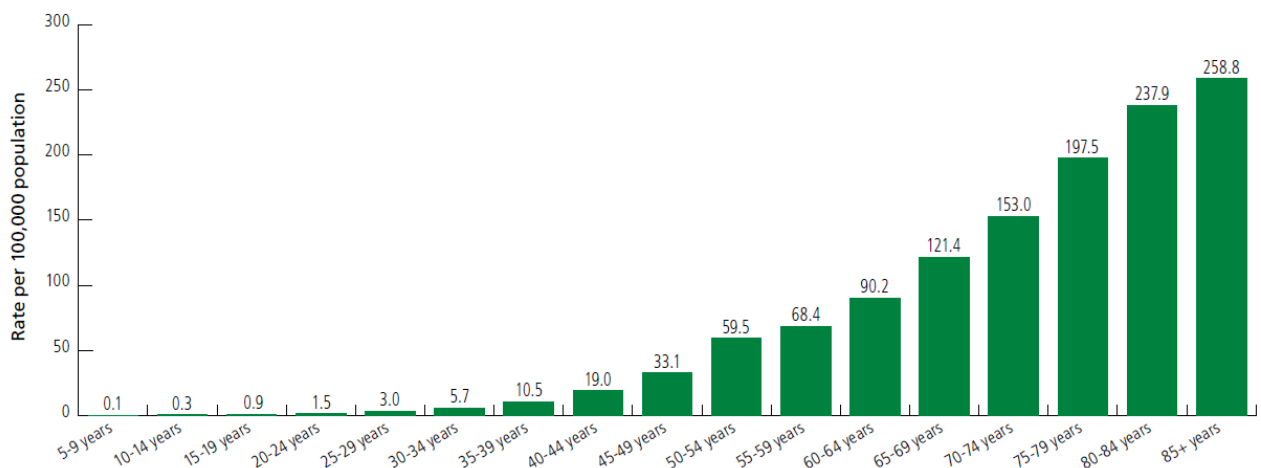
La FAP si manifesta clinicamente con diarrea e sanguinamento, ma la maggior parte dei portatori rimane asintomatica fino alla progressione cancerosa. Il gene responsabile è l'*APC (Adenomatous Polyposis Coli)*, un gene oncosoppressore le cui mutazioni si presentano anche nel 30% dei casi sporadici. (Leoz et al., 2015). La poliposi associata a *MUTYH (MAP)* è meno definita clinicamente e i malati possono sviluppare un numero inferiore di polipi rispetto alla FAP (American Cancer Society, 2020).

Altre sindromi da poliposi coloretale sono rare e poco conosciute ed includono la sindrome di Peutz-Jeghers (PJS), la sindrome da poliposi giovanile (JPS) e la sindrome da tumore dell'amartoma PTEN (PHTS); queste sindromi seguono una diversa progressione dai polipi adenomatosi in cui i cambiamenti anomali iniziano non nell'epitelio (come negli adenomi) ma nella lamina sottostante, per poi diffondersi all'epitelio.

1.2.2 Fattori di rischio

Ci sono molti fattori ambientali e riguardanti lo stile di vita che aumentano il rischio di sviluppare CRC; tra i fattori di rischio che contribuiscono all'insorgenza del cancro del colon-retto:

- **l'età**: il rischio di sviluppare CRC aumenta con l'età; per ogni fascia di età successiva a 5 anni, il tasso di incidenza raddoppia approssimativamente fino all'età di 50 anni e, successivamente, aumenta di circa il 30% (Figura 1.3). L'età media alla diagnosi di CRC è di 66 anni negli uomini e 69 anni nelle donne (American Cancer Society, 2020); il tasso di incidenza per la malattia è diminuito negli ultimi decenni tra gli over 50 grazie ai programmi di screening, ma il tasso di incidenza per gli under 50 è in aumento. A tal proposito si sta discutendo di abbassare l'età dello screening a 45 anni al fine di rilevare prima i casi in giovani adulti.



Source: Main figure: NAACCR, 2019. Inset: Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program, 2019.

©2020, American Cancer Society, Inc., Surveillance Research

Figura 1.3. Tassi di incidenza del cancro del colon-retto specifici per l'età. US, 2012-2016

- **la dieta**: alcuni studi hanno suggerito che una dieta ricca di carne rossa, grassi animali e ricca di colesterolo possa essere associata allo sviluppo di CRC; l'assunzione eccessiva di colesterolo proveniente da carni rosse aumenta la sintesi degli acidi biliari, che possono essere convertiti in sostanze cancerogene dai batteri intestinali. D'altro canto, l'assunzione di fibre, vitamine antiossidanti, acido folico, micronutrienti o fitochimici provenienti da frutta e verdura può esercitare un effetto protettivo (Zhao et al., 2017).

- ridotta attività fisica e obesità: studi hanno rilevato che coloro che sono regolarmente attivi fisicamente hanno una probabilità inferiore del 25% di sviluppare CRC mentre coloro che sono più sedentari hanno fino al 50% di rischio in più di sviluppare CRC. L'inattività fisica di solito provoca l'obesità, e l'eccesso di peso può anche interrompere i processi metabolici, portando a un maggiore rilascio di radicali liberi mutageni dell'ossigeno: l'obesità, di fatto, rappresenta un fattore di rischio diretto di sviluppare CRC. (Robsahm et al., 2013)
- fumo e alcool: un consumo eccessivo di alcool è associato con un aumento del rischio di CRC (Bagnardi et al., 2015); il fumo di sigaretta può favorire la comparsa della malattia in seguito ad una prolungata esposizione a causa degli idrocarburi policiclici aromatici che probabilmente promuovono mutazioni cancerogene (Limsul et al., 2010).

1.2.3 CRC sporadici e patogenesi

Le forme sporadiche sono dovute ad alterazioni somatiche del DNA sia genetiche che epigenetiche. Le mutazioni che si verificano sono importanti sia dal punto di vista patogenetico che prognostico-predittivo per la risposta a target terapeutici.

Nel 1990, Fearon e Vogelstein furono i primi a descrivere un modello genetico per la tumorigenesi del colon-retto, secondo un modello in cui alcune mutazioni geniche rendevano attivi alcuni oncogeni ed eliminavano la funzione di alcuni oncosoppressori nella cosiddetta “sequenza adenomacarcinoma” (Figura 1.4), che può richiedere diversi anni per lo sviluppo del cancro (Fearon, Vogelstein, 1990). Tra le mutazioni più costanti compariva quella di *APC*, il gene implicato nella poliposi familiare, presente in tutte le fasi della sequenza ed anche in piccoli adenomi, il che ne suggeriva un ruolo precoce.

Nella cancerogenesi del colon si distinguono tre principali pathways di trasformazione: la via dell'*instabilità cromosomica*, la via dell'*instabilità dei microsatelliti* e via dell'*ipermetilazione* di alcune zone del DNA.

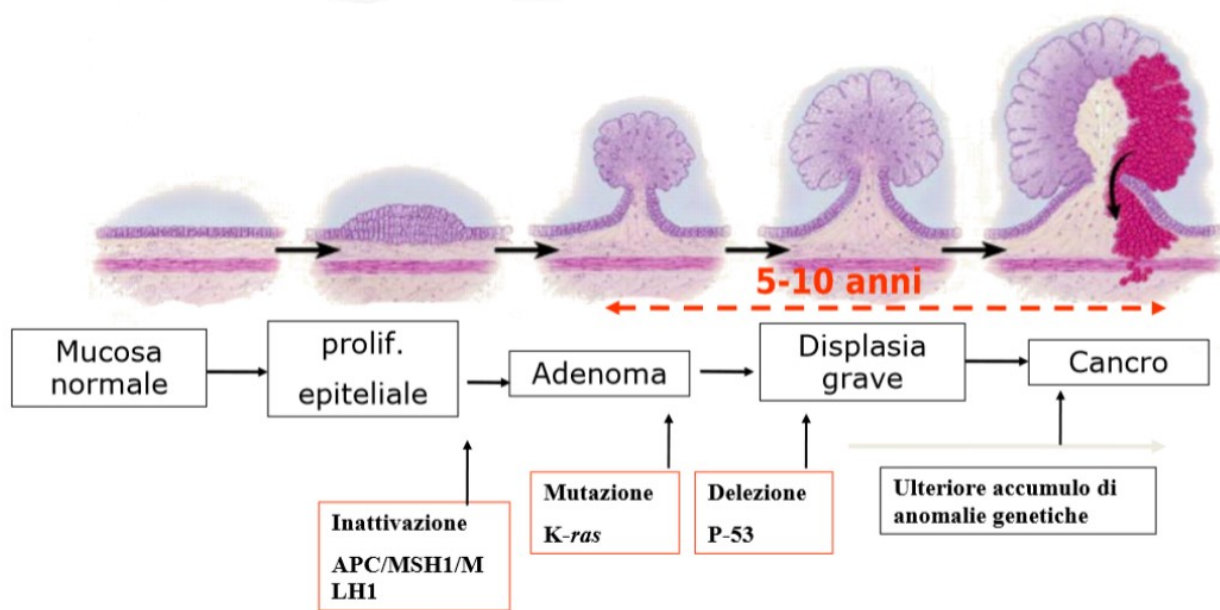


Figura 1.4 Sequenza adenoma-carcinoma nel tumore del colon retto. L'alterazione genica distintiva di questa neoplasia è responsabile dei cambiamenti nella struttura morfologica della mucosa intestinale.

Via dell'instabilità cromosomica (CIN)

La via CIN è la via patogenetica più comune e si verifica in circa l'80% di tutti i casi CRC sporadici; è caratterizzata da instabilità cromosomica, con modifiche nel numero e nella struttura dei cromosomi, incluse delezioni, guadagni e traslocazioni; è associata all'accumulo di mutazioni nei geni oncosoppressori e oncogeni, come *APC*, *TP53*, *SMAD2*, *SMAD4*, *DCC*, *KRAS*, *PIK3ca*.

Il primo evento è rappresentato dall'iper-attivazione della via WNT dovuta a mutazioni nel gene Adenomatous Polyposis Coli *APC*, che causano la sintesi in forma trunca della proteina APC; l'APC è un importante regolatore negativo della via WNT, che modula i livelli citoplasmatici della β -catenina: quando la proteina APC si trova nel citoplasma forma un complesso enzimatico con axina e GSK-3B che fosforila la β -catenina, la quale viene ubiquitinata e degradata dai proteasomi. A causa della mutazione del gene *APC*, si ha un accumulo della β -catenina nel citoplasma che trasloca nel nucleo, e si lega a vari fattori trascrizionali, come TCF/LEF e attiva la trascrizione di diversi geni coinvolti nella proliferazione cellulare (cMyc e ciclina D). (Figura 1.5).

Questa fase è seguita da ulteriori mutazioni, tra cui mutazioni attivanti dell'oncogene *KRAS* che fa parte della famiglia delle proteine RAS con attività GTP-asica. *KRAS* è una proteina di

membrana a valle del recettore EGFR che, se attivata, è responsabile della differenziazione e proliferazione cellulare.

La proliferazione cellulare incontrollata contribuisce alla formazione di un polipo adenomatoso; la transizione dall'adenoma al carcinoma invasivo è solitamente associata alla mutazione e/o alla perdita del gene oncosoppressore tumorale TP53 e di SMAD2-4. (Bienz et al., 2000; Pino et al., 2010).

I tumori CIN sono spesso aneuploidi o poliploidi, altamente differenziati e presentano una prognosi sfavorevole.

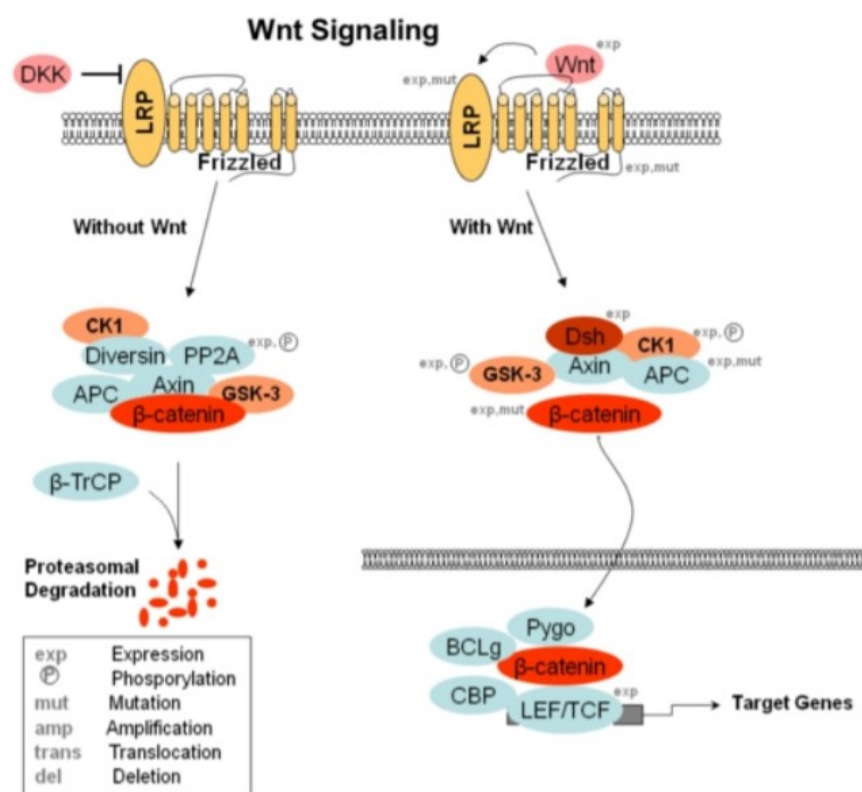


Figura 1.5 WNT-pathway. In presenza di Wnt, la β -catenina va nel nucleo ed il complesso β catenina-TCF avvia la trascrizione di MYC, ciclina D1, MDR1, e altri geni target coinvolti nella proliferazione cellulare. In assenza di Wnt, β -catenina rimane nel citoplasma e viene degradata mediante il complesso APC-axin. Mutazioni di APC causano l'accumulo della β -catenina la traslocazione al nucleo di β catenina anche in assenza di Wnt.

Via dell'instabilità dei microsatelliti (MSI)

La via MSI si verifica in circa il 15% dei tumori CRC sporadici e nel 95% di tutti i casi di sindrome di Lynch; in questo caso, il CRC è principalmente causato da mutazioni nei geni del sistema del *mismatch repair* (MMR) che codificano per proteine necessarie all'identificazione, escissione e riparazione degli errori che si verificano durante la replicazione del DNA. Il sistema del MMR

è formato da 5 geni: *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* e *MSH6*; le mutazioni più frequenti riguardano *MSH2* e *MLH1*.

I pazienti affetti da sindrome di Lynch ereditano un allele mutato e nel momento in cui si ha la perdita del secondo allele dovuta ad una mutazione o un evento epigenetico, si instaura un'instabilità dei microsatelliti (MSI). In condizioni fisiologiche, i microsatelliti sono delle brevi sequenze ripetute di DNA non codificante (1-6 bp) presenti sul 3% dell'intero genoma e sono più soggette a errore nel corso della replicazione del DNA.

Queste sequenze ripetitive sono presenti anche all'interno di oncogeni come *APC*, *BAX*, *TGF- β II*; un difetto del MMR porta ad un enorme accumulo di mutazioni somatiche in questi geni durante la replicazione innescando la cancerogenesi.

Nei tumori MSI sono frequenti mutazioni in geni come *B-catenina*, *BRAF*, *EGFR*, *Bax*, e il silenziamento del gene *MLH1* dovuto all'ipermetilazione di CpG.

I tumori MSI sono scarsamente differenziati con fenotipo diploide e sono associati ad una prognosi più favorevole. I tumori MSI sono classificati come MSI-High, MSI-Low e MSS secondo il pannello Bethesda, in base alla percentuale dei loci mutati (Figura 1.6). I tumori MSI-L hanno le stesse caratteristiche clinico-patologiche dei tumori MSS e sono associati ad una prognosi più sfavorevole rispetto ai tumori MSI-H. (Soreide et al., 2006).

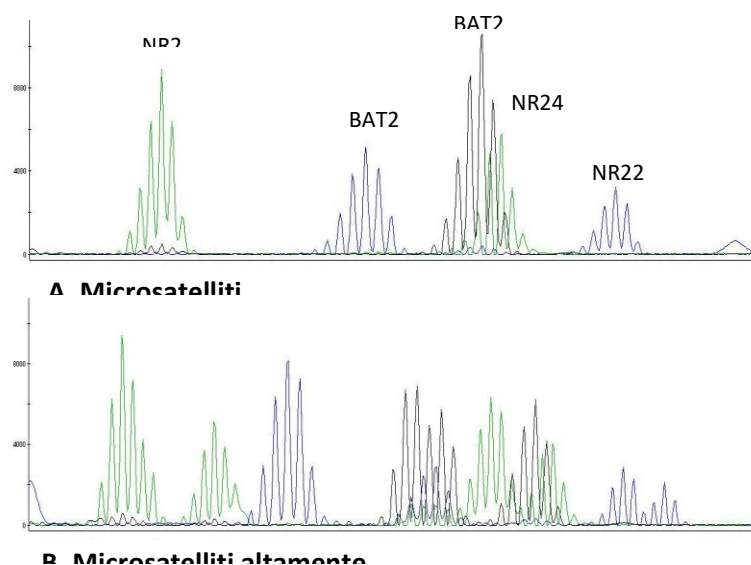


Figura 1.6. Loci analizzati con pannello Hamelin. In blu sono rappresentati i loci BAT26 (124 bp) e NR 22 (142 bp), in nero il BAT25 (120 bp) e in verde NR 21 (103 bp) e NR 24 (132 bp).

Via del fenotipo del metilatore dell'isola CpG (CIMP)

Le isole CpG (Citosina-P=fosforo-Guanina), sono presenti in modo significativo nei promotori di alcuni geni e l'ipermetilazione di queste isole causa il silenziamento dei relativi geni.

La via CIMP è caratterizzata da un aumento della metilazione dell'isola CpG che induce instabilità epigenetica con conseguente silenziamento di una serie di geni tra cui *MLH1*, uno dei geni del *mismatch repair*. I tumori ampiamente ipermetilati sono classificati come CIMP-high e sono MSI, presentano un'alta frequenza di mutazioni *KRAS* e scarsa differenziazione; i CIMP-H sono associati a metastasi linfonodali ed epatiche e prognosi infausta probabilmente a causa della presenza delle mutazioni in *KRAS*.

1.3 Anatomia Patologica (WHO, 2019)

La valutazione anatomopatologica dell'esito della chirurgia di CRC è importante per la definizione della prognosi e la programmazione del trattamento dei pazienti.

La classificazione istologica dei tumori CRC si basa sulla classificazione WHO, la più aggiornata al 2019.

Si possono distinguere 4 forme macroscopiche:

- forma vegetante: si presenta come una neoformazione polipoide che protrude nel lume intestinale, a superficie e margini irregolari;
- forma ulcerata: si presenta con margini sollevati e irregolari; può essere circolare od ovoidale;
- forma infiltrante: composta da ulcerazione centrale con margini rilevati ed estesi e diffuso ispessimento della parete; spesso risulta l'evoluzione di una forma vegetante o ulcerata;
- forma anulare o stenosante: estesa per tutta la circonferenza intestinale determinando restringimento del lume; ha superficie irregolare e tendenza ulcerativa.

La WHO suggerisce la suddivisione microscopica dei tumori coloretali in epiteliali, carcinoidi (argentaaffini o non), tumori non epiteliali (leiomiosarcomi), tumori del sistema ematopoietico e forme non classificabili.

Per quanto riguarda i tumori epiteliali distinguiamo:

- Adenocarcinoma, simile all'adenoma è composto da tumori ben differenziati simili all'adenoma villosa nella porzione invasiva, che mostrano un confine spinto e una desmoplasia minima;
- Adenocarcinoma mucinoso, caratterizzato dalla presenza di abbondante muco extracellulare che costituisce oltre il 50 % della lesione;
- Adenocarcinoma a cellule ad anello a castone, costituito per oltre il 50% da cellule con vacuolo citoplasmatico contenente mucina e nucleo periferico;
- Adenocarcinoma serrato, caratterizzato da ghiandole neoplastiche con dentellature epiteliali prominenti, basso rapporto nucleo-citoplasma, citoplasma eosinofilo e abbondante e nuclei vescicolari;
- Adenocarcinoma micropapillare, caratterizzato da piccoli cluster di cellule tumorali circondati da spazi vuoti; ha un alto rischio di metastasi linfonodali ed è spesso accompagnato da fattori prognostici sfavorevoli come l'invasione linfatica e vascolare;
- Carcinoma a cellule squamose, con aspetti morfologici di tipo squamoso;
- Carcinoma adenosquamoso, costituito da aree di tipo ghiandolare miste ad aspetti squamosi;
- Carcinoma a piccole cellule, con caratteristiche morfologiche simili a quelle del carcinoma a piccole cellule polmonare;
- Carcinoma midollare, le cellule tumorali del carcinoma midollare di solito mostrano un abbondante citoplasma eosinofilo, nuclei vescicolari e nucleoli prominenti; è caratterizzato dalla presenza di numerosi linfociti intraepiteliali.
- Carcinoma indifferenziato, diagnosticato quando il tumore epiteliale manca di prove morfologiche, immunoistochimiche e molecolari di differenziazione specifica
- Carcinoma a cellule fusate

Un altro aspetto anatomo-patologico da considerare è il grado di differenziazione dei tumori. La differenziazione cellulare è determinata dalla presenza o assenza di alcuni parametri quali la conservazione della polarità del nucleo, la presenza di formazioni tubulo-ghiandolari, l'infiltrazione infiammatoria, il pattern di crescita.

Il grado di differenziazione si applica solo all'adenocarcinoma, essendo le altre varianti morfologiche associate ad una prognosi propria, è raccomandata la classificazione in basso grado (ben e moderatamente differenziato) ed alto grado (scarsamente differenziato,

indifferenziato). I tumori ad alto grado sono associati ad una prognosi più sfavorevole. (Kim et al., 2020)

Altri parametri utili nella caratterizzazione dei CRC, sono il tipo di crescita, se espansiva o infiltrativa, l'invasione linfovaskolare, il grado di infiltrazione linfocitaria al margine di invasione e il numero di linfociti che infiltrano le cellule neoplastiche (*TILs, tumor infiltrating lymphocytes*).

1.4 Diagnosi e stadiazione

Una diagnosi appropriata e una corretta stadiazione è fondamentale per garantire una corretta strategia di trattamento.

Una neoplasia CRC può essere sospettata per alcuni sintomi quali ostruzione intestinale, peritonite e talvolta emorragia intestinale; il paziente con un CRC precoce nella maggior parte dei casi è del tutto asintomatico, il sospetto può insorgere se il paziente esegue una ricerca del sangue occulto delle feci con risultato positivo.

La colonscopia completa fino al cieco, accoppiata con biopsia di una lesione sospetta, è considerato il gold standard per la diagnosi delle lesioni del colon-retto: questa procedura consente di localizzare il tumore e rappresenta un esame preventivo in quanto consente di asportare polipi, rappresentando così un'opportunità sia diagnostica che terapeutica; i risultati migliori si ottengono per lesioni >6mm.

La conferma diagnostica è data dall'esame istologico eseguito su biopsia, o sul polipo resecato. Talvolta la colonscopia non è sufficiente, soprattutto in presenza di lesioni che impediscono il passaggio dell'endoscopio, ed è necessario eseguire una RX con clisma opaco o colonscopia virtuale: questa consiste nell'ottenere immagini tomografiche dopo l'insufflazione del colon con anidride carbonica e la loro ricostruzione in 2D o 3D, con sensibilità simile ad una colonscopia; alternativamente si esegue una TAC addominale e pelvica per contribuire alla diagnosi di CRC (De Rosa et al., 2015).

Dopo la diagnosi bisogna stabilirne lo stadio per pianificare le scelte terapeutiche.

Il CRC è classificato in base al sistema di stadiazione TNM che utilizza tre parametri: T, dimensione del tumore primitivo e invasione dei tessuti circostanti; N, coinvolgimento dei linfonodi regionali adiacenti al tumore; M, presenza di metastasi a distanza (Tabella 1.2).

Tumore primitivo (T)

- Tx = Tumore primitivo indefinito
- T0 = Non evidenza di tumore primitivo
- Tis = Carcinoma in situ
- T1 = Tumore invade mucosa e sottomucosa
- T2 = Tumore non esteso oltre la muscolare propria
- T3 = Tumore che si estende oltre la muscolare propria:
 - pT3a = minima invasione (<1mm oltre la muscolare propria)
 - pT3b = invasione (>5 mm oltre la muscolare propria)
 - pT3c = invasione moderata (da 5 a 15 mm oltre la muscolare propria)
 - pT3d = invasione estesa (>15 mm oltre la muscolare propria)
- T4 = Tumore che infiltra il peritoneo viscerale o strutture od organi adiacenti

Linfonodi regionali (N)

- Nx = Linfonodi indefiniti
- N0 = Assenza di metastasi linfonodali
- N1 = Presenza di 1-3 metastasi linfonodali
- N2 = Presenza di 4 o più metastasi linfonodali

Metastasi a distanza (M)

- Mx = Metastasi non definibili
- M0 = Assenza metastasi a distanza
- M1a = Presenza di metastasi a distanza in un organo
- M1b = Presenza di metastasi a distanza in più di un organo

Tabella 1.2 Classificazione TNM-AJCC del CRC

Sulla base della stadiazione TNM sono stati stabiliti quattro stadi clinici da I a IV (Tabella 1.3):

- Stadio I: il carcinoma è circoscritto alla parte più superficiale della parete dell'intestino verso il lume;
- Stadio II: il carcinoma è diffuso nello spessore della parete dell'intestino, ma i linfonodi vicini non sono infiltrati dal tumore;
- Stadio III: il carcinoma ha coinvolto anche uno o più linfonodi localizzati vicino all'intestino;
- Stadio IV: il carcinoma è diffuso anche ad altri organi con metastasi.

TNM Stadio clinico	TNM classificazione
Stadio 0	Tis, N0, M0
Stadio I	T1-2, N0, M0
Stadio IIA	T3, N0, M0
Stadio IIB	T4, N0, M0
Stadio IIIA	T1-2, N1, M0
Stadio IIIB	T3-4, N1, M0
Stadio IIIC	Ogni T, N2, M0
Stadio IV	Ogni T, ogni N, M1

Tabella 1.3 Stadiazione clinica sulla base dei criteri TNM

Il sistema di stadiazione basato su TNM fornisce informazioni prognostiche e guida la decisione terapeutica.

La prognosi varia a seconda dello stadio della malattia alla diagnosi (Tabella 1.4) (AIOM, 2019)

Stadio	Sopravvivenza a 5 anni
I	> 90 %
IIA	80-85 %
IIB	70-80 %
IIIA	65-80 %
IIIB	50-65 %
IIIC	25-50 %
IV	5-8 %

Tabella 1.4 Percentuale di sopravvivenza a 5 anni in correlazione con lo stadio di malattia

Le indagini strumentali più utilizzate per la stadiazione del CRC sono TC torace/addome/pelvi e risonanza magnetica (RMN). La TC ha una sensibilità dell'80% e una specificità del 95% nella rilevazione di metastasi epatiche; la RMN valuta lesioni epatiche di dimensioni <1cm con una sensibilità dell'85% e una specificità del 95%; la RMN rappresenta lo strumento più accurato per identificare la malattia linfonodale con una sensibilità dell'85% e una specificità del 97%. (De Rosa et al., 2015).

Infine la PET (Positron Emission Tomography) con 18fluoro-2-desossi-D-glucosio, non è attualmente indicata tra gli esami radiologici di stadiazione ma può essere utile per identificare eventuali sedi extraepatiche secondarie di malattia.

1.4.1 Modalità di diffusione

Il CRC può diffondersi localmente per continuità mediante infiltrazione neoplastica nella parete intestinale con estensione lungo la parete dell'organo, e per contiguità mediante infiltrazione di organi circostanti con possibili fistole in stomaco, vagina e vescica.

Il CRC può dare metastasi a distanza dalla sede di origine per via linfatica dove sono coinvolti maggiormente i linfonodi peri e paracolici (33-62% dei pazienti alla diagnosi) o per via ematica, mediante il circolo portale e sistemico; le sedi maggiormente colpite dalla metastatizzazione a distanza sono il fegato, i polmoni, le ossa e l'encefalo. (Cunningham et al., 2010).

Il 25-30% dei pazienti alla diagnosi presenta metastasi epatiche e/o polmonare (mCRC).

1.5 Strategie terapeutiche

I protocolli di trattamento vengono stabiliti in base allo stadio della malattia e, in particolare, variano a seconda che si tratti di malattia localizzata, quindi negli stadi I, II e III, o di malattia metastatica, cioè stadio IV.

1.5.1 Malattia localizzata

La chirurgia è il trattamento principale per i pazienti con CRC potenzialmente curabile; per essere curativa, la chirurgia per il CRC prevede la rimozione del tumore primario con adeguati margini di resezione, la linfadenectomia regionale e il ripristino della continuità del tratto gastrointestinale.

La chemioterapia può essere somministrata prima o dopo l'intervento: se somministrata prima si definisce *neoadiuvante* ed ha lo scopo di ridurre le dimensioni del tumore e facilitarne l'asportazione con la chirurgia. La chemioterapia effettuata dopo l'intervento si definisce *adiuvante* e ha lo scopo di eliminare le micrometastasi e quindi ridurre il rischio di recidiva.

L'indicazione alla terapia adiuvante varia in base allo stadio della malattia.

I pazienti allo stadio I non sono candidati a ricevere trattamento in seguito alla rimozione chirurgica del tumore, ma sono sottoposti solo al follow-up.

Per i pazienti allo stadio II la strategia è dibattuta, e il trattamento adiuvante a base di fluoropirimidine e oxaliplatino può essere preso in considerazione nei pazienti che presentano fattori prognostici sfavorevoli con maggior rischio di recidiva: presenza di invasione vascolare e linfatica, occlusione, inadeguato numero di linfonodi analizzati.

I pazienti in stadio III sono candidati a ricevere chemioterapia adiuvante che ha dimostrato una riduzione del rischio relativo di morte del 33%. Diversi studi randomizzati hanno dimostrato che la chemioterapia adiuvante standard prevede una combinazione di oxaliplatino e fluoropirimidina per 6 mesi e deve essere iniziata entro 6-8 settimane dall'intervento. (AIOM, 2019).

Difatti, nel corso degli anni, diversi studi hanno dimostrato che la somministrazione di 5-fluorouracile (5-FU) in combinazione con acido folinico (leucovorin, Lv) e oxaliplatino (FOLFOX-4) aumenta la sopravvivenza libera da malattia (PFS) a 3 e 5 anni e di sopravvivenza globale (OS) a 6 e 10 anni, e riduce il rischio di recidiva del 20% (Andr  et al., 2009).

I dati dello studio XELOXA mostrano un beneficio anche per la combinazione di capecitabina ed oxaliplatino (XELOX) (Schmoll et al., 2015).

Queste evidenze orientano verso l'impiego del trattamento con FOLFOX-4 o XELOX come terapia di prima scelta.

Nella pratica clinica tutti i pazienti che devono effettuare 5-FU o capecitabina sono sottoposti all'analisi mutazionale del gene *DPYD*, che codifica per l'enzima *diidropirimidina deidrogenasi*: le varianti *c.IVS14+1G>A* e *c.2846>T* sono associate a tossicit  di grado severo nei pazienti trattati con fluoropirimidine. Questi polimorfismi hanno un'incidenza di 1 caso su 3000 pazienti e rappresentano un criterio di esclusione per il trattamento con fluoropirimidine. (AIOM, 2019).

1.5.2 Malattia metastatica: mCRC

Circa il 30% dei pazienti viene diagnosticato con carcinoma coloretale metastatico (mCRC) allo stadio IV al momento della visita iniziale. Circa il 35% dei pazienti con diagnosi di CRC allo stadio II o III,andr  incontro a malattia metastatica.

Lo stadio IV ha una prognosi infausta: il tasso di sopravvivenza a 5 anni   <10% ed il tempo di sopravvivenza mediano dei pazienti trattati con una terapia di supporto ottimale senza alcuna chemioterapia   di circa 5 mesi.

La strategia ottimale di trattamento per i pazienti con CRC metastatico (mCRC) dovrebbe essere discusso in un team multidisciplinare. Ad oggi le strategie comprendono in primo luogo la chemioterapia sistemica, ma possono contribuire anche la radioterapia e la chirurgia.

Sono stati compiuti progressi significativi nel trattamento del mCRC mediante regimi di combinazione costituiti da agenti chemioterapici standard. Il 5-FU per infusione con leucovorin è comunemente usato con oxaliplatino (FOLFOX) e irinotecan (FOLFIRI). L'aggiunta di irinotecan, oxaliplatino e agenti mirati al 5-FU ha aumentato la sopravvivenza globale da 12 mesi a > 20 mesi (Cunningham et al., 2010).

Nella pratica clinica tutti i pazienti che devono effettuare irinotecano sono sottoposti all'analisi mutazionale del gene *UGT1A1*, che codifica per l'uridina-glucuronosil-transferasi coinvolto nel metabolismo epatico del SN-38, metabolita attivo dell'irinotecano: la variante allelica *UGT1A1*28* è associata a tossicità ematologica e diarrea, ma il rischio è dose dipendente. Una riduzione di dosi è raccomandata nei soggetti omozigoti per questa variante (AIOM, 2019).

Negli ultimi anni diversi studi si sono concentrati sulla combinazione di chemioterapia convenzionale con anticorpi monoclonali: sono stati approvati negli Stati Uniti e in Europa due anticorpi monoclonali anti-EGFR, *cetuximab* e *panitumumab*, e l'anticorpo anti-VEGF, *bevacizumab*.

1.5.2.1 Farmaci molecolari

Negli ultimi anni lo studio dei meccanismi molecolari alla base della trasformazione e progressione tumorale hanno permesso di mettere a punto farmaci a bersaglio molecolare.

Nel trattamento dei pazienti con mCRC vengono utilizzate principalmente due classi di anticorpi monoclonali: anticorpi antiangiogenetici, come *bevacizumab*, e anticorpi anti-EGFR, quali *cetuximab* e *panitumumab*.

Bevacizumab è un anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato capace di inibire tutte le isoforme di VEGF-A sequestrando tale fattore solubile dal circolo, mediante la formazione di aggregati *bevacizumab*/VEGF-A (Figura 1.7). Vari studi dimostrano un vantaggio significativo dell'associazione *bevacizumab* con regimi contenenti oxaliplatino. Nello studio condotto da Kabbinavar, 209 pazienti con mCRC sono stati randomizzati a ricevere 5FU/LV più o meno *bevacizumab* in prima linea: la sopravvivenza mediana è stata di 16.6 mesi per il gruppo 5FU/LV + *bevacizumab* e 12.9 mesi per il gruppo 5FU/LV + placebo, e la PFS mediana è stata di 9.2 mesi vs 5.5 mesi. (Kabbinavar et al., 2005)

Successivamente lo studio di fase III AVEX ha dimostrato l'efficacia dell'associazione di *bevacizumab* e capecitabina in pazienti anziani o non candidati al trattamento con doppietta:

la PFS mediana è stata di 9.1 vs 5.1 mesi rispetto alla sola capecitabina, con tossicità simili. (Cunningham et al., 2013).

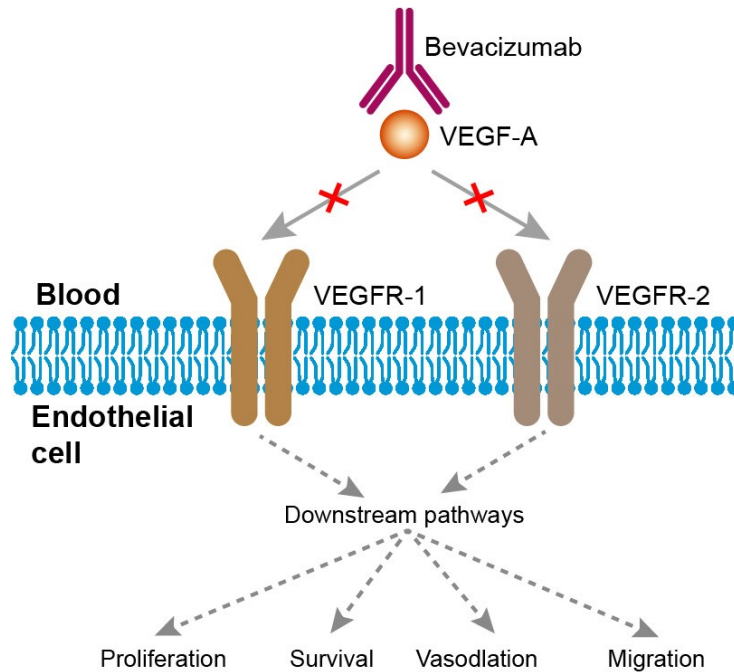


Figura 1.7 Meccanismo d'azione del farmaco Bevacizumab.

Cetuximab è un anticorpo monoclonale chimerico murino-umano che si lega all'EGFR impedendo la cascata di segnalazione a valle del recettore.

Panitumumab è un anticorpo monoclonale umanizzato che lega il dominio extracellulare del recettore EGFR. (Figura 1.8).

Nello studio di fase II BOND, è stato confrontato l'impiego di *cetuximab* + irinotecan e *cetuximab* in monoterapia ed è stato dimostrato che l'associazione di *cetuximab* + irinotecan migliora il tasso di risposta (RR) e la PFS nei pazienti con mCRC refrattari alla monoterapia con irinotecan (Cunningham et al., 2004).

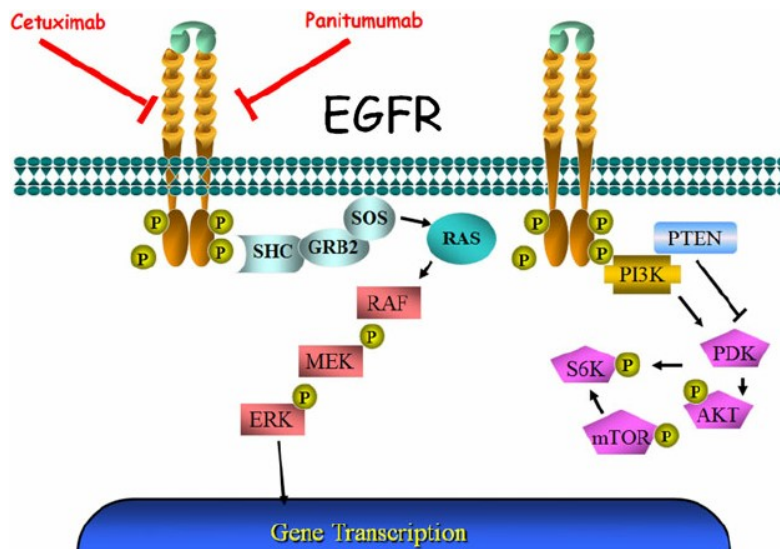


Figura 1.8. Meccanismo d'azione dei farmaci anti-EGFR cetuximab e panitumumab.

Il valore dell'aggiunta di anticorpi anti-EGFR alla chemioterapia a base di oxaliplatino è stato esaminato in tre studi cardine: OPUS, COIN, e PRIME, dove analisi retrospettive dei sottogruppi hanno evidenziato come il beneficio dell'utilizzo di anticorpi anti-EGFR è evidente solo in una popolazione molecularmente selezionata: la terapia a base di anti-EGFR determina un aumento significativo della PFS e della OS nei pazienti che non hanno mutazioni di RAS, mentre nessun beneficio è osservato nei pazienti con mutazioni di RAS.

In particolare, lo studio PRIME mostra come la somministrazione di *panitumumab* con fluorouracile ed oxaliplatino migliora in modo significativo la sopravvivenza libera da progressione (9.6 vs 8 mesi) e la sopravvivenza globale (23.9 vs 19.7) nei pazienti con tumori *KRAS* wild-type. (Tabella 1.5).

Il gene *KRAS* codifica per una GTPasi a valle della via di trasduzione del segnale di EGFR e, quando mutato, determina un'attivazione costitutiva del pathway rendendo inefficace l'inibizione di EGFR ad opera dell'anticorpo. Quindi, la presenza di mutazioni somatiche nei geni *KRAS* e *NRAS* è un meccanismo di resistenza agli anticorpi monoclonali anti-EGFR. (Douillard et al., 2013; Van Cutsem et al., 2011).

L'utilizzo dei farmaci anti-EGFR nel trattamento dei pazienti con mCRC non può prescindere da un'analisi molecolare estesa del gene RAS; di conseguenza, l'indicazione all'utilizzo di questi farmaci è ristretta ai pazienti *KRAS* e *NRAS* wild-type (AIOM, 2019).

STUDIO	KRAS n (%)	KRAS WT	KRAS MUT	Trattamento (ctrl vs mAB)	ORR wKRAS	ORR mKRAS	PFS wKRAS	PFS mKRAS	OS wKRAS	OS mKRAS
COIN	1305 (80%)	724 (56%)	561 (43%)	FOLFOX+ CAPEOX vs <i>cetuximab</i> /OX	50% vs 59%	41% vs 40%	8,6 vs 8,6	6,9 vs 6,5	17,9 vs 17,0	14,8 vs 13,6
PRIME	1096 (93%)	656 (60%)	656 (60%)	FOLFOX vs <i>Panitumumab</i> +FOLFOX	48% vs 55%	40% vs 40%	8,0 vs 9,6	8,8 vs 7,3	19,7 vs 23,9	19,3 vs 15,5
OPUS	315 (93%)	179 (57%)	136 (43%)	FOLFOX vs <i>cetuximab</i> + FOLFOX	34% vs 57,3%,	52,5% vs 32,8%	7,2 vs 8,3	8,5 vs 5,5	18,5 vs 22,8	17,5 vs 13,4

Tabella 1.5 Analisi retrospettive che hanno dimostrato lo stato mutazionale di *KRAS* come marker predittivo per l'utilizzo di anticorpi monoclonali anti- EGFR.

ORR: tasso di risposta. PFS: sopravvivenza libera da progressione (mesi). OS: sopravvivenza globale (mesi) . mAB=anticorpo monoclonale. FOLFIRI=fluorouracil + irinotecan. FOLFOX=fluorouracile + oxaliplatino. CAPEOX=capecitabine+ oxaliplatin. HR=hazard ratio. OX=oxaliplatin-based chemotherapy. (Cunningham et al., 2010)

1.5.3 Terapia di mantenimento

Negli studi clinici, l'utilizzo della doppietta chemioterapica in combinazione o meno all'agente biologico, è programmata fino alla progressione della malattia o all'avvento di effetti tossici inaccettabili: un effetto negativo è causato dalla neurotossicità cumulativa correlata all'utilizzo di oxaliplatino (Diaz-Rubio et al., 2012). Ciò ha aperto la strada a strategie di mantenimento o intermittenti nei pazienti che raggiungono il controllo della malattia dopo la prima linea; studi indicano che, diminuendo l'intensità della chemioterapia durante il mantenimento, si riduce significativamente il carico di tossicità senza compromettere la OS. Ad esempio, nello studio OPTIMOX1, 620 pazienti con mCRC non resecabile sono stati randomizzati a ricevere FOLFOX4 fino a progressione rispetto ad una strategia intermittente che comprendeva 6 cicli di FOLFOX seguito da infusione di 5-FU/leucovorin di mantenimento per un massimo di 12 cicli. Non è stata osservata alcuna differenza significativa nella PFS mediana (9,0 vs 8,7 mesi), OS mediana (19,3 vs. 21,2 mesi) o RR (58,5% vs. 59,2%) tra i bracci di trattamento, con un profilo di tossicità favorevole per il braccio intermittente (Tournigand et al., 2006).

Attualmente, la migliore strategia di mantenimento è stata raggiunta con *bevacizumab*: secondo le linee guida AIOM, dopo un trattamento di prima linea di 4-6 mesi con *bevacizumab*

e chemioterapia, la terapia di mantenimento con *bevacizumab* e fluoropirimidina è considerata ottimale. (Diaz et al., 2012; Chibaudel et al., 2009).

Anche *Regorafenib*, un piccolo inibitore delle chinasi, è stato identificato come un potenziale candidato per la monoterapia di mantenimento (Aprile et al., 2013).

L'utilizzo di anti-EGFR (*cetuximab* o *panitumumab*) aggiunto alla doppietta chemioterapica è al momento raccomandato come opzione di trattamento di prima linea per i pazienti mCRC. Esistono scarse evidenze sulla strategia di mantenimento con i farmaci anti-EGFR, come *panitumumab*, in pazienti che ottengono un iniziale controllo di malattia dopo induzione con una chemioterapia standard associata al farmaco biologico.

Inoltre, a causa del probabile sviluppo di resistenza dopo la somministrazione degli anti-EGFR, non sono farmaci candidati alla terapia di mantenimento.

Per quanto riguarda le linee successive, la scelta della strategia terapeutica in seconda linea e oltre, è fortemente influenzata dai farmaci utilizzati in prima linea.

Per quanto concerne i farmaci citotossici, nella pratica clinica si ricorre al cosiddetto “switch della chemioterapia”, cioè si passa da una doppietta a base di oxaliplatino a una doppietta a base di irinotecano o viceversa; per i farmaci biologici la scelta è data dal tipo di farmaco a target molecolare utilizzato in prima linea e dallo stato mutazionale di RAS (Schmoll et al., 2012).

1.6 Biomarcatori molecolari prognostici e predittivi

Un biomarcatore prognostico fornisce informazioni sulla storia naturale della patologia di un particolare paziente, indipendentemente dal trattamento; può essere usato per selezionare i malati che potrebbero avere risultati clinici interessanti o progredire rapidamente.

Un biomarcatore predittivo (o di risposta) distingue i pazienti sulla base della loro probabilità di risposta a un particolare trattamento rispetto a nessun trattamento; può essere utilizzato per identificare una sottopopolazione che potrebbe avere una risposta specifica a una terapia (favorevole o sfavorevole).

Il biomarcatore più importante per mCRC è *RAS*, il cui stato mutazionale è predittivo della risposta ad anti-EGFR; altri biomarcatori rilevanti per le scelte terapeutiche nei pazienti mCRC sono *BRAF*, instabilità dei microsatelliti (MSI), amplificazioni *HER2* e fusioni *NTRK*. Anche la

perdita dell'attivazione di *PTEN* o *PIK3ca* potrebbero contribuire alla resistenza degli anticorpi monoclonali anti-EGFR. (Bardelli et al., 2010).

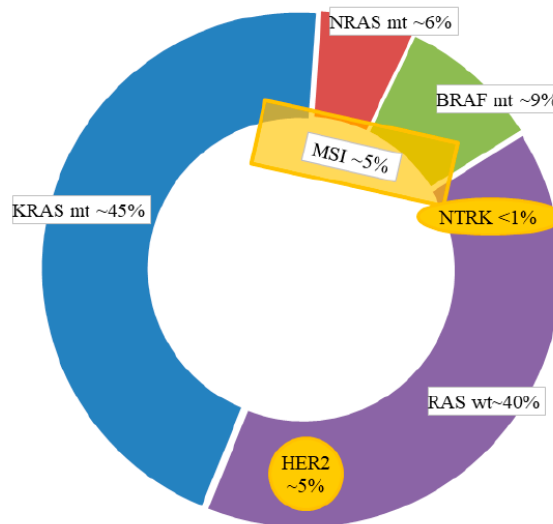


Figura 1.9 Target molecolari per il cancro colon-retto metastatico. (Cohen et al., 2020)

1.6.1 RAS

Le proteine Ras sono delle GTPasi coinvolte nei pathway di trasduzione del segnale intracellulare, tra cui quello attivato da EGFR. Quando una molecola segnale si lega al recettore EGFR, questo va incontro a dimerizzazione e ad attivazione della sua attività chinasi; le tirosine fosforilate del recettore sono riconosciute dal dominio SH2 di una proteina adattatrice GRB2 che, a sua volta, recluta a livello della membrana una proteina GEF (guanin nucleotide exchange factor) tramite un dominio SH3. Infine, GEF interagendo con RAS e stimolando lo scambio GDP/GTP ne modifica la conformazione rendendola capace di interagire con i suoi effettori, determinando così l'attivazione di numerosi pathways a valle. Tra gli effettori principali di RAS c'è la proteina RAF, che attiva a sua volta la cascata delle MAP-chinasi per regolare la proliferazione e il differenziamento cellulare, e la fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K) per il controllo della sopravvivenza cellulare (Lowy et al., 1993) (Figura 1.10).

Le tre principali isoforme di Ras sono *KRAS*, *NRAS* ed *HRAS*.

Le mutazioni attivanti di *KRAS* e *NRAS* sono predittive di resistenza agli agenti anti-EGFR nei pazienti con mCRC; *KRAS* è mutato nel 40-50% dei pazienti con mCRC mentre *NRAS* nel 4-8%; negli studi PRIME e OPUS è stato dimostrato che il trattamento con farmaci anti-EGFR

determina una PFS ed una OS superiore nei pazienti senza mutazioni di *RAS*, mentre non è stato osservato nessun beneficio in termini di sopravvivenza nei pazienti con qualsiasi mutazione di *RAS*.

Sulla base di questi risultati EMA ed AIFA hanno ristretto l'impiego di *panitumumab* e *cetuximab* ai soli pazienti *RAS*^{wt}; difatti lo stato di *RAS* deve essere stabilito prima di iniziare il trattamento (AIOM, 2019).

I pazienti che presentano una mutazione nei geni *RAS* possono beneficiare della terapia con gli antiangiogenetici, ma non esistono studi che consentano di prevedere la risposta al trattamento.

La mutazione di *KRAS* più frequente è *KRAS*^{G12D} ed una nuova generazione di inibitori *KRAS* potrebbe essere una svolta nel trattamento di questa popolazione. Ad esempio, AMG510 è una piccola molecola che inibisce in modo specifico e irreversibile *KRAS*^{G12C} bloccandolo in uno stato inattivo legato alla guanosina difosfato (GDP); nel primo studio sull'uomo, ancora in corso, che valuta questa molecola in pazienti adulti con tumori solidi *KRAS*^{G12C} localmente avanzati o metastatici, la monoterapia con AMG 510 è stata ben tollerata, con la maggior parte dei pazienti che ha raggiunto il controllo della malattia. (Fakih et al., 2020).

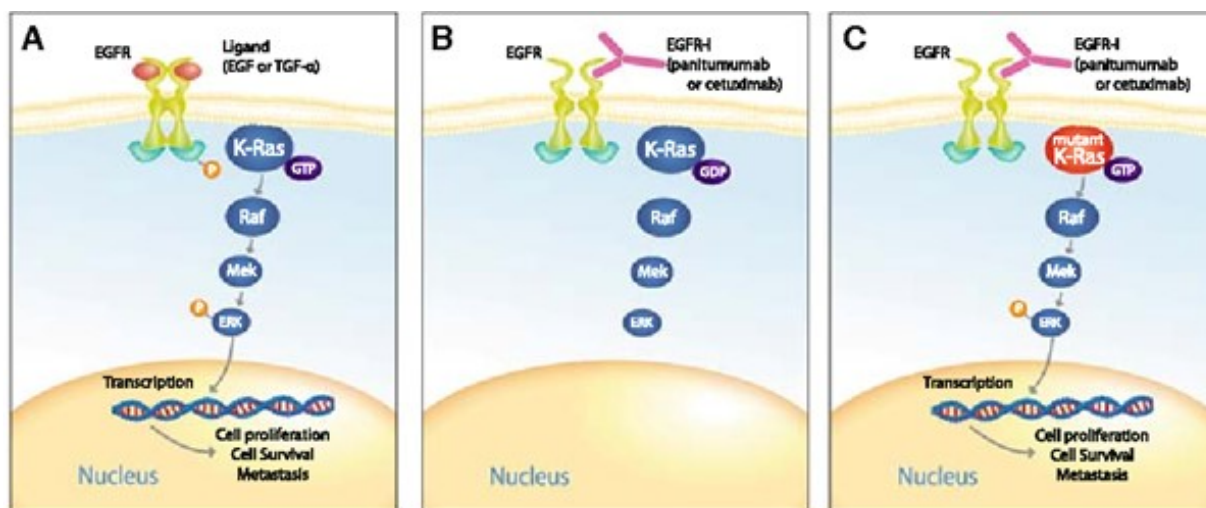


Figura 1.10 A) I ligandi del fattore di crescita epidermico (EGF) attivano la segnalazione di EGFR mediante *KRAS* e tramite una serie di fosforilazione attiva ERK che porta alla trascrizione di geni associati alla proliferazione cellulare, sopravvivenza e metastasi. B) Inibizione dell'EGFR da parte di *panitumumab* o *cetuximab*, *KRAS* resta inattivo. C) Quando *KRAS* è mutato, adotta una conformazione costitutivamente attiva che promuove all'attivazione della via Ras / Raf / Mek anche in presenza di inibizione dell'EGFR. (Siddiqui et al., 2009)

1.6.2 BRAF

BRAF è un gene che codifica per una serina/treonina chinasi attiva nella cascata di segnalazione delle MAP chinasi a valle del recettore EGFR, che promuove la proliferazione cellulare.

La mutazione attivante p.V600E del gene *BRAF* induce l'attivazione costitutiva della via MAPK che porta quindi ad una iperproliferazione cellulare; essa insorge nella popolazione *RAS^{wt}*, quindi le due mutazioni sono mutualmente esclusive.

La mutazione *BRAF^{V600E}* è riscontrata in circa l'8-10% dei pazienti con diagnosi di mCRC e porta ad una prognosi infausta, con una mediana di sopravvivenza globale tra i 4 e i 6 mesi dopo progressione dal trattamento di I linea. (Kopetz et al., 2019).

Nonostante la mutazione di *BRAF^{V600E}* sia una mutazione driver in diversi tipi di tumori ed un biomarker predittivo di risposta agli inibitori *BRAF* (*vemurafenib*), nei pazienti con mCRC l'attività del *vemurafenib* è risultata insufficiente (Kopetz et al., 2015).

Negli ultimi anni diversi lavori hanno investigato i dati relativi all'efficacia delle terapie anti-EGFR per i pazienti con *BRAF^{V600E}*; ad esempio, una metanalisi ha suggerito che gli agenti anti-EGFR non sono efficaci per i pazienti *BRAF^{V600E}*: sono stati esaminati nove studi di fase III e uno studio di fase II per un campione totale di 463 pazienti *BRAF* mutati ed è stato visto come l'aggiunta di *cetuximab* o *panitumumab* per il trattamento del sottogruppo dei *BRAF* mutati non portava un miglioramento significativo della PFS rispetto al regime di controllo (Pietrantonio et al., 2015).

Per contro, lo studio BEACON indica che anche gli agenti anti-EGFR possono avere un effetto positivo per i pazienti *BRAF* mutati se combinati ad inibitori *BRAF* ed inibitori *MEK*: sono stati arruolati 663 pazienti con mutazione di *BRAF^{V600E}* ed è stato valutato l'impiego di *encorafenib* (inibitore di *BRAF*) + *cetuximab* con o senza l'inibitore di *MEK binimetinib* vs chemioterapia (*cetuximab* + FOLFIRI o *cetuximab* + irinotecan). La sopravvivenza globale media è stata di 9 mesi nel gruppo trattato con tripletta (*encorafenib+cetuximab+binimetinib*) vs 8,4 mesi nel gruppo trattato con doppietta (*encorafenib + cetuximab*) vs 5,4 mesi nel gruppo di controllo; una combinazione di *encorafenib*, *cetuximab* e *binimetinib* ha prodotto risultati significativi sopravvivenza globale più lunga e un tasso di risposta più elevato rispetto alla terapia standard in pazienti con carcinoma coloretale metastatico con mutazione *BRAF^{V600E}*. (Kopetz et al., 2019).

Nel giugno del 2020, la Commissione Europea (EC) ha approvato la somministrazione di *encorafenib* in combinazione con *cetuximab* per il trattamento di pazienti adulti con tumore del colon-retto metastatico (mCRC) con mutazione *BRAF*^{V600E} che hanno ricevuto precedente terapia sistemica: questa è la prima terapia raccomandata per questa popolazione di pazienti, in quanto fino a questo momento non esistevano terapie approvate in Europa.

L'analisi molecolare del gene *BRAF* risulta essere quindi fondamentale per una corretta programmazione terapeutica.

1.6.3 Instabilità dei microsatelliti (MSI)

L'instabilità dei microsatelliti è causata da un deficit del sistema del *mismatch repair* che può essere dovuto da una mutazione germinale nei geni *MMR* (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*) che predispongono alla sindrome di Lynch o da inattivazione di *MLH1* nei tumori sporadici. Questi casi sporadici sono spesso associati alla mutazione *BRAF*^{V600E}: infatti circa il 20% dei pazienti mCRC con *BRAF*^{V600E}, presenta anche un'alta instabilità dei microsatelliti (MSI).

In un'analisi aggregata di 7642 pazienti trattati con fluorouracile adiuvante, tumori con alta instabilità dei microsatelliti sono stati associati a prognosi favorevole rispetto ai tumori che presentavano stabilità dei microsatelliti. (Popat et al., 2005).

MSI si osserva in circa il 5% dei pazienti con mCRC ed è uno dei principali predittori dell'efficacia degli inibitori del checkpoint immunitario (ICIs), infatti i tumori MSI sono caratterizzati da un alto carico mutazionale. (Overman et al., 2018). Diversi studi di fase II hanno dimostrato un elevato tasso di risposte agli inibitori di PD1/PD-L1 in pazienti con mCRC MSI; i risultati dello studio non randomizzato CheckMate-142 suggeriscono che le combinazioni di mAb anti-PD1 e anti-CTLA4 potrebbero essere più efficaci degli anticorpi anti-PD1 o anti-PDL1 da soli. *Pembrolizumab* e *nivolumab* con o senza *ipilimumab* sono stati approvati dalla FDA per il trattamento di pazienti con mCRC MSI, che sono andati in progressione dopo trattamento a base di fluoropirimidina, oxaliplatino e irinotecan.

In una terza coorte dello studio CheckMate-142, 45 pazienti sono stati trattati con *nivolumab* + *ipilimumab* come trattamento di prima linea e l'ORR è stata del 77% e la stima della PFS era del 77% al primo anno. (Lenz et al., 2018).

Recentemente, lo studio di fase III KEYNOTE-177 ha dimostrato la superiorità di *pembrolizumab* in monoterapia rispetto alla chemioterapia standard di prima linea (FOLFOX o

FOLFIRI, con o senza *bevacizumab* o *cetuximab*) in termini di PFS 16,5 mesi vs 8,2 mesi; le percentuali di PFS a 12 e 24 mesi erano del 55% e del 48% con *pembrolizumab* contro il 37% e 19% con la chemioterapia. Dati questi risultati è molto probabile che il *pembrolizumab* diventi lo standard di cura in prima linea nei pazienti con mCRC MSI (Andre et al., 2020).

1.6.4 HER2

Un nuovo interessante target emergente con valore prognostico e predittivo è *HER2*, che è stato al centro di molti studi promettenti.

Amplificazioni oppure mutazioni di *ERBB2* (*HER2*), sia puntiformi che piccole inserzioni e delezioni, sono state descritte in circa il 5% dei tumori mCRC. Dati preliminari incoraggianti suggeriscono che l'amplificazione di *HER2* potrebbe essere un importante marcatore di risposta ai farmaci anti-*HER2*: lo studio di fase II HERACLES ha mostrato come i pazienti con tumore *KRAS*^{wt} ed *HER2* positivo possano beneficiare della combinazione di *trastuzumab* + *lapatinib* (Sartore-Bianchi et al., 2016).

Nello studio di fase II DESTINY-CRC01, ancora in corso, sono stati arruolati 90 pazienti con tumori *RAS*^{wt}- *BRAF*^{wt} ed *HER2* positivo e trattati con *trastuzumab deruxtecan*: la sopravvivenza mediana libera da progressione per i pazienti con una più alta espressione di *HER2* è stata di 6,9 mesi. Inoltre, in 20 pazienti si è avuta una stabilizzazione della malattia, con un tasso di controllo complessivo dell'83%. (Siena et al., ASCO 2020).

1.6.5 NTRK

Le fusioni dei geni *NTRK* sono bersaglio terapeutico di inibitori di TRK quali *larotrectinib* ed *entrectinib* che hanno mostrato un elevato tasso di risposta duratura indipendentemente dal tipo di tumore. Le strategie per lo screening della fusione *NTRK* si basano sulla FISH, RT-PCR e sequenziamento di nuova generazione (NGS), a seconda della probabilità di fusione *NTRK*.

Le fusioni *NTRK* sono rare nel colon-retto tumori, con un'incidenza dello 0,23–0,97%, ed è quindi utile selezionare la popolazione da sottoporre a screening; ad esempio è stato visto che l'incidenza delle fusioni *NTRK* è del 42% nei tumori *BRAF*^{wt} con ipermetilazione del promotore del gene *MLH1* (Cocco et al., 2019), ed è più frequente nei pazienti con instabilità dei microsatelliti. (AIOM, 2019)

1.6.6 Mutazioni di PIK3ca e PTEN

Il gene *PI3KCA* codifica per una subunità catalitica di PIK3 che utilizza l'ATP per fosforilare il fosfatidilinositolo generando il fosfatidilinositol 3,4,5-tifosfato (PIP3), che gioca un ruolo importante attivando la proteina AKT1 che trasduce il segnale promuovendo la crescita, la sopravvivenza, la proliferazione, motilità e morfologia cellulare.

Il gene *PTEN* è invece un oncosoppressore che codifica per una fosfatasi che defosforila PIP3, inibendo l'attivazione di PIK3. (Malek et al., 2017).

Le mutazioni attivanti il gene *PIK3ca*, prevalentemente negli esoni 9 e 20, e la perdita di *PTEN* causano l'attivazione costitutiva del pathway PI3K/AKT/mTOR, promuovendo iperproliferazione cellulare e sopravvivenza cellulare.

Il gene *PIK3ca* è mutato in circa il 12% di pazienti con mCRC, mentre *PTEN* nel 6%. Le mutazioni del gene *PIK3ca* sembrano avere un ruolo predittivo negativo di risposta ai trattamenti con farmaci anti-EGFR (Bardelli et al., 2010), ma i dati sono contrastanti.

Attualmente sono in corso diversi studi sugli inibitori di PIK3: *alpelisib* (BYL719), *duvelisib*, *copanlisib* e *idelalisib* sono stati approvati per la terapia mirata dei tumori della testa e del collo. Uno studio di fase Ib ha dimostrato che la combinazione di *encorafenib* più *cetuximab* e *alpelisib* è tollerabile e fornisce un'attività clinica promettente nel trattamento della popolazione di pazienti con mCRC *BRAF* mutato (van Geel et al., 2017). Al momento, sono in corso studi con nuovi farmaci che interferiscono con la via di segnalazione di PI3K/AKT/mTOR, come gli inibitori di PI3K, i doppi inibitori di PI3K/mTOR e gli inibitori di AKT, sia in monoterapia, sia in combinazione con farmaci citotossici e a bersaglio molecolare.

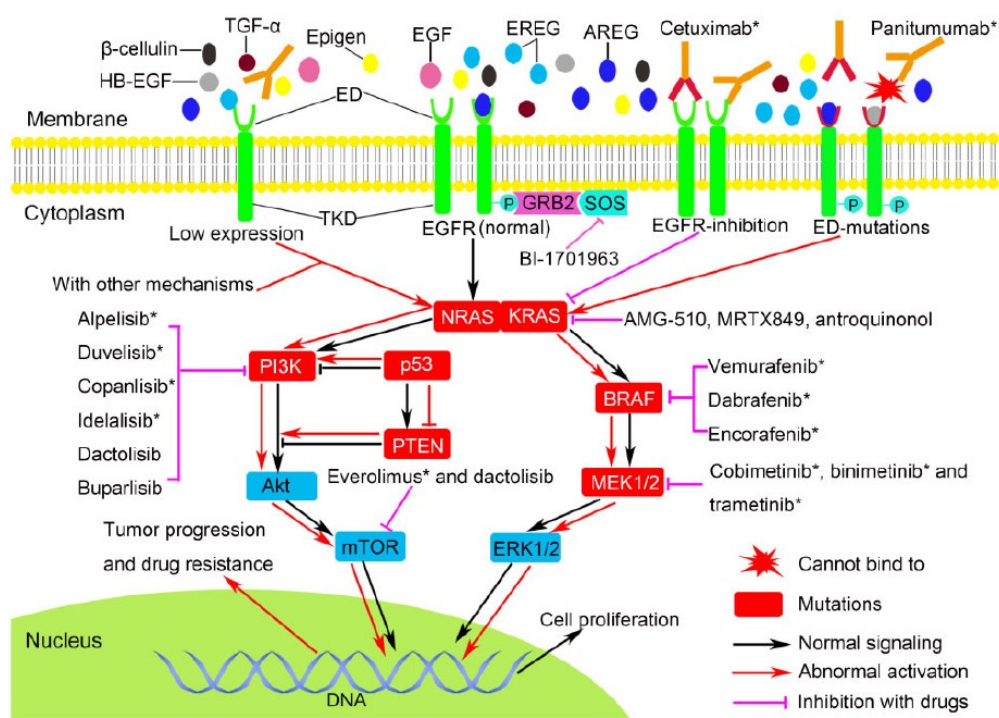


Figure 1.11 Terapia anti-EGFR nel carcinoma colorettale metastatico: meccanismi e potenziali regimi di farmacoresistenza. Oltre alle mutazioni in *RAS*, le mutazioni nel dominio extracellulare di *EGFR*, *PIK3*, *PTEN* sono correlate a resistenza. Gli agenti anti-*BRAF* e anti-*MEK* sono stati approvati, mentre altri come *AMG-510* sono in fase di studio. * farmaci approvati. (Q.-H. Li et al., 2020)

1.7 La biologia molecolare nella gestione dei pazienti mCRC

Nei pazienti con stadio II e III la caratterizzazione molecolare non viene attualmente effettuata di routine, anche se potrebbe fornire informazioni utili sulla prognosi dei pazienti. Ad esempio alcuni studi hanno mostrato come la presenza di MSI nei pazienti in stadio II sia associata ad una prognosi favorevole.

La caratterizzazione molecolare ha invece assunto un ruolo fondamentale nella programmazione terapeutica dei pazienti con malattia metastatica.

Nel paziente con mCRC, al momento di intraprendere il trattamento, deve essere effettuata la valutazione dello stato mutazionale di *KRAS* ed *NRAS*, in quanto la presenza di mutazioni è un meccanismo di resistenza agli anticorpi anti-EGFR.

Le raccomandazioni per il test di mutazione *RAS* includono gli esoni *KRAS* 2, 3 e 4 (codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146) e gli esoni *NRAS* 2, 3 e 4 (codoni 12, 13, 59, 61 e 117). I pazienti con queste mutazioni non sono raccomandate a ricevere la terapia anti-EGFR (Sepulveda et al., 2017).

Anche la valutazione dello stato mutazionale di *BRAF* può fornire informazioni prognostiche nei pazienti mCRC e dovrebbe essere eseguita nella pratica clinica prima di intraprendere un trattamento di prima linea (Tabella 1.6).

Biomarker	Test da effettuare	Tecnologia	Raccomandazioni
RAS	Mutazioni	PCR-NGS	No al trattamento anti-EGFR nei pazienti mutati
<i>BRAF</i>	Mutazione V600E	PCR-NGS	Trattamento con anti-EGFR non è consigliato nei pazienti <i>BRAF</i> ^{V600E}
HER2	Amplificazione	NGS-IHC-FISH	Pazienti con amplificazione HER2 potrebbero essere resistenti agli anti-EGFR. Il regime trastuzumab +pertuzumab o lapatinib è un'opzione nei pazienti HER2 amplificato.
NTRK	Fusione	NGS-FISH-PCR	Larotrectinib è un'opzione di trattamento per i pazienti NTRK traslocati
MMR/MS	dMMRc/MSI-H	NGS-IHC-PCR	H-MSI hanno una buona prognosi; pembrolizumab è consigliato per i pazienti H-MSI

Tabella 1.6 Raccomandazioni per le analisi molecolari e il trattamento per il cancro del colon retto metastatico

1.7.1 La caratterizzazione molecolare nella pratica clinica

La diagnostica molecolare ha assunto un ruolo indispensabile nella caratterizzazione dei processi patologici, consentendo di eseguire una diagnosi più accurata ed una corretta programmazione terapeutica, in particolare con i farmaci di nuova generazione per terapie personalizzate.

Negli ultimi anni si è assistito ad una rivoluzione nelle tecnologie di sequenziamento degli acidi nucleici. Il sequenziamento del DNA utilizzando il metodo Sanger è stato l'unico metodo di sequenziamento utilizzato per quasi 30 anni ed ha rappresentato fino a poco tempo fa il metodo di sequenziamento più affidabile essendo considerato il gold standard per il riconoscimento di specifiche mutazioni.

Il metodo Sanger, pur estremamente sensibile e specifico, presenta tuttavia diverse limitazioni tecniche, che spesso rendono complicato il suo utilizzo nella ricerca e nella pratica clinica, ormai caratterizzata dalla necessità di effettuare un gran numero di indagini molecolari.

Il limite principale del metodo Sanger, oltre alla brevità delle sequenze di DNA che possono essere lette in ciascuna reazione di sequenziamento (500 bp), è essenzialmente rappresentato dalla necessità di separazione mediante elettroforesi dei frammenti di DNA che devono essere letti, aumentando la durata complessiva del processo e limitando notevolmente il numero di reazioni che possono essere eseguite in parallelo (massimo 96 reazioni).

Difatti, la valutazione dei diversi biomarcatori in ogni paziente sarebbe difficile da attuare con metodologia Sanger: il costo di una caratterizzazione molecolare completa sarebbe troppo elevato per rendere possibile l'utilizzo di questo approccio nella pratica clinica. Poiché la maggior parte delle mutazioni dei geni driver sono mutualmente esclusive, sarebbe possibile ridurre il costo dello screening eseguendo analisi consecutive per i diversi biomarcatori, a partire dal più frequente.

Ad esempio, un paziente con mCRC potrebbe essere sottoposto a screening prima per le mutazioni di *KRAS* esone 2, poi per gli esoni 3 e 4, *NRAS* e così via. Tuttavia, ogni metodo richiede almeno 2-3 giorni per ottenere il risultato dell'analisi e ciò non è accettabile per pazienti con malattia avanzata che necessitano di sottoporsi alla terapia con urgenza.

Un ulteriore limite è la disponibilità di tessuto per l'analisi dei biomarcatori: per alcuni pazienti con mCRC sono disponibili solo piccole biopsie e l'analisi dei diversi biomarcatori potrebbe richiedere l'utilizzo di tecniche diverse, ad esempio l'analisi dell'espressione proteica (IHC), del numero di copie geniche (FISH), mutazioni (analisi mutazionale del DNA) (Tabella 1.6).

L'introduzione di tecnologie innovative ad alta processività, come il sequenziamento di nuova generazione (NGS), ha permesso di rilevare mutazioni somatiche con elevata sensibilità e specificità indispensabili per l'oncologia di precisione.

La Next Generation Sequencing (NGS) è una tecnologia che consente il sequenziamento contemporaneo di ampie regioni geniche fino all'intero genoma mediante un singolo test rilevando contemporaneamente delezioni, inserzioni, SNP e anche traslocazioni.

Oltretutto i test NGS sono molto sensibili rispetto alle tecnologie tradizionali: nella resistenza acquisita agli agenti anti-EGFR nei pazienti mCRC, sembrano essere coinvolti dei cloni *KRAS*^{mut} in bassissima percentuale che non sono rilevabili con metodica tradizionale (Diaz et al., 2012); è molto probabile che, mediante la tecnologia NGS, sia possibile rilevare questi cloni a bassissima frequenza prima dell'inizio del trattamento, e quindi prima che si possa verificare la resistenza.

Il Targeted Sequencing (TS) permette il sequenziamento di alcune regioni specifiche del genoma con pannelli genici di grandezza estremamente variabile, da pochi a centinaia di geni. I pannelli target dedicati all'oncologia sono i test più utilizzati nella pratica clinica in quanto consentono di sequenziare i principali oncogeni ed oncosoppressori coinvolti nella patogenesi e progressione tumorale, con particolare riguardo alle alterazioni genetiche actionable o che comunque rivestono un ruolo prognostico e/o predittivo.

1.7.1.1 Tecnologie NGS

Esistono diverse tecnologie di NGS che prevedono differenti approcci di preparazione delle librerie e differenti metodiche di sequenziamento. La preparazione delle librerie da sequenziare si può basare sulla “cattura” dei frammenti da sequenziare oppure sull'amplificazione delle sequenze target. Entrambe le strategie hanno vantaggi e svantaggi: la prima offre una migliore rappresentazione di alcune alterazioni genetiche quali le traslocazioni mentre la seconda richiede una quantità minore di acidi nucleici ed ha una maggiore sensibilità.

Esistono anche diverse tecnologie di sequenziamento; la maggior parte delle piattaforme NGS si basa sul sequenziamento mediante sintesi.

Alcune tecnologie utilizzano sistemi di rilevamento ottici come ad esempio la piattaforma Illumina: si basa sull'uso di quattro nucleotidi marcati in fluorescenza che consentono l'identificazione delle basi quando vengono introdotte nei filamenti di DNA, e di un sistema di imaging ottico per visualizzare il filamento complementare in crescita (come nel caso del MiSeq ed HiSeq). (Luthra et al., 2015).

Altre tecnologie si basano sui semiconduttori, come ad esempio Ion Torrent.

La tecnologia di sequenziamento di Ion Torrent si basa sul rilevamento degli ioni idrogeno rilasciati durante una classica reazione di polimerizzazione del DNA. È un metodo di sequenziamento mediante sintesi, e differisce dalle altre metodiche di sequenziamento in quanto non utilizza né nucleotidi modificati chimicamente né sistemi ottici: il sistema si basa sull'uso di chip semiconduttori dotati di milioni di micro-pozzetti all'interno dei quali sono presenti delle microsfere (Ion sphere beads) con il DNA amplificato e a singolo filamento. Nei pozzetti confluiscono i 4 nucleotidi uno alla volta: se il dNTP viene incorporato nel filamento in crescita si avrà il rilascio dello ione idrogeno che modifica il valore di pH della soluzione,

rilevato da un sensore di ioni ISFET (*Ion-sensitive field-effect transistor*, Figura 1.12), che segnerà l'avvenuta reazione "trasformando" il segnale da chimico ad elettrico; la serie d'impulsi elettrici trasmessi dal chip al computer viene tradotta in sequenza di DNA (Figura 1.13). Le molecole di dNTPs che non si sono legate vengono lavate via prima del ciclo successivo, in cui si fornisce un differente dNTP.

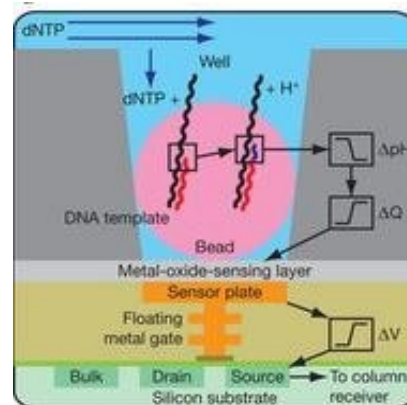


Figura 1.12. Struttura di un elemento sensore. Nel micropozzetto è rappresentata una biglia che porta il DNA stampo da sequenziare, a singolo filamento. Sono rappresentati anche il sensore e l'elettronica sottostante. Gli ioni idrogeno (H^+) sono rilasciati in soluzione quando i dNTPs vengono incorporati nel filamento di neo-sintesi. Ciò varia il pH del pozzetto ($\Delta pH = 0.02$ unità di pH per singola base incorporata), che a sua volta induce una variazione del potenziale di superficie dello strato di ossido di metallo sensibile agli ioni. Questo determina un cambiamento del potenziale (ΔV) del terminale di sorgente del transistor sottostante. Il segnale viene digitalizzato dall'elettronica del chip.

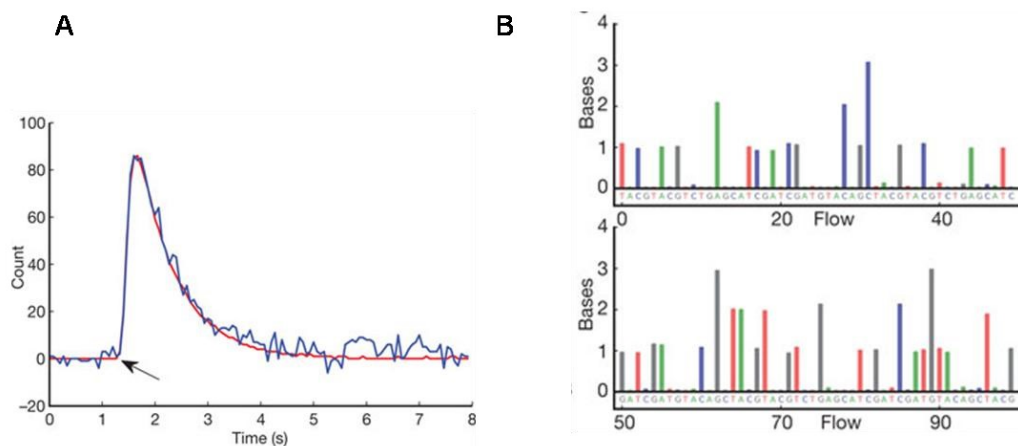


Figura 1.13 Rilevamento del segnale e base calling. A) Raccolta dati. Segnale di incorporazione di 1 nucleotide, rilevato da un singolo elemento sensore. La freccia indica l'inizio dell'evento di incorporazione. La linea rossa rappresenta il modello fisico e la linea blu mostra i dati corretti per il fondo. La generazione del segnale e il rilevamento avvengono in 4 sec. B) Base calling. Rappresentazione dei dati ottenuti dai primi 100 flussi in un singolo micropozzetto. Ogni barra colorata indica il numero di basi incorporate durante il flusso dello specifico nucleotide. Il colore delle barre è relativo ai 4 tipi di nucleotidi (T = rosso, A = verde, C = blu, G = grigio).

I principali vantaggi della tecnologia Ion Torrent sono la rapidità di sequenziamento e i costi iniziali di esercizio relativamente bassi. Ciò è stato possibile in quanto non utilizza nucleotidi modificati e sistemi ottici.

Grazie alle caratteristiche di rapidità, scalabilità, e costi relativamente bassi, Ion Torrent è di particolare interesse per le applicazioni cliniche e la ricerca medica rivolta alla target therapy nei pazienti con mCRC, in quanto consente di ottenere un profilo molecolare completo in tempi relativamente brevi.

1.7.2 La sfida della biopsia liquida

Dalla diagnostica di “routine” è possibile avere a disposizione del materiale bioptico e/o chirurgico per effettuare le analisi genetico molecolari, indispensabili all’oncologo affinché possa scegliere la migliore terapia. Al fine poi di controllare la risposta ai nuovi farmaci biologici nei pazienti affetti da mCRC, negli ultimi tempi, si è assistito ad un nuovo cambiamento di scenario. Nello specifico, in un recente lavoro (Siravegna et al., 2015), è stato descritto come l’utilizzo della biopsia liquida può essere impiegato per monitorare l’evoluzione molecolare dei tumori colorettali metastatici.

Da qui vi è un crescente interesse per l'uso della biopsia liquida nella gestione dei pazienti con cancro colorettale (CRC), anche se l’impiego della biopsia liquida per adesso è considerato un approccio sperimentale ed è limitato a studi clinici.

Il termine biopsia liquida è generico e in oncologia si riferisce alla possibilità di identificare biomarcatori tumorali in liquidi biologici, quali sangue, saliva, urina liquido cerebrospinale.

Rispetto alla biopsia tissutale, il prelievo ematico è più rapido, meno invasivo, meno doloroso, e facile da reperire anche in serie, permettendo di fornire informazioni in diverse fasi della progressione del CRC. Difatti, è possibile seguire l’evoluzione clonale della malattia valutando i biomarcatori predittivi e la risposta al trattamento. (Normanno et al., 2018); inoltre rappresenta una sorgente di DNA tumorale nei casi in cui non sia disponibile tessuto tumorale o questo risulti inadeguato per l’analisi mutazionale.

Teoricamente la biopsia liquida potrebbe fornire informazioni più complete circa lo *status* genetico, in quanto il DNA estratto dovrebbe essere rappresentativo dell’intero carico mutazionale del paziente, rispetto all’analisi di un singolo frammento di neoplasia ottenuto da un’unica sede di malattia.

Tra le varie applicazioni della biopsia liquida, l'analisi del DNA libero circolante (cell free DNA, cfDNA) è quella ormai più utilizzata nella pratica clinica. Tuttavia, è possibile che nel futuro altri derivati ottenuti dal sangue, quali le cellule tumorali circolanti (CTC), l'RNA tumorale circolante ed i microRNA (miRNA), gli esosomi, come pure altri fluidi biologici quali le urine ed il liquido cerebrospinale, possano essere utilizzati nella pratica clinica per avere ulteriori informazioni rispetto a quelle ottenibili mediante l'analisi del solo ctDNA estratto da plasma (Figura 1.14).

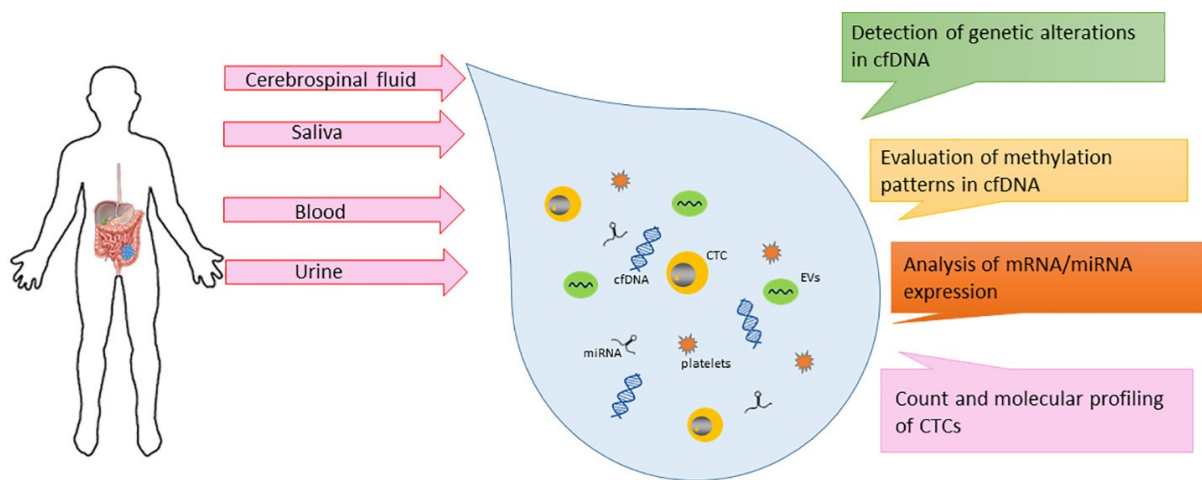


Figura 1.14 Applicazioni della biopsia liquida in pazienti con CRC. I biomarcatori tumorali possono essere isolati da diversi fluidi corporei inclusi sangue, saliva, urina e fluido cerebrospinale. Il sangue è una fonte di cfDNA, miRNA, cellule tumorali circolanti (CTC), piastrine e vescicole extracellulari (EV). (Normanno et al., 2018).

Il cfDNA è in genere isolato dal plasma ottenuto da sangue periferico; le quantità di cfDNA isolate dal plasma sono molto limitate (nell'ordine dei nanogrammi) ed il DNA è estremamente frammentato e relativamente instabile. Il DNA di origine tumorale (circulating tumor DNA, ctDNA) è tuttavia una frazione esigua del cfDNA totale che contiene anche DNA derivante da cellule non-neoplastiche. Per questo motivo, sono necessarie tecniche altamente sensibili per il test su cfDNA.

Le tecniche di real-time PCR (RT-PCR) e digital PCR (ddPCR) sono ampiamente utilizzate nella pratica clinica per l'analisi del ctDNA, per la loro sensibilità e specificità; tuttavia, queste metodiche presentano il limite di poter analizzare solo pochi hotspot per seduta di lavoro e solo alcuni tipi di alterazioni genetiche (mutazioni puntiformi e brevi indels). Quindi risultano

essere inadeguate per una determinazione complessiva del profilo genetico delle neoplasie e per l'analisi di alterazioni complesse quali ad esempio le traslocazioni e le amplificazioni.

La next-generation sequencing e soprattutto le applicazioni di T-NGS, potrebbero superare questi limiti in quanto è possibile identificare contemporaneamente diversi tipi di alterazioni genetiche in più geni in una singola analisi. Inoltre, mediante NGS, è possibile identificare nuove mutazioni che non potrebbero essere rilevate con la ddPCR e la RT-PCR.

L'utilizzo della biopsia liquida potrebbe dunque essere uno strumento molto utile per la diagnosi precoce dell'insorgenza di uno stato di resistenza al trattamento, con la possibilità di cambiare rapidamente l'approccio terapeutico qualora il farmaco diventasse inefficace. I risultati ottenuti con questa pratica potrebbero avere altre numerose applicazioni, come ad esempio la possibilità, nel corso dei trials clinici, di confrontare l'efficacia di farmaci diversi o di valutarne il dosaggio ottimale.

In Italia, attualmente l'uso nella clinica della biopsia liquida è approvato solo per alcuni pazienti con tumore del polmone, in cui non è possibile fare una biopsia. Per tutti gli altri, compreso il cancro del colon-retto metastatico, è utilizzabile solo a fini di ricerca.

2. SCOPO DEL PROGETTO

Lo scopo del mio progetto di dottorato è stato quello di mettere a punto e di testare la tecnica della biopsia liquida per il monitoraggio molecolare nei pazienti con malattia metastatica mediante tecnologia next-generation sequencing.

Questo è stato possibile mediante l'applicazione della biopsia liquida in due studi clinici in collaborazione con il gruppo di Oncologia Medica dell'Istituto Nazionale Tumori di Milano e con il gruppo oncologico dell'Azienda ospedaliera Universitaria di Pisa.

Il primo studio a cui ho preso parte prende il nome di **CRICKET** (*Cetuximab* Rechallenge in Irinotecan - pretreated mCRC, *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* wild-type treated in 1st line with anti-EGFR Therapy) ed ha lo scopo di individuare i pazienti in cui possa essere efficace riutilizzare in terza linea una parte di farmaci usati in prima linea, valutando lo status mutazionale dei geni *KRAS* *NRAS* e *BRAF* prima e dopo il trattamento.

In particolare, è stato progettato per valutare prospetticamente l'attività di una strategia di rechallenge con irinotecan e *cetuximab* come trattamento di terza linea nei pazienti che hanno avuto una risposta iniziale e poi una progressione con una terapia di prima linea con irinotecan e *cetuximab* e che ricevono chemioterapia di seconda linea più *bevacizumab*.

La raccolta prospettica di biopsie liquide nei pazienti arruolati è stata pianificata per indagare se l'analisi dei potenziali meccanismi di resistenza acquisita agli anti-EGFR nel ctDNA potrebbe aiutare a prevedere i benefici di questa strategia.

Il secondo studio clinico su cui è stata applicata la biopsia liquida è stato il **VALENTINO trial**; si tratta di uno studio clinico randomizzato di fase II, multicentrico, condotto su 224 pazienti con mCRC RAS wild-type che ricevevano FOLFOX-4 più *panitumumab* in prima linea seguito da 5-FU / LV più *panitumumab* o *panitumumab* in monoterapia come terapia di mantenimento. Infatti, attualmente, esistono scarse evidenze sulla strategia di mantenimento con i farmaci anti-EGFR, come *panitumumab*, in pazienti che ottengono un iniziale controllo di malattia dopo induzione con una chemioterapia standard associata al farmaco biologico.

Lo studio mira a valutare l'efficacia in termini di non inferiorità della sopravvivenza libera da progressione (PFS) del solo *panitumumab* di mantenimento rispetto a *panitumumab* con 5-FU / LV.

Lo studio VALENTINO mira anche a indagare potenziali biomarcatori mediante analisi di biopsia tissutale e liquida, e la loro correlazione con gli endpoint di attività ed efficacia.

Questi studi potrebbero essere utili per identificare dei sottogruppi di pazienti che possono beneficiare di alcune strategie di trattamento specifiche.

3. Materiali e metodi

3.1 Pazienti e tumori

3.1.1 Studio Cricket

Lo studio Cricket è uno studio multicentrico di fase 2 a braccio singolo condotto dal 7 gennaio 2015 al 19 giugno 2017. 28 pazienti sono stati arruolati in 9 unità di oncologia italiane; l'età mediana era di 69 anni (range, 45-79 anni), (9 donne e 19 uomini).

Per l'inclusione nello studio, i pazienti dovevano essere mCRC *RAS* e *BRAF* wild-type, essere stati sottoposti ad una terapia di prima linea contenente cetuximab a base di irinotecano (FOLFIRI [fluorouracile e leucovorin combinato con irinotecan] o FOLFOXIRI [fluorouracile, leucovorin, oxaliplatino e irinotecan]) con almeno risposta parziale e ad una terapia di seconda linea di trattamento con bevacizumab a base di oxaliplatino (FOLFOXIRI, FOLFOX [leucovorin, fluorouracil e oxaliplatino] o XELOX [capecitabina e oxaliplatino]) ed infine, essere in progressione alla seconda linea. Lo studio prevedeva il trattamento con cetuximab 500 mg/mq ev in 1-h ogni 2 settimane seguito da irinotecano 180 mg/mq ev in 1-h ogni 2 settimane, fino a progressione di malattia o morte.

Gli endpoint includevano la sopravvivenza libera da progressione e la sopravvivenza globale e, come analisi esplorativa, le mutazioni *RAS* nel ctDNA.

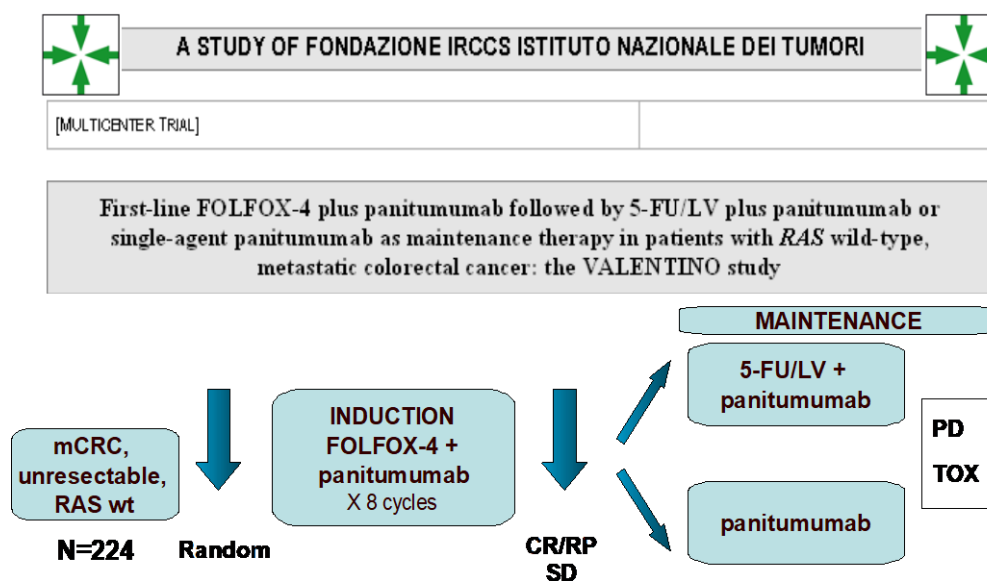
È stato raccolto il plasma al baseline di 28 pazienti con tumore del colon-retto metastatico non resecabile, *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* wild-type e irinotecano-pretrattati, candidati ad una terza linea di trattamento e progrediti ad una prima linea contenente cetuximab. 3 pazienti sono stati esclusi per progressione precoce della malattia, quindi è stato analizzato il ctDNA di 25 pazienti. Su 5 pazienti è stato possibile analizzare i prelievi post-terapia.

3.1.2 Studio Valentino

Lo studio Valentino è uno studio clinico randomizzato di fase II, multicentrico, condotto su 229 pazienti con mCRC *RAS* wild-type arruolati da 25 ospedali italiani da settembre 2015; l'età mediana era 64 anni (range 56-70 anni), 153 maschi e 76 femmine. I pazienti sono stati sottoposti ad una terapia di prima linea con FOLFOX4 + panitumumab seguita da una terapia di mantenimento con 5-FU-Lv con panitumumab o panitumumab in monoterapia fino alla progressione. I pazienti sono stati assegnati in modo casuale (1:1) a panitumumab più FOLFOX-4 (panitumumab, 6 mg / kg, oxaliplatino, 85 mg / m² al giorno 1, e leucovorin calcio, 200 mg /

m² e fluorouracile, bolo di 400 mg / m² seguito da 600 mg / m² di infusione continua di 24 ore ai giorni 1 e 2, ogni 2 settimane), per 8 cicli, seguito da panitumumab più fluorouracile-leucovorin (braccio A, n=117) o panitumumab (braccio B, n=112). Entrambe le terapie di mantenimento sono continuati fino alla progressione della malattia, all'avvento di effetti tossici inaccettabili o alla morte.

Lo studio mira a valutare l'efficacia in termini di non inferiorità della sopravvivenza libera da progressione (PFS) del solo panitumumab di mantenimento rispetto a panitumumab con 5-FU / LV dopo il trattamento di prima linea.



Multicenter, randomized, open-label, phase II no-profit study (35 centers in Italy)

Primary endpoint: non-inferiority of PFS of panitumumab alone vs. 5-FU/LV + panitumumab

Secondary endpoints: TTP, TTF, OS, ORR, duration-of-response, safety, QoL (PRO)

Exploratory endpoints: tissue biomarkers, PGX, liquid biopsies

Figura 3.1. Schema dello studio clinico Valentino

Inoltre lo studio Valentino mira ad indagare potenziali biomarcatori e la loro correlazione con gli endpoint di attività ed efficacia ed a tale scopo, sono stati raccolti il tessuto tumorale e il plasma.

Nel nostro laboratorio è stata condotta l'analisi su cfDNA su 190 pazienti e la rianalisi su tessuto su 145 pazienti.

3.2 Preparazione dei campioni

I campioni sono stati preparati a partire da biopsia liquida e a partire da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).

Biopsia liquida

Il cfDNA è stato isolato dal plasma; i prelievi di sangue sono stati raccolti in tubi standard K3 EDTA (contenenti acido etilendiamminotetraacetico) e conservati prima dell'isolamento per un massimo di 3 ore a temperatura ambiente.

Per l'eliminazione dei residui cellulari, il plasma è stato isolato mediante una centrifugazione senza freno a bassa velocità a 1600g per 10 minuti a 4°C. Il plasma ottenuto è stato conservato a -80°C, temperatura che garantisce una maggiore stabilità del cfDNA.

Il cfDNA è stato estratto dal plasma mediante l'estrattore automatico Maxwell RSC Instrument e il kit Maxwell RSC ccfDNA plasma kit.

Materiale FFPE

Per ottenere i FFPE, i campioni sono stati fissati in soluzione tamponata di formaldeide (4-10%) per 12-24 h e inclusi in paraffina, secondo i metodi istopatologici standard. Da ciascun blocchetto sono state ricavate sezioni di 5 µm di spessore, posizionate su vetrini appositi. Il taglio delle sezioni è stato eseguito con un classico microtomo a slitta (Leica Microsystem). Per favorire l'adesione del tessuto al vetrino e per essicare le sezioni, i vetrini sono posti in stufa a 37 °C O.N. o a 56 °C per circa 30 min.

Estrazione del DNA da materiale FFPE

Il patologo, dopo un esame istopatologico, procede alla selezione dell'area tumorale e all'identificazione della % di cellule tumorali presenti sul vetrino colorato in ematossilina-eosina, che verrà usato come riferimento. Mediante macrodissezione, usando bisturi sterile, si otterrà il campione cellulare corrispondente all'area prescelta. Il numero di sezioni sottoposte a macrodissezione dipende dalle dimensioni dell'area selezionata e dalla cellularità del campione. In genere, si utilizzano fino a 5 sezioni. Il tessuto dissezionato viene raccolto in provette Eppendorf da 1.5 ml. Il campione FFPE deve essere de-paraffinato per ottimizzare l'estrazione del DNA.

De-paraffinatura ed estrazione del DNA sono state condotte con il kit commerciale GeneRead DNA FFPE (Qiagen). Questo kit permette la rimozione enzimatica degli artefatti di deaminazione di citosine causati dal trattamento in formalina. La deaminazione di citosine introduce mutazioni C > T artificiali, che risultano in falsi positivi nella lettura di sequenza. Quindi, l'utilizzo di tale kit migliora l'efficienza dell'analisi, diminuendo il numero di variazioni di sequenza falsi positivi. La lisi cellulare avviene per via enzimatica, con la Proteinasi K, in presenza di sali che inattivino immediatamente le nucleasi.

Protocollo operativo

- Aggiungere 160 µl di Deparaffinization Solution ad ogni provetta contenente il materiale macrodissezionato. Vortexare e centrifugare brevemente
- Incubare a 56 °C per 3 minuti e portare a temperatura ambiente
- Aggiungere 55 µl di acqua RNase-free, 25 µl di Buffer FTB e 20 µl di proteinasi K, vortexare e centrifugare brevemente. All'aggiunta della proteinasi K, la Deparaffinization Solution formerà uno strato al di sopra del Buffer FTB
- Incubare a 56 °C per 1 h e successivamente a 90 °C per 1h
- Centrifugare brevemente e trasferire la fase inferiore, chiara, in una nuova provetta Eppendorf da 1.5 ml
- Aggiungere 115 µl di acqua RNase-free e miscelare
- Aggiungere 35 µl di UNG (Uracil-N-glycosylase), vortexare e incubare a 50 °C per 1 ora
- Centrifugare brevemente, aggiungere 2 µl RNase A (100 mg/ml), miscelare e incubare per 2 min a temperatura ambiente
- Trasferire 700 µl di lisato nella colonnina QIAmp MinElute, inserita in un tubo di raccolta, da 2 ml. Centrifugare per 1 min a 14000 rpm e scartare l'eluato
- Aggiungere alla colonnina 500µl di Buffer AW1 e centrifugare per 1 min a 14000 rpm. Scartare l'eluato
- Aggiungere alla colonnina 500µl di Buffer AW2 e centrifugare per 1 min a 14000 rpm. Scartare l'eluato
- Aggiungere alla colonnina 250 µl di etanolo (96-100%) e centrifugare per 1 min a 14000 rpm e scartare il tubo di raccolta con l'eluato

- Posizionare la colonnina in un nuovo tubo di raccolta da 2 ml e centrifugare per 1 min a 14000 rpm per rimuovere eventuali residui. Scartare il tubo di raccolta con l'eluato
- Mettere la colonnina MinElute QIAmp in una nuova provetta da 1.5 ml e aggiungervi 20-40 µl di Buffer ATE (buffer di eluizione), in base alla quantità di materiale di partenza
- Incubare a temperatura ambiente per 1 min, poi centrifugare a 14000 rpm, per 1 min
- Recuperare l'eluato e conservarlo a -20 °C
-

3.3 Preparazione delle librerie NGS

La fase di preparazione delle librerie è stata eseguita con le chimiche Ion AmpliSeq e Oncomine TagSequencing; quest'ultima, mediante l'utilizzo di barcodes molecolari, definiti anche unique molecular identifiers (UMI), associato a pipelines bioinformatiche dedicate, consente di ridurre in maniera significativa il tasso di falsi positivi nell'analisi del cfDNA rispetto alla chimica Ampliseq e consente di raggiungere livelli di rilevamento estremamente bassi e ad alta specificità, pari allo 0.05-0.1% (Figura 3.2).

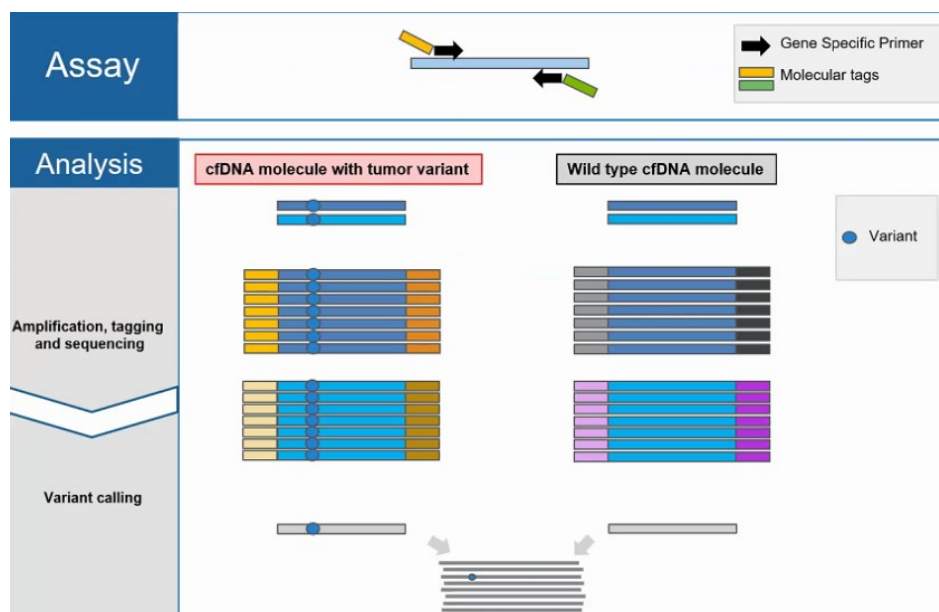


Figura 3.2. Chimica Oncomine Colon cfDNA: ad ogni molecola di cfDNA viene assegnato un tag molecolare univoco attraverso una prima reazione di PCR; successivamente i frammenti di libreria contrassegnati vengono amplificati in un secondo ciclo di PCR per produrre “famiglie” di librerie con tag molecolari indipendenti (famiglie molecolari). Una mutazione viene chiamata quando almeno 2 famiglie molecolari condividono la variante, ed ogni famiglia mostra almeno 3 letture.

Il Primer Pool utilizzato per la reazione di amplificazione delle regioni target è stato:

- per lo studio Cricket, *Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2* (CHP) per il cfDNA
- per lo studio Valentino, *Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2* per il DNA estratto dai tessuti e l'*Oncomine™ Colon cfDNA Assay*, per il cfDNA.

Il Cancer Hotspot Panel è un singolo primer pool che consente l'amplificazione di oltre 2800 regioni hotspot di 50 geni target più frequentemente mutati nei tumori solidi. (Tabella 3.1)

ABL1	EGFR	GNAS	KRAS	PTPN11
AKT1	ERBB2	GNAQ	MET	RB1
ALK	ERBB4	HNF1A	MLH1	RET
APC	EZH2	HRAS	MPL	SMAD4
ATM	FBXW7	IDH1	NOTCH1	SMARCB1
BRAF	FGFR1	JAK2	NPM1	SMO
CDH1	FGFR2	JAK3	NRAS	SRC
CDKN2A	FGFR3	IDH2	PDGFRA	STK11
CSF1R	FLT3	KDR	PIK3CA	TP53
CTNNB1	GNA11	KIT	PTEN	VHL

Tabella 3.1 Elenco geni del pannello Cancer Hotspot Panel

Gli ampliconi che si ottengono con il CHP hanno lunghezza media di 155 bp, il che lo rende compatibile anche con DNA parzialmente degradato, come quello che si ottiene da campioni FFPE.

Il pannello Oncomine™ Colon cfDNA è un singolo primer pool che consente l'amplificazione di oltre 250 regioni hotspot di 14 geni che sono frequentemente mutati nel tumore del colon; questo test è specifico per il ctDNA ed utilizza il tag sequencing che permette di raggiungere il Limit Of Detection (LOD) di 0.05-0,1%. (Tabella 3.2; Figura 3.3)

AKT1	CTNNB1	FBXW7	MAP2K1	SMAD4
APC	EGFR	GNAS	NRAS	TP53
BRAF	ERBB2	KRAS	PIK3ca	

Tabella 3.2 Elenco geni del pannello Oncomine™ Colon cfDNA

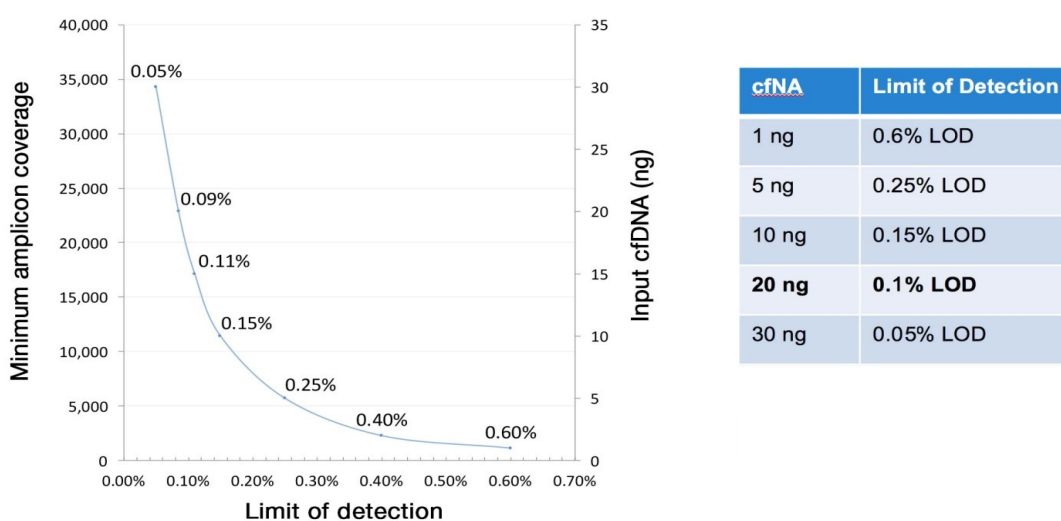


Figura 3.3. Sensibilità del pannello Oncomine™ Colon cfDNA

Amplificazione delle regioni target

Per il CHP, sono stati usati 10 ng di DNA genomico da tessuto, ed un range di 1-20ng per il cfDNA.

Per quanto riguarda il pannello Oncomine™ Colon cfDNA, il range utilizzato è stato di 1-50 ng di cfDNA in base all'efficienza di estrazione; per raggiungere la sensibilità dello 0,1% sarebbe auspicabile utilizzare almeno 20 ng di cfDNA.

Protocollo operativo Ampliseq per CHP

- ***Amplificazione:***

Per ogni paziente, aggiungere i seguenti reagenti in piastra, secondo le quantità indicate in tabella.

Reagenti	Volume
5X Ion Ampliseq HiFi Mix	4 µl
5X Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel	4 µl
gDNA 10 ng	X µl
acqua nuclease-free	Fino a 20 µl
Totale	20 µl

Centrifugare brevemente e caricare la piastra nel termociclatore, impostando il seguente protocollo termico. Il numero di cicli dipende dal numero di coppie di primers per pool e varia in base al tipo di materiale usato (congelato o FFPE).

Stage	Step	Temperature	Time
Hold	Activate the enzyme	99°C	2 min
Cycle (22 cycles per gDNA, 24 per cfDNA)	Denature	99°C	15 sec
	Anneal and extent	60°C	4 min
Hold	-	10°C	hold

- *Digestione*

Ad ogni campione, aggiungere 2 µl di FuPa (mix nucleasi), per un volume totale di 22 µl. Vortexare o pipettare; caricare la piastra nel termociclatore e impostare il seguente protocollo termico:

Temperature	Time
50°C	10 min
55°C	10 sec
60°C	20 min
10°C	Hold fino a 1h

- *Ligazione degli adattatori agli ampliconi e purificazione*

In ogni campione, aggiungere i seguenti reagenti, nelle quantità indicate in tabella, vortexare o pipettare;

Reagenti	Volume
Switch Solution	4 µl
Ion Ampliseq Adapters	2 µl
DNA ligasi	2 µl
Volume totale (inclusi i 22 µl di ampliconi)	30 µl

Caricare la piastra nel termociclatore e impostare il seguente protocollo termico:

Temperature	Time
22°C	30 min
68°C	5 min
72°C	5 min
10°C	Hold fino a 24h

Per la purificazione del DNA è stato utilizzato l'Agencourt AMPure XP Reagent (Beckman Coulter) e la piastra magnetica DynaMag™-96 Side.

- Aggiungere 45µl (1.5X volume campione) di Agencourt AMPure XP Reagent nei campioni; vortexare o pipettare
- Incubare a temperatura ambiente, per 5 min, poi posizionare la piastra sul magnete e incubare per 2 min, o finchè la soluzione diventa chiara. Rimuovere il surnatante, senza toccare il pellet, e scartarlo
- Aggiungere 150 µl di etanolo 70% fresco e spostare da un lato e l'altro la piastra per lavare le biglie, quindi rimuovere e scartare il surnatante, senza toccare il pellet e ripetere questo passaggio per un secondo lavaggio
- Lasciare la piastra sul magnete per 5 minuti per consentire la completa evaporazione dell'etanolo
- *Riamplicazione della libreria*
- Togliere la piastra dal magnete e risospendere il pellet in 50 µl di Platinum PCR SuperMix High Fidelity e 2 µl di Library Amplification Primer Mix. Vortexare o pipettare

- Posizionare la piastra sul magnete per 2 min, quindi trasferire circa 50µl del supernatante in una nuova fila e caricare la piastra nel termociclatore impostando il seguente protocollo termico:

Stage	Temperature	Time
Hold	98°C	2 min
7 cicli	98°C	15 sec
	64°C	1 min
Hold	10°C	Hold fino a 1 h

- *Purificazione della libreria amplificata*
 - Aggiungere 25 µl (0.5X volume campione) di Agencourt AMPure XP Reagent. Vortexare o pipettare
 - Incubare a temperatura ambiente per 5 min, poi posizionare la piastra sul magnete e incubare per altri 5 min; trasferire il surnatante in un nuovo pozzetto
 - Al surnatante aggiungere 60 µl (1.2X volume del campione d'origine) di Agencourt AMPure XP Reagent. Vortexare o pipettare
 - Incubare a temperatura ambiente per 5 min, poi posizionare sul magnete e incubare per altri 5 min o finché la soluzione diventa chiara. Scartare il surnatante.
 - Procedere con i 2 lavaggi con etanolo al 70%
 - Rimuovere la piastra dal magnete e risospendere il pellet in 50 µl di LowTE (buffer di eluizione). Vortexare o pipettare
 - Posizionare la piastra sul magnete e incubare per 2 min
 - In provette da 0.2 ml raccogliere il surnatante (libreria amplificata), senza toccare il pellet, e conservare a 4-8 °C fino ad un mese, oppure a -20°C.

Protocollo operativo per Oncomine colon cfDNA

- **Amplificazione target da cfDNA**

Per ogni paziente, aggiungere i seguenti reagenti in piastra, secondo le quantità indicate in tabella.

Reagenti	Volume
cfDNA, 1-50ng	X μ l
acqua nuclease-free	13-X μ l
cfDNA panel	2 μ l
cfDNA PCR master mix	15 μ l
Totale	30 μl

Vortexare e centrifugare 1 minuto x 300g e caricare la piastra nel termociclatore, impostando il seguente protocollo termico.

Stage	Temperature	Time
Hold	98°C	2 min
2 cicli	98°C	30 sec
	64°C	2 min
	62°C	2 min
	60°C	2 min
	58°C	2 min
	72°C	30 sec
Hold	72°C	2 min
Hold	4°C	hold

- *Purificazione degli ampliconi*

- Aggiungere 45 μ l (1.5X volume campione) di Agencourt AMPure XP Reagent nei campioni e vortexare 15 secondi, incubare per 5 minuti a temperatura ambiente
- Vortexare nuovamente e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente
- Posizionare la piastra sul magnete e incubare per 5 minuti o finchè la soluzione diventa chiara. Rimuovere il surnatante, senza toccare il pellet, e scartarlo
- Aggiungere 150 μ l di etanolo 80% fresco e incubare 30 secondi, rimuovere il surnatante senza disturbare il pellet e ripetere nuovamente
- Lasciare la piastra sul magnete per 5 minuti per consentire la completa evaporazione dell'etanolo
- Aggiungere 24 μ l di TE, vortexare ed incubare 5 minuti nella piastra magnetica
- Trasferire 23 μ l in un nuovo pozzetto

- *Amplificazione degli ampliconi con i primer tag*

Per ogni paziente aggiungere i seguenti reagenti in piastra, secondo le quantità indicate in tabella.

Reagenti	Volume
DNA eluito dal precedente step	23 µl
Tag sequencing BC (1-48)	1 µl
cfDNA library Primer P1	1 µl
cfDNA Libreria PC Master mix	25 µl
Totale	50 µl

Vortexare e centrifugare 1 minuto x 300g e caricare le provette nel termociclatore, impostando il seguente protocollo termico.

Stage	Temperature	Time
Hold	98°C	2 min
18 cicli	98°C	15 sec
	64°C	15 sec
	72°C	15 sec
Hold	72°C	5 min
Hold	10°C	hold

- *Purificazione della libreria barcodata*

- Aggiungere 57,5 µl (1.15X volume campione) di Agencourt AMPure XP Reagent. Miscelare, vortexare 15 secondi, incubare per 5 minuti a temperatura ambiente
- Posizionare la piastra sul magnete e incubare per 5 minuti o finchè la soluzione diventa chiara. Rimuovere il surnatante, senza toccare il pellet, e scartarlo
- Aggiungere 150 µl di etanolo 80% fresco e incubare 30 secondi, rimuovere il surnatante senza disturbare il pellet e ripetere nuovamente
- Lasciare la piastra sul magnete per 5 minuti per consentire la completa evaporazione dell'etanolo
- Aggiungere 50 µl di TE, vortexare ed incubare 5 minuti nella piastra magnetica
- Trasferire 50 µl in un nuovo pozzetto

- Aggiungere 50 μ l (1X volume campione) di Agencourt AMPure XP Reagent. Miscelare, vortexare 15 secondi, incubare per 5 minuti a temperatura ambiente
- Posizionare la piastra sul magnete e incubare per 5 minuti o finchè la soluzione diventa chiara. Rimuovere il surnatante, senza toccare il pellet, e scartarlo
- Aggiungere 150 μ l di etanolo 80% fresco e incubare 30 secondi, rimuovere il surnatante senza disturbare il pellet e ripetere nuovamente
- Lasciare la piastra sul magnete per 5 minuti per consentire la completa evaporazione dell'etanolo
- Aggiungere 30 μ l di TE, vortexare ed incubare 5 minuti nella piastra magnetica
- Posizionare la piastra sul magnete e incubare per 2 min
- Trasferire 28 μ l di eluito in provette da 0.2 ml (librerie amplificata), senza toccare il pellet, e conservare a 4 per un uso immediato, oppure a -20°C.

Valutazione qualitativa e quantitativa delle librerie

Gli ampliconi delle librerie dovrebbero avere picchi multipli tra 125 e 300 bp.

La dimensione degli ampliconi amplificati durante la preparazione delle librerie è stata verificata mediante strumento Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizzando il 2100 Expert Software e l' Agilent High Sensitivity DNA Kit. mentre la loro concentrazione è stata valutata mediante "Qubit® 2.0 Fluorometer" utilizzando il kit "High sensitivity assay kit Qubit® dsDNA" (Invitrogen). Il test è altamente selettivo per DNA a doppia elica (dsDNA) ed è progettato per quantificare concentrazioni iniziali del campione da 10 pg / μ L a 100 ng / μ L.

3.4 Sequenziamento NGS

Ogni libreria è stata diluita con TE in maniera tale da ottenere una concentrazione di ~50pM. Le librerie sono state successivamente combinate per poter essere sequenziate e si è proseguito con la preparazione del templatato mediante l'Ion Chef System che permette di automatizzare il processo di preparazione del templatato e di caricamento dell'Ion chip.

Per entrambi gli studi, è stato utilizzato l'Ion 540™ Kit – Chef ed il sequenziamento è stato eseguito sullo strumento Ion GeneStudio™ S5 prime utilizzando gli Ion chip 540.

Per quanto riguarda i casi dello studio Cricket, sono stati caricati 15 pazienti per ogni chip 540, in modo da ottenere almeno una copertura media $>10000\times$ per ogni caso per aumentare la sensibilità di lettura e la specificità.

Per quanto riguarda i casi dello studio Valentino analizzati mediante il pannello Oncomine colon cfDNA, sono stati caricati 24 pazienti per ogni chip 540 per ottimizzare l'analisi: è consigliata una copertura di lettura mediana >25000 ed una copertura molecolare mediana >2500 , per poter rilevare una variante con un MAF dello 0,1%.

La profondità molecolare indica il numero di molecole di DNA interrogate contenenti il target; definisce il LOD della posizione dell'hotspot nel campione: ad esempio, se la profondità molecolare è ≥ 1500 , si può avere la sicurezza che non sia presente alcuna variante allo 0,2% mentre se la profondità molecolare è $\geq 2,500$, si ha alta confidenza che nessuna variante sia presente fino allo 0,1% di LOD.

Analisi dei dati

I file BAM (Binary Alignment Map) sono stati generati dal sequenziatore utilizzando il genoma umano GRCh37/hg19 come riferimento, ed utilizzando il TMAP (Torrent Mapping Alignment Program), con parametri predefiniti per l'applicazione della biopsia liquida dell'Ion Torrent Suite™ Software (TSS, version 5.10).

Per il pannello CHP, la chiamata delle varianti è stata generata dai dati di sequenziamento usando il Variant Caller plugin, al quale sono stati applicati alcuni filtri, per diminuire la probabilità di rilevare di falsi positivi: profondità media di copertura >100 , coverage > 20 , una frequenza allelica $> 1\%$ e un valore di qualità > 8 . I VCF sono stati analizzati mediante il tool "Ensembl Variant Effect Predictor pipeline" (Mc Laren et al., 2016), ed il software Ion Reporter™ mediante il workflow "AmpliSeq CHPv2 peripheral/CTC/CF DNA single sample" 5.6. La classificazione delle mutazioni è stata fatta mediante "COSMIC database" e "Clinvar db" e le varianti germinali sono state filtrate utilizzando i database pubblici di polimorfismi noti quali dbSNP, ExAC, 1000Genomes, escludendo le varianti con MAF $>10^{-6}$.

Le varianti annotate sono state esaminate con il tool Integrative Genomic Viewer della Broad Institute (Helga et al., 2013) per testare il loro livello di qualità e confermare la presenza delle varianti sia su strand "forward " che "reverse".

Per il pannello Oncomine colon cfDNA, i BAM generati dal sequenziamento sono stati caricati sul software Ion reporter™ 5.12 ed analizzati mediante il workflow Oncomine Colon Liquid Biopsy w.1.5; le varianti sono state esaminate mediante il tool IGV per escludere la presenza di falsi negativi ed errori di classificazioni delle varianti (SNP, MNP, Complex). Risultati ottimali sono raggiunti con una copertura mediana di lettura >25000 e una copertura molecolare mediana >2500; una mutazione viene chiamata quando almeno 2 famiglie molecolari condividono la variante, ed ogni famiglia mostra almeno 3 letture.

La classificazione delle mutazioni è stata eseguita mediante “COSMIC database” e “Clinvar db. dbSNP, ExAC, 1000Genomes, escludendo le varianti con $MAF > 10^{-6}$.

4. Risultati

4.1 STUDIO CRICKET

Dal 7 gennaio 2015 al 19 giugno 2017, 28 pazienti sono stati arruolati in 9 unità di oncologia italiane (Figura 4.1); l'età mediana era di 69 anni (range, 45-79 anni), (9 donne e 19 uomini). Per l'inclusione nello studio, i pazienti dovevano essere mCRC RAS e BRAF wild-type, esser stati sottoposti a precedente regime di prima linea a base di irinotecan e cetuximab con risposta almeno parziale, sopravvivenza libera da progressione di almeno 6 mesi con terapia di prima linea, precedente trattamento di seconda linea a base di oxaliplatino e bevacizumab ed infine essere in progressione alla seconda linea.

Lo studio prevedeva il trattamento con cetuximab 500 mg/mq ev in 1-h ogni 2 settimane seguito da irinotecano 180 mg/mq ev in 1-h ogni 2 settimane, fino a progressione di malattia o morte.

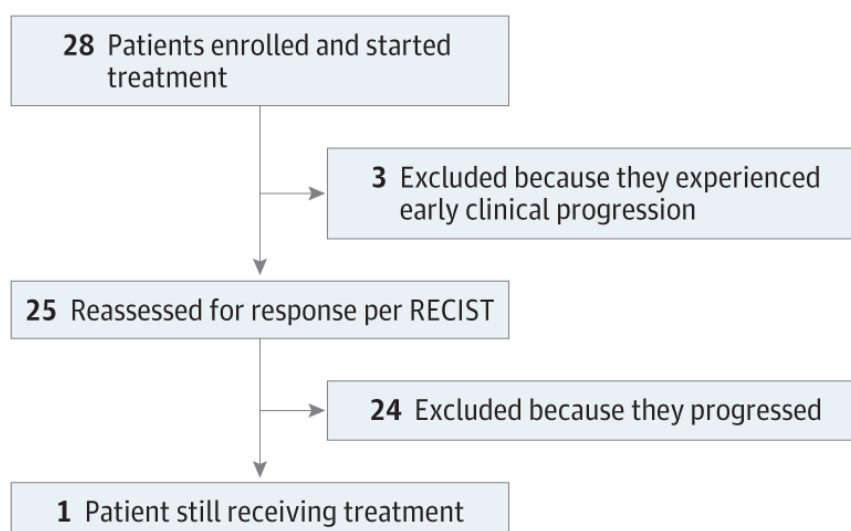


Figura 4.1 Diagramma Consort dello studio clinico.

Dei 28 pazienti, 25 pazienti (89%) erano stati sottoposti a resezione del tumore primario e 21 pazienti (75%) avevano più siti di metastasi, mentre in 5 pazienti le metastasi erano ancora limitate al fegato (18%). Il tempo mediano dalla diagnosi di malattia metastatica all'ingresso nello studio è stato di 24,4 mesi (20,2-31,7 mesi).

Nel laboratorio di Patologia Molecolare presso la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano, mi sono occupata del sequenziamento NGS dei prelievi raccolti in questo studio. Presso gli altri centri, è stata condotta l'analisi degli hotspot dei geni KRAS, NRAS e

BRAF mediante digital droplet PCR (ddPCR), che consente di identificare uno SNP ad altissima sensibilità.

In laboratorio sono pervenuti 28 prelievi raccolti prima della somministrazione del primo ciclo del rechallenge; di 5 pazienti sono pervenuti i prelievi di plasma raccolti prima della somministrazione del secondo ciclo (ciclo 1 giorno 14) e i prelievi raccolti alla rivalutazione TC fino a progressione, ogni 8 settimane. (Tabella 4.1). I pazienti n 8, 14, e 20 sono stati esclusi in quanto hanno sviluppato una progressione precoce della malattia.

Per valutare lo status mutazionale dei geni *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* prima e dopo il trattamento, ci si è occupati della messa a punto del sequenziamento NGS partendo da ctDNA estratto da plasma. Una volta estratto il ctDNA, sono state preparate le librerie dei 25 pazienti utilizzando l'Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel che sequenzia le regioni hotspot di 50 geni più comunemente mutati nei tumori solidi e sequenziate mediante Ion GeneStudio S5 Prime. Questo pannello è validato per l'analisi molecolare dei campioni di tessuto con una sensibilità del 2%, limitata per i test su ctDNA. Per ottenere una sensibilità maggiore, le librerie sono state sequenziate con un coverage medio di almeno 10000x: questo ha consentito di migliorare la sensibilità e la specificità del sequenziamento.

Dei 25 casi sequenziati al baseline, 7 (28%; n.2, 4, 6, 18, 22, 23, 25) non hanno soddisfatto i requisiti di qualità per poter procedere con l'analisi in quanto il numero di reads per campione non era sufficiente per ottenere una profondità di lettura adeguata. I 18 casi valutabili (72%), presentavano un coverage medio di almeno 10000X, il 100% degli ampliconi coperto almeno 500x ed un'uniformità del coverage medio >99%. Questi parametri hanno consentito di procedere con l'analisi dei dati con un buon livello di confidenza.

Nella Tabella 4.2 sono riportati i risultati dell'analisi NGS.

Codice paziente	Data I Ciclo	Data II Ciclo	Data I Riv	Data II Riv	Data III Riv	Data IV Riv	Data PD
1	13/01/2015	28/01/2015	11/03/2015	08/05/2015	03/07/2015	NA	15/09/2015
2	13/02/2015	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	19/02/2015	05/03/2015	28/04/2015	25/06/2015	NA	NA	20/08/2015
4	05/03/2015	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5	23/04/2015	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6	30/04/2015	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	04/06/2015	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	25/06/2015	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	01/10/2015	19/10/2015	23/11/2015	NA	15/03/2016	10/05/2016	30/08/2016
10	28/10/2015	10/11/2015	NA	NA	NA	NA	29/02/2016
11	20/01/2016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12	29/02/2016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
13	10/03/2016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
14	02/05/2016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
15	30/05/2016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16	01/06/2016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
17	01/08/2016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
18	06/10/2016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
19	06/11/2016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20	20/12/2016	NA	NA	NA	NA	NA	NA
21	17/01/2017	NA	NA	NA	NA	NA	NA
22	17/01/2017	NA	NA	NA	NA	NA	NA
23	03/02/2017	NA	NA	NA	NA	NA	NA
24	17/02/2017	17/03/2017	NA	NA	NA	NA	06/09/2017
25	14/03/2017	NA	NA	NA	NA	NA	NA
26	09/03/2017	NA	NA	NA	NA	NA	NA
27	09/06/2017	NA	NA	NA	NA	NA	NA
28	20/06/2017	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Tabella 4.1 Elenco dei plasmi disponibili per le analisi molecolari; i pazienti n 8, 14, e 20 sono stati esclusi.

Codice paziente	Data I Ciclo	Data II Ciclo	Data I Riv	Data II Riv	Data III Riv	Data IV Riv	Data PD
1	WT	WT	TP53 R248W	NV	TP53 R248W	NA	NV
3	WT	NV	NA	SMO A612T BRAF G593D ATM N1801D	NA	NA	KRAS G13D STK11 R333H
5	TP53 R158H	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	TP53 G245D	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	TP53 C376-1_377del	NV	NV	TP53 C376-1_377del	TP53 C376-1_377del	TP53 C376-1_377del	TP53 C376-1_377del
10	TP53 E198*	NV	NA	NA	NA	NA	TP53 E198*
11	APC E1309fs JAK2 V617F TP53 R175H	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12	KRAS G12D	NA	NA	NA	NA	NA	NA
13	KRAS G12V TP53 G245S	NA	NA	NA	NA	NA	NA
15	NRAS Q61L APC I1574fs PTPN11 S502L	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16	FBXW7 W486* NOTCH1 L2457V TP53 R273C	NA	NA	NA	NA	NA	NA
17	KRAS Q61H KRAS G12V	NA	NA	NA	NA	NA	NA
19	TP53 L252P	NA	NA	NA	NA	NA	NA
21	APC E1281* TP53 R248Q	NA	NA	NA	NA	NA	NA
24	KRAS G12D TP53 I195T TP53 L130I	NV	NA	NA	NA	NA	KRAS G12D TP53 I195T
26	WT	NA	NA	NA	NA	NA	NA
27	TP53 R248W	NA	NA	NA	NA	NA	NA
28	TP53 R282G APC C1289*	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Tabella 4.2 Mutazioni rilevate dall'analisi NGS sui campioni di biopsia liquida.

Dall'analisi NGS su ctDNA al baseline, 5 pazienti presentano mutazioni in RAS non rilevate in precedenza (2 KRAS G12D, 2 KRAS G12V con 1 che ospitava anche un Q61H, 1 NRAS Q61L); considerando anche i dati dell'analisi mediante digital PCR (Tabella 4.5), sono state riscontrate

mutazioni RAS in 12 dei 25 pazienti dello studio (6 KRAS G12D, 5 KRAS G12V con 1 che ospitava anche un Q61H mutazione e 1 NRAS Q61L).

Inoltre, considerando anche gli altri geni, 12/18 (66,7%) pazienti presentano mutazioni in TP53, 4/18 (22,2%) mutazioni in APC, 1/18 (5,6%) in JAK2, PTPN11, FBXW7 e NOTCH1. Non sono state trovate mutazioni di BRAF o PIK3CA.

Confrontando i dati di NGS rispetto a quelli ottenuti dalla digital PCR, la valutazione del caso n.21 non corrisponde, in quanto secondo l'analisi NGS il campione risulta RAS^{wt}, mentre in digital PCR viene rilevata una mutazione KRAS p.G12D.

L'analisi su prelievi post rechallenge è stata eseguita su 5 pazienti per un totale di 18 campioni (Tabella 4.3); 7/18 (39%) campioni non hanno soddisfatto i requisiti di qualità per poter procedere con l'analisi, mentre è stata eseguita l'analisi dei dati di sequenziamento di 11 campioni (61%):

N	1 ciclo	2 ciclo	I Riv	II Riv	III Riv	IV Riv	PD
1	WT	WT	TP53 R248W (3%)	NV	TP53 R248W (3%)	NA	NV
3	WT	NA	NA	SMO A612T (6%) BRAF G593D (5%) ATM N1801D (10%)	NA	NA	KRAS G13D (3%) STK11 R333H (2%)
9	TP53 c.376-1_377del (29%)	NV	NV	TP53 c.376-1_377del (21%)	TP53 c.376-1_377del (5%)	TP53 c.376-1_377del (9%)	TP53 c.376-1_377del (21%)
10	TP53 E198* (9%)	NV	NA	NA	NA	NA	TP53 E198* (13%)
24	KRAS G12D (3%) TP53 I195T (4%) TP53 L130I (3%)	NV	NA	NA	NA	NA	KRAS G12D (17%) TP53 I195T (16%)

Tabella 4.3. Analisi NGS ctDNA post rechallenge

- Paziente 1, al baseline wild-type e la mutazione di TP53 è stata rilevata dopo il rechallenge;
- Paziente 3, al baseline wild-type, dopo il rechallenge alla seconda rivalutazione sono state individuate mutazioni in SMO, BRAF e ATM, e alla progressione il setting mutazionale è nuovamente cambiato con mutazione in KRAS e STK11;
- Paziente 9, la mutazione di TP53 è presente in tutti i prelievi analizzabili;
- Paziente 10, la mutazione di TP53 è presente in tutti i prelievi analizzabili

- Paziente 24, al baseline presenta mutazione in KRAS e 2 mutazioni in TP53, ma alla progressione una mutazione in KRAS e 1 in TP53 e la frequenza allelica risulta nettamente superiore.

In base alle variazioni dimensionali delle lesioni, i pazienti sono stati stratificati come previsto dai criteri RECIST: PD (Progressive Disease), SD (Stable Disease), PR (Partial Response), CR (Complete Response).

Alla valutazione dei dati clinici, 6 pazienti (21%) hanno ottenuto una risposta parziale che è stata confermata in 4 pazienti alla successiva valutazione della TC. (Tabella 4.4); 9 pazienti (32%) hanno riportato una malattia stabile, per un tasso di controllo della malattia del 54%, mentre 10 sono andati in progressione. (Cremolini et al., 2019).

TIPO DI RISPOSTA	N PAZIENTI (%)
Risposta completa	0
Risposta parziale	6 (21)
Risposta parziale confermata	4 (14)
Risposta parziale non confermata	2 (7)
Malattia stabile	9 (32)
Malattia in progressione	10 (36)
Non valutabili	3 (11)

Tabella 4.4. Dati di risposta dei pazienti.

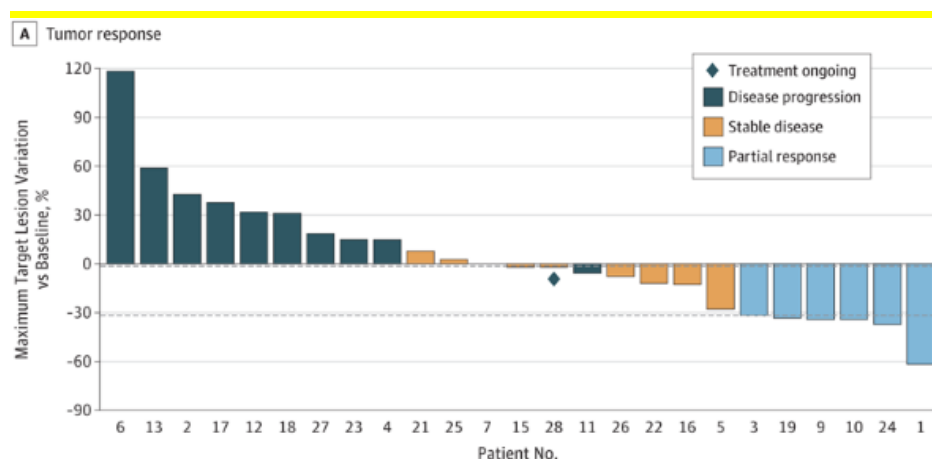


Figura 4.2. Risposta del tumore secondo i criteri RECIST. Le barre mostrano la variazione delle lesioni target rispetto al basale. Il valore -30 indica la soglia per definire la risposta parziale. Tredici dei 25 pazienti (52%) hanno mostrato una riduzione del tumore.

Mettendo in relazione i dati molecolari di RAS su ctDNA e i dati clinici, si evince che non sono state rilevate mutazioni RAS nel ctDNA di pazienti che hanno ottenuto una risposta parziale confermata rispetto a 12 (57%) dei 21 pazienti che non hanno ottenuto una risposta parziale.

PAZIENTI	RAS status analisi ctDNA	RISPOSTA
1	Wild-Type	PR
2	KRAS p.G12D	PD
3	Wild-Type	PR
4	Wild-Type	PD
5	Wild-Type	SD
6	KRAS p.G12D	PD
7	Wild-Type	SD
9	Wild-Type	PR
10	Wild-Type	PR non confermata
11	Wild-Type	PD
12	KRAS p.G12D	PD
13	KRAS p.G12V	PD
15	NRAS p.Q61L	SD
16	Wild-Type	SD
17	KRAS p.G12D/ p.Q61H	PD
18	KRAS p.G12V	PD
19	Wild-Type	PR
21	KRAS p.G12D	SD
22	KRAS p.G12V	SD
23	KRAS p.G12V	PD
24	KRAS p.G12D	PR non confermata
25	KRAS p.G12D	SD
26	Wild-Type	SD
27	Wild-Type	PD
28	Wild-Type	SD

Tabella 4.5. Dati di risposta dei pazienti correlati allo status mutazionale di RAS.

Analizzando i dati di malattia libera da progressione (PFS) e la sopravvivenza globale (OS), i pazienti con ctDNA wild-type RAS (n = 13) avevano una PFS significativamente più lunga

rispetto a quelli con ctDNA mutato in RAS (n = 12), con una PFS mediana di 4,0 vs 1,9 mesi (hazard ratio, 0,44; IC 95%, 0,18- 0,98; P = 0,03) (Figura 3A), mentre non sono state riportate differenze significative in termini di OS (OS mediana, 12,5 vs 5,2 mesi; hazard ratio, 0,58; IC 95%, 0,22-1,52; P = 0,24) (Figura 3B).

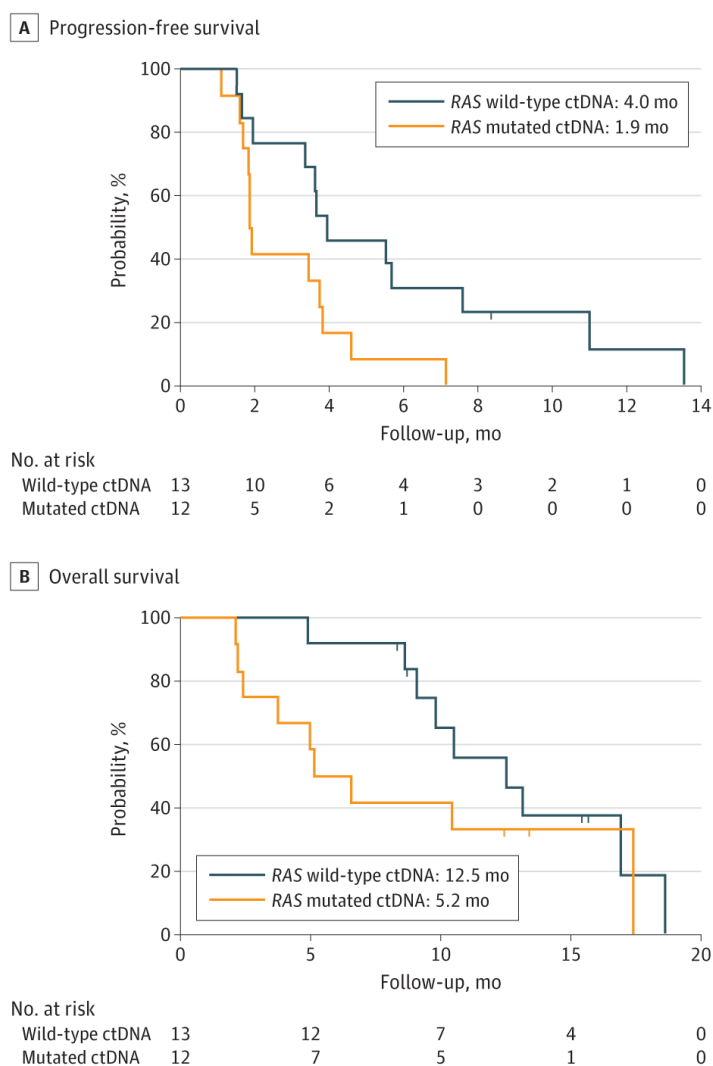


Figura 4.3. Stime di Kaplan-Meier della sopravvivenza libera da progressione e della sopravvivenza globale in base allo status di RAS nel ctDNA. (Cremolini et al., 2019)

4.2 Studio Valentino

Lo studio Valentino è uno studio clinico randomizzato di fase II, multicentrico, condotto su 229 pazienti con mCRC RAS wild-type arruolati da 25 ospedali italiani da settembre 2015 ad ottobre 2017. Lo studio mira a valutare l'efficacia in termini di non inferiorità della sopravvivenza libera da progressione (PFS) del solo panitumumab di mantenimento rispetto a

panitumumab con 5-FU / LV dopo il trattamento di prima linea (Figura 3.1). I pazienti sono stati suddivisi nel braccio A (panitumumab con 5-FU/LV) e braccio B (panitumumab).

La durata mediana del trattamento è stata di 7.4 mesi (4,3-12,4 mesi) per la popolazione complessiva, 8.4 mesi (4,7-14,0 mesi) per il braccio A e 7 mesi (4,0-10,5 mesi) per il braccio B; il follow-up mediano è stato di 18,0 mesi. La PFS a 10 mesi per il braccio A è stata del 59,9% e quella mediana di 12 mesi, mentre per il braccio B, la PFS a 10 mesi è stata del 49% e quella mediana di 9,9 mesi. La sopravvivenza globale al follow-up mediano di 18 mesi è stata del 66,4% nel braccio A e del 62,4% nel braccio B. (Figura 4.4) (Pietrantonio et al., 2019).

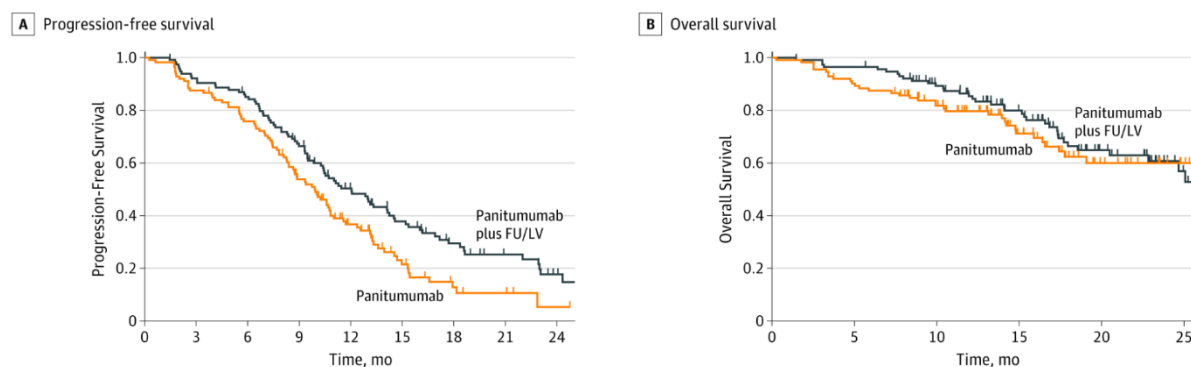


Figura 4.4 Stime di Kaplan-Meier per la sopravvivenza libera da progressione (PFS) e la sopravvivenza globale in base al braccio di trattamento. La PFS a 10 mesi è stata del 59,9% vs 49% nel braccio A vs braccio B. La sopravvivenza globale (OS) al follow-up mediano di 18 mesi è stata del 66,4% vs 62,4%.

Lo studio Valentino inoltre mira ad indagare potenziali biomarcatori e la loro correlazione con gli endpoint di attività ed efficacia ed a tale scopo, sono stati raccolti il tessuto tumorale e il plasma al baseline che sono stati centralizzati presso il centro coordinatore (Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano).

Nel nostro laboratorio è stata condotta l'analisi su cfDNA su 190 pazienti e la rianalisi su tessuto su 145 pazienti.

Per questo studio è stato utilizzato il pannello Oncomine Colon cfDNA che prevede l'utilizzo di barcodes molecolari univoci durante la preparazione delle librerie (Figura 3.2), e consente di rilevare mutazioni fino allo 0,05%-0,1%.

Per quanto riguarda l'analisi su cfDNA, 22 casi (11,6%) non hanno prodotto dati valutabili in quanto la copertura del pannello risultava inadeguata per l'analisi.

Le prestazioni del pannello sono state valutate in base alla copertura media degli ampliconi; i 48 ampliconi sono stati coperti in media da un minimo di 6100 letture ad un massimo di 151070 letture; le prestazioni della libreria sono state valutate da 2 parametri quali il Median Read Coverage, cioè il numero medio di letture tra le regioni target, e il Median Molecular Coverage, cioè il numero medio di letture delle molecole di Dna taggato (famiglie molecolari); nei casi in cui l'input di cfDNA è stato maggiore, si è riscontrato un aumento del Median Molecular Coverage che assicura un limit of detection (LOD) inferiore che si traduce in un aumento della sensibilità e specificità.

Dei 168 casi analizzati, circa il 75% presenta un LOD inferiore all'1%, circa il 50% inferiore allo 0,5 e circa il 30% inferiore allo 0,2%.

L'analisi dei dati è stata eseguita mediante la pipeline bioinformatica predefinita da Thermofisher mediante il software Ion reporter. Dalle prime analisi, sono risultati degli errori analitici in quanto ulteriori indagini sui BAM mediante il software IGV, hanno messo in evidenza la presenza di falsi negativi. In particolare è stato rilevato che il workflow utilizzato non è riuscito a chiamare le mutazioni complesse, e tutte le varianti non presenti nelle regioni target del DNA indicate nel BED file hotspot (Browser Extensible Data). Mediante una revisione dei parametri del workflow OncoPrint Colon Liquid Biopsy, è stato possibile recuperare tutte le varianti presenti. Nello specifico, per l'analisi è stato utilizzato il BED file della target region del pannello senza la presenza del BED file hotspots ed il parametro "allow_complex" è stato modificato da "false" a "true"; in seguito a queste modifiche è stata condotta l'analisi dei dati.

Su 152 pazienti (90,5%) è stata rilevata almeno una mutazione:

- 124 (73,8%) presentano mutazioni nel gene TP53:
- 77 (45,8%) nel gene APC;
- 24 (14,3%) nel gene PIK3ca;
- 21 (12,5%) nel gene BRAF;
- 14 (8,3%) nel gene KRAS;
- 10 (6%) nel gene SMAD4;
- 8 (4,8%) nel gene FBXW7;
- 3 (1,8%) nei geni NRAS, ERBB2 e GNAS;
- 1 (0,6%) nei geni EGFR e MAP2K1.

Per quanto riguarda il confronto dei dati ottenuti dall'analisi del cfDNA con i dati mutazionali del tessuto, nel nostro laboratorio sono pervenuti 145 pezzi tissutali; tutti i casi erano stati precedentemente analizzati per RAS e BRAF e selezionati come wild-type. Correlando i dati ottenuti dall'analisi su cfDNA al baseline ai dati rilevati dalla rianalisi del tessuto:

- il profilo mutazionale dell'analisi su cfDNA di 64 pazienti correla con il profilo del tumore primario (Tabella 4.6);
- il profilo mutazionale dell'analisi su cfDNA di 68 pazienti non correla con il profilo del tumore primario (Tabella 4.7)
- per 36 pazienti analizzati su cfDNA non è stato possibile confrontare i risultati con il tessuto primario corrispondente in quanto per 23 pazienti il materiale non è pervenuto, e per 13 l'analisi tissutale non ha prodotto dati valutabili (Tabelle 4.8 e 4.9).

N	LOD	GENE	EXON	HGVSp	HGVSc	FREQ.	MUTAZIONI TESSUTO
4	1,41-1,64%	WT					WT
6	0,49-0,67%	WT					WT
9	0,11-0,14%	TP53	5	p.H179R	c.536A>G	78,91%	TP53 H179R
10	0,93-1,13%	APC	15	p.E1374*	c.4120G>T	5,14%	APC E1374STOP TP53 R306STOP
19	0,1-0,14%	TP53	5	R175H	c.524G>A	3,26%	FGFR3 R807W TP53 R175H
22	0,07-0,12%	APC	15	p.Q1367Ter	c.4099C>T	67,60%	APC Q1367*
		TP53	7	p.G245D	c.734G>A	66,84%	TP53 G245D
27	0,13-0,16%	PIK3ca	9	p.E545K	c.1633G>A	23,23%	PIK3CA E545k
		KRAS	2	p.G12V	c.35G>T	25,24%	KRAS G12V
28	1,43-1,73%	TP53	7	p.R248Q	c.743G>A	7,12%	TP53 pR248Q
29	0,75-0,94%	TP53	6	p.S215R	c.645T>G	6,26%	APC S1346* ATM A1309T TP53 S215R
32	3,42-4,43%	TP53	8	p.R273H	c.818G>A	0,79%	TP53 pR273H
33	0,32-0,38%	TP53	8	p.R273C	c.817C>T	0,88	TP53 pR273C
35	0,36-0,45%	PIK3ca	9	p.E545K	c.1633G>A	20,25	PIK3ca E545K
		APC	15	p.Q1291*	c.3871C>T	20,58	APC Q1291*
		APC	15	p.E1464VfsTer8	c.4391_4394delAGAG	19,35	APC E1462fs
		TP53	6	p.P222S	c.664C>T	17,33	TP53 P222S
37	0,22-0,25%	TP53	7	p.G245S	c.733G>A	33,80%	TP53 G245S
38	0,85-1%	APC	15	p.Q1294Ter	c.3880C>T	77,00%	APC Q1294*
		TP53	8	p.R273H	c.818G>A	65,17%	TP53 R273H

39	0,05-0,06%	PIK3ca	9	p.Q546K	c.1636C>A	44,45%	PIK3ca Q546K
		APC	15	p.E1547Ter	c.4639G>T	6,00%	APC E1547*
		TP53	7	p.I251S	c.752T>G	66,67%	TP53 I251S
		MAP2K1	2	p.K57N	c.171G>T	68,69%	PTEN K128N
41	1,03-1,31%	BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	2,32%	BRAF pV600E
44	0,6-0,76%	WT					WT
45	0,69-0,84%	TP53	8	p.R273C	c.817C>T	2,55%	TP53 R273C
48	0,17-0,22%	APC	15	p.E1286*		1,20%	APC E1286*
		TP53	7	p.L257R	c.770T>G	39,70%	TP53 L257R
50	0,15 - 0,19%	APC	15	p.Q1294*	c.3880C>T	16,79%	APC Q1294*
51	1,33-1,57%	APC	15	p.L1488fs	c.4463_4466delTATT	0,22%	APC L1488fs
		TP53	5	p.K132E	c.394A>G	0,72%	TP53 K132E
53	1,02 - 1,26%	APC	15	p.S932FfsTer8	c.2794_2795insT	5,81%	
		TP53	8	p.R273C	c.817C>T	16,61%	TP53 R273C
54	0,06-0,07%	TP53	6	splicing variant	c.560-1G>A	60,68%	TP53 c.560-1G>A
55	0,45-0,68%	APC	15	p.G1288*	c.3862G>T	2%	APC p.G1288*
		TP53	5	p.K132N	c.396G>T	43,33%	TP53 p.K132N
58	0,54 - 0,64%	TP53	6	p.R213*	c.637C>T	42,60%	TP53 R213*
61	0,67-0,85%	TP53	8	p.R273H	c.818G>A	0,30%	TP53 p.R273H
63	0,34-0,43%	PIK3ca	9	p.E542K	c.1624G>A	18,76%	PIK3ca p.E542K
		TP53	8	p.R267SfsTer73	c.799_815delCGGAACAGC TTTGAGGTinsA	66,76%	TP53 R267fs
		APC	15	p.S932*	c.2795C>G	19,26%	
67	0,26-0,38%	WT					WT
74	0,66-0,80%	APC	15	p.Q1367*	c.4099C>T	2,36%	APC Q1367*
		TP53	7	p.R248Q	c.743G>A	0,85%	TP53 R248Q
79	0,61-0,71%	APC	15	p.Q1294GfsTer6	c.3880_3881delCA	5,41%	APC Q1294GfsTer6
84	1,96-2,36%	APC	15	p.R1114*	c.3340C>T	6,67%	APC R1114*
		TP53	7	p.G245S	c.733G>A	5,41%	TP53 G245S
88	0,06-0,08%	APC	15	p.H1490IfsTer17	c.4468delC	46,75%	APC H1490IfsTer17
		TP53	7	p.G245S	c.733G>A	84,70%	TP53 G245S
90	0,05- 0,06%	APC	15	p.R1114*	c.3340C>T	18,45%	APC R1114*
		APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delAAAGA	36,28%	TP53 R342STOP
		TP53	8	p.R282W	c.844C>T	44,74%	TP53 R282W
95	0,31-0,35%	TP53	7	p.I251SfsTer93	c.749_752delCCAT	35,93%	TP53 I251fs
98	0,81-1,04%	WT					WT
105	0,05-0,07%	TP53	7	p.I255F	c.763A>T	56,80%	RET p.V648I TP53 p.I255F
106	0,75-0,93%	PIK3ca	9	p.E542K	c.1624G>A	17,05%	PIK3ca E542K
		APC	15	p.Q1367*	c.4099C>T	14,00%	APC Q1367*
		TP53	5	p.P152L	c.455C>T	17,11%	TP53 P152L
107	0,78-1,05%	TP53	7	p.R248W	c.742C>T	1,75%	TP53 R248W
108	0,72-0,84%	TP53	5	p.R175H	c.524G>A	60,58%	TP53 R175H
111	0,44-0,71%	TP53	7	p.R248W	c.742C>T	61,23%	TP53 p.R248W
112	0,10-0,125	WT					BRAF G469A

125	0,53-0,59%	APC	15	p.F1491CfsTer22	c.4472_4473delTT	0,50%	APC F1491fs
		TP53	5	p.R196*	c.586C>T	0,85%	TP53 R196*
126	0,14-0,17%	TP53	5	p.R196*	c.586C>T	44,22%	PIK3CA delE110
							TP53 R196*
129	0,59-0,69%	WT					WT
130	0,96-1,21%	FBXW7	9	p.R465H	c.1394G>A	47,84%	FBXW7 R465H
		TP53	8	p.R273H	c.818G>A	50,18%	TP53 R273H
131	1,34-1,67%	APC	15	p.S1356*	c.4067C>G	2,24%	APC S1356*
		TP53	6	p.V216M	c.646G>A	0,40%	TP53 V216M
		TP53	5	p.C176F	c.527G>T	1,99%	TP53 C176F
137	0,10-0,13%	APC	15	p.P1453IfsTer20	c.4356_4358delACCinsTA	50,11%	APC P1453fs
		TP53	8	p.P278L	c.833C>T	54,43%	TP53 P278L
138	0,09 - 0,10%	TP53	8	p.V272M	c.814G>A	0,55%	pV272M TP53
139	0,27-0,30%	APC	15	p.Q1444*	c.4330C>T	24,39%	APC Q1444*
		APC	15	p.R876*	c.2626C>T	14,42%	APC R876*
							PTEN H118L
140	0,26- 0,29%	TP53	6	p.I195S	c.584T>G	3,13%	TP53 I195S
							ALK A1200V
141	0,43- 0,57%	PIK3ca	9	p.E545K	c.1633G>A	4,93%	PIK3CA E545K
							SMO R628Q
147	0,65- 0,71%	TP53	5	p.C135F	c.404G>T	0,24%	TP53 C135F
152	0,63-0,72%	APC	15	p.E1374*	c.4120G>T	20,00%	APC E1374*
		TP53	7	p.S241Y	c.722C>A	29,18%	TP53 S241Y
		SMAD4	9	p.Y328*	c.984C>G	28,31%	SMAD4 Y328*
168	0,13-0,16%	PIK3ca	20	p.H1047R	c.3140A>G	32,40%	PIK3ca H1047R
		KRAS	2	p.G12D	c.35G>A	35,39%	KRAS G12D
		TP53	5	p.V157F	c.469G>T	45,42%	TP53 V157F
							ERBB4 R168W
169	0,06-0,07%	APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delAAAGA	35,31%	APC E1309fs
		TP53	7	p.G245S	c.733G>A	73,70%	TP53 G245S
173	3,50-4,34%	TP53	5	p.V173M	c.517G>A	11,94%	pV173M TP53
176	2,55 - 3,18%	WT					PIK3CA R88Q
							ATM D2870N
178	0,47-0,57%	FBXW7	9	p.R465H	c.1394G>A	12,50%	FBXW7 R465H
		KRAS	2	p.G12V	c.35G>T	19,30%	KRAS G12V
		SMAD4	9	p.Y328*	c.984C>A	19%	SMAD4 Y328*
							PIK3ca N345K
180	1,94 - 2,29%	APC	15	p.R1450Ter	c.4348C>T	0,38%	APC R1450*
		TP53	8	p.R248W	c.742C>T	0,25%	TP53 R248W
186	1,60 - 1,87%	APC	15	p.Q1291*	c.3871C>T	3,59%	APC Q1291*
		SMAD4	9	p.D355E	c.1065C>A	6,70%	SMAD4 D355E
		TP53	7	p.G245S	c.733G>A	2,43%	TP53 G245S

187	0,05-0,07%	APC	15	p.R1450*	c.4348C>T	46,17%	APC R1450*
		KRAS	4	p.A146T	c.436G>A	98,00%	KRAS A146T
188	3,68-4,24%	APC	15	p.G1288*	c.3862G>T	1%	APC G1288*
		TP53	7	p.G245S	c.733G>A	2,62%	TP53 G245S
189	0,77-1,01%	TP53	8	p.R273C	c.817C>T	88,67%	TP53 R273C
		APC	15	p.E1286*	c.3856G>T	1,63%	APC E1286*
		SMAD4	9	p.E330Q	c.988G>C	79,31%	SMAD4 E330Q
190	1,93-2,22%	WT					TP53 Y163*

Tabella 4.6. Nella tabella sono rappresentate le mutazioni riscontrate nell'analisi su cfDNA mediante il pannello Oncomine colon cfDNA confrontate con le mutazioni riscontrate dall'analisi su tumore primario mediante pannello Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel. Il profilo mutazionale rilevato su cfDNA di questi 64 pazienti correlano con il profilo rilevato su tessuto.

La correlazione del profilo mutazionale tra biopsia liquida e tessuto è stata quindi possibile solo su 132 casi; di questi il 48,5% presenta una perfetta concordanza del profilo molecolare. Dalla tabella 4.6 si può notare che alcuni casi presentano delle discordanze (es. paziente n. 10, 19, 63) in quanto alcune mutazioni sono presenti solo nel tumore e non nel ctDNA o viceversa; in realtà questo si spiega considerando che per le due analisi sono stati utilizzati due pannelli differenti: per l'analisi del ctDNA è stato utilizzato l'Oncomine colon cfDNA assay mentre per il tessuto tumorale l'Ion Ampliseq cancer hotspot Panel che è più ampio: questi due pannelli hanno molte regioni target in comune, e per la correlazione sono state prese in considerazione solo queste.

N	LOD	GENE	EXON	HGVSp	HGVSc	FREQ	MUTAZIONI TESSUTO
1	1,08-1,36%	APC	15	p.F1491fs	c.4950_4951dup	0,69%	WT
		GNAS	8	p.R201H	c.602G>A	1,08%	
2	1,09-1,31%	TP53	5	p.W146*	c.438G>A	9,83%	WT
3	1,29-1,57%	APC	15	p.R1450*	c.4348C>T	4,44%	APC R1450*
		KRAS	2	p.G12D	c.35G>A	4,21%	PIK3CA A1035V
5	0,57-0,73%	PIK3ca	9	p.E545K	c.1633G>A	0,87%	SMAD4 R361C
		TP53	8	p.R273H	c.818G>A	8,52%	TP53 G245V
11	0,52-0,62%	EGFR	12	p.S492C	c.1474A>T	1,04%	TP53
		KRAS	3	p.Q61H	c.183A>T	1%	APC
12	1,36-1,62%	BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	1,08%	CTNNB1 S37C
16	0,59-0,72%	BRAF	15	p.L597R	c.1790T>G	0,87%	APC P1101L
		TP53	7	p.S241Y	c.722C>A	2,12%	SMAD4 P365S
17	0,39-0,54%						AKT A50T
		PIK3ca	20	p.H1047R	c.3140A>G	1,16%	
		FBXW7	9	p.R505C	c.1513C>T	12,58%	FBXW7 R505C
20	0,12-0,21%	TP53	8	p.R282W	c.844C>T	0,21%	TP53 R282W
		TP53	8	p.G279E	c.836G>A	0,31%	FBXW7 R465C
21	0,05-0,06%	APC	15	p.E1353*	c.4057G>T	57,00%	APC E1353*
		TP53	6	p.R196*	c.586C>T	47,81%	TP53 R196*
		GNAS	8	R201H	c.602G>A	0,53%	
23	0,24-0,41%	PIK3ca	9	p.E542K	c.1624G>A	0,30%	TP53 P190L
24	1,20-1,40%						MET Ps846f
		TP53	8	p.R273H	c.818G>A	1,24%	TP53 pR273H
							KRAS pG12D
25	1,5-2,33%	APC	15	p.Q1378*	c.4132C>T	53%	APC Q1378*
							NRAS Y4*
36	1,4-1,7%	NRAS	2	p.G13S	c.37G>A	1,16%	GNAS R201H
		PIK3ca	9	p.E545K	c.1633G>A	0,54%	PIK3ca E545K
40	0,08-0,1%	PIK3ca	9	p.E545K	c.1633G>A	53,18%	PIK3ca E545K
		TP53	7	p.T230fs	c.688dupA	8,10%	TP53 T230fs
		NRAS	2	p.G13C	c.37G>T	0,02%	
42	0,51-0,60%	APC	15	p.Q1291*	c.3871C>T	10,40%	APC Q1291*
		KRAS	4	p.A146T	c.436G>A	1,12%	
		TP53	7	p.N235KfsTer12	c.705_706delCTinsA	30,58%	TP53 N235fs
43	0,05-0,06%	PIK3ca	9	p.E542K	c.1624G>A	0,12%	
		APC	15	p.Q1367*	c.4099C>T	23,60%	APC Q1367*
		TP53	8	p.R280I	c.839G>T	79,80%	TP53 R280I
46	0,79-0,91%	APC	15	p.E1306*	c.3916G>T	5,94%	APC E1306*
		BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	1,90%	TP53 E343*
47	0,79-0,92%	BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	2,79%	KDR S281Y
		TP53	8	p.V274F	c.820G>T	2,66%	TP53 V274F
49	0,19 - 0,23%	APC	15	p.R1114*	c.3340C>T	33,78%	APC R1114*
		TP53	8	p.V274A	c.821T>C	58,20%	TP53 V274A
		ERBB2		p.A848T	c.2542G>A	0,15%	

52	0,37 - 0,46%	APC	15	p.I1401MfsTer14	c.4203delT	0,75%	KIT S821C
		TP53	5	p.A138P	c.412G>C	0,70%	
57	0,91-1,08%	APC	15	p.I1401MfsTer14	c.4203delT	10,60%	TP53 R175H SMAD4 R361C
		TP53	5	p.R175H	c.524G>A	6,20%	
		SMAD4	9	p.R361C	c.1081C>T	16%	
68	0,80-1%	APC	15	p.Q1378SfsTer8	c.4131_4132insT	4,42%	TP53 R248Q SMAD4 R361C
		TP53	7	p.R248Q	c.743G>A	7,42%	
		SMAD4	9	p.R361C	c.1081C>T	8,12%	
69	3,6-4,27%	BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	1,64%	APC Q1367*
		APC	15	p.Q1367*	c.4099C>T	1,11%	
		TP53	8	p.R273H	c.818G>A	0,69%	
75	1,83-2,26%	ERBB2	8	p.S310Y	c.929C>A	6,93%	PTEN C250fsTer5
77	0,53-0,66%	FBXW7	9	p.R479Q	c.1436G>A	2,31%	p.R479Q FBXW7
		TP53	5	p.P151S	c.451C>T	0,60%	
78	0,33-0,43%	PIK3ca	20	p.H1047L	c.3140A>T	34,80%	PIK3CA H1047L
		TP53	5	p.R175H	c.524G>A	58,64%	
83	1,23-1,54%	BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	0,96%	WT
85	0,88-1,1						PIK3CA E542K BRAF V600E
		BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	1,82	
86	0,75-0,85	NRAS	3	p.Q61H	c.183A>T	3,86%	TP53 S241del
		TP53	7	p.S241del	c.721_723delTCC	15,32%	
87	2,94 - 3,52%	WT					PIK3ca V344G TP53 R273H
92	0,13 - 0,15%	KRAS	2	p.G12C	c.34G>T	0,11%	TP53 E204*
		TP53	6	p.E204*	c.610G>C	0,53%	
97	0,51 - 0,61%	APC	15	p.E1408*	c.4222G>T	2,96%	PIK3ca E542K TP53 c.994-1
99	0,79-1,02%	TP53	5	p.R175H	c.524G>A	69,21%	TP53 R175H SMAD4 Q334*
		SMAD4	9	p.Q334*	c.1000C>T	62,28%	
		SMAD4	12	p.R515*	c.1543A>T	4,41%	
100	0,08-0,11%	PIK3ca	9	p.E545K	c.1633G>A	1,50%	TP53 R282W
		TP53	8	p.R282W	c.844C>T	53,95%	
		SMAD4	9	p.D351V	c.1052A>T	0,21%	
102	0,17-0,22%	APC	15	p.L1488FfsTer20	c.4463_4464insTT	7,56%	pQ828R PDGFRA
		BRAF	15	p.V600K	c.1798_1799delGTinsAA	0,29%	
		TP53	7	p.G245S	c.733G>A	21,51%	
104	0,17-0,28%	APC	15	p.L1488FfsTer20	c.4463_4464insTT	7,56%	APC L1488fs TP53 G245S
		BRAF	15	p.V600K	c.1798_1799delGTinsAA	0,28%	
		TP53	7	p.G245S	c.733G>A	21,51%	
110	0,49-0,55%	APC	15	p.Q1406*	c.4216C>T	2,90%	WT
		TP53	7	p.E258V	c.773A>T	0,57%	
116	0,96-1,25%	BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	0,22%	FBXW7 p.R465C TP53 p.R273C SMAD4 p.R361C
		TP53	8	p.R273C	c.817C>T	0,22%	
118	0,75-0,93%	PIK3ca	9	p.E545K	c.1633G>A	43%	PIK3ca E545K TP53 M246T
		APC	15	p.Q1406*	c.4216C>T	22%	
		TP53	7	p.M246T	c.737T>C	46,60%	

119	0,14-0,16%	PIK3ca	20	p.H1047R	c.3140A>G	26,23%	PIK3CA p.H1047R
		BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	0,18%	
		TP53	5	p.R175H	c.524G>A	0,07%	
		TP53	8	p.R273C	c.817C>T	25,11%	TP53 p.R273C
120	0,61-0,73%	KRAS	4	p.A146T	c.436G>A	0,25%	TP53 R342*
		ERBB2	8	p.L313I	c.937C>A	0,22%	
122	1,97-2,13%	APC	15	p.L1382TfsTer4	c.4142_4143insC	19,26%	WT
123	0,19-,022%	FBXW7	10	p.R479Q	c.1436G>A	2,01%	
		APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delAAAGA	2,81%	
		TP53	7	p.R248Q	c.743G>A	39,59%	TP53 R248Q
124	0,08-0,09%	FBXW7	11	p.A599E	c.1796C>A	24,32%	APC G1312E
		APC	15	p.G1312EfsTer9	c.3935delG	48,71%	SMAD4 R496H
		TP53	7	p.R248Q	c.743G>A	30,80%	TP53 R248Q
127	0,64-0,74%	TP53	7	p.G245S	c.733G>A	17,05%	TP53 G245S
		BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	0,25%	SMAD4 W524C
128	1,18-1,47%	APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delAAAGA	1,38%	
		TP53	8	p.E285K	c.853G>A	2,72%	TP53 E285K
134	3,25-3,93%	BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	2,82%	APC Q1429*
		TP53	5	p.P153AfsTer28	c.455_456insC	6,19%	KRAS G12D
		TP53	8	p.R282W	c.844C>T	31,36%	TP53 R282W
136	0,16-0,20%	APC	15	p.Q1406*	c.4216C>T	45,26%	
		TP53	5	p.R175H	c.524G>A	46,80%	TP53 R175H
142	0,35 - 0,42%	FBXW7	10	p.M522DfsTer10	c.1563_1564insG	2,10%	APC S1346*
146	1,98-2,49%	APC	15	p.E1309fs	c.3927_3931delAAAGA	2,18%	APC E1309fs
							KRAS p.G12D
148	1,44 - 1,65%	TP53	7	p.I255del	c.759_761delICAT	10,90%	WT
149	0,68-0,8%	PIK3ca	20	p.H1047R	c.3140A>G	2%	
		APC	15	p.E1408*	c.4222G>T	8%	
		KRAS	2	p.G12D	c.35G>A	1%	
		TP53	5	p.R175H	c.524G>A	18%	TP53 R175H
		TP53	5	p.V157F	c.469G>T	1,43%	
151	0,78 - 1,01%	PIK3ca	20	p.D1045V	c.3134A>T	10%	WT
		PIK3ca	20	p.H1047R	c.3140A>G	10%	
		TP53	8	p.R248Q	c.743G>A	4,41%	
153	1,12-1,39%	TP53	7	p.G245D	c.734G>A	0,34%	TP53 G245D
		TP53	5	p.F134C	c.401T>G	1,12%	APC Y1376fs
157	0,19-0,23%	TP53	5	p.G154AfsTer14	c.460_466delGGCACCC	0,18%	TP53 R273H
158	0,23-0,27%	APC	15	p.A1305QfsTer3	c.3913delG	43,20%	APC .A1305fs
		KRAS	2	p.G12A	c.35G>C	1,30%	
		TP53	7	p.G245S	c.733G>A	38,92%	TP53 p.G245S
159	0,40-0,48%	APC	15	p.Y935*	c.2804_2805insA	0,32%	WT
		BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	0,87%	
164	0,30-0,39%	APC	15	p.R876*	c.2626C>T	45,60%	APC R876*
		TP53	5	p.L137DfsTer11	c.409_412delCTGGinsGA	47,18%	
165	0,28-0,35%	APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delAAAGA	54,00%	APC E1309fs
		BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	6,61%	
		TP53	8	p.T284RfsTer21	c.851_852delCA	64,13%	TP53 T284fs

165	0,28-0,35%	APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delAAAGA	54,00%	APC E1309fs
		BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	6,61%	
		TP53	8	p.T284RfsTer21	c.851_852delCA	64,13%	TP53 T284fs
166	0,78-0,94%	BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	6,80%	APC K1310*
		GNAS	8	p.R201H	c.602G>A	0,49%	TP53 P190L
171	1,12- 4,27%	KRAS	3	p.Q61H	c.183A>C	1,19%	KRAS Q61H
							TP53 R248H
174	0,65-0,81%	APC	15	p.S1400*	c.4199C>A	66,54%	KDR N245I
		TP53	5	p.R196*	c.586C>T	75,64%	TP53 R196*
177	1,26-1,57%	TP53	6	p.H193R	c.578A>G	0,40%	APC R876*
							TP53 S127P
179	3,03-3,56%	WT					SMAD4 L529Y
							TP53 .Y126C
181	0,80-1,01%	APC	15	p.S1400*	c.4199C>A	44,33%	
		TP53	6	p.S215G	c.643A>G	38,71%	TP53 S215G
182	2,31-2,69%	TP53	7	p.M237CfsTer10	c.709delA	3,39%	TP53 M237fs
		APC	15	p.S1411RfsTer4	c.4233delT	1,18%	
184	1,04-1,26%	TP53	8	p.C275F	c.824G>T	67%	APC G1288*
							TP53 R248Q

Tabella 4.7. Nella tabella sono rappresentate le mutazioni riscontrate nell'analisi su cfDNA mediante il pannello Oncomine colon cfDNA confrontate con le mutazioni riscontrate dall'analisi su tumore primario mediante pannello Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel. Il profilo mutazionale rilevato su cfDNA di questi 68 pazienti non correla con il profilo rilevato su tessuto.

Il 51,5% dei pazienti presenta invece un profilo mutazionale differente (Tabella 4.7); difatti l'analisi del ctDNA mostra mutazioni diverse ed in molti casi, mutazioni supplementari rispetto all'analisi tissutale.

In particolare, considerando le mutazioni in RAS e BRAF:

- nell'analisi del ctDNA sono state rilevate 7 mutazioni esclusive in KRAS (pazienti n. 3, 11, 42, 92, 120, 149, 158) con un range di frequenza allelica di 0,11%-4,21%, e 3 mutazioni in NRAS (pazienti n. 36, 40, 86) con un range di frequenza allelica di 0,02%-3,86%.
- nell'analisi del ctDNA sono state rilevate 15 mutazioni esclusive in BRAF (pazienti n. 12, 16, 46, 47, 69, 83, 85, 102, 104, 116, 119, 127, 134, 159, 165, 166), con un range di frequenza allelica di 0,18%-6,8%.

In alcuni pazienti con tessuto primario wild-type, l'analisi su ctDNA ha evidenziato la presenza di mutazioni (pazienti n. 1, 2, 83, 110, 122, 148, 151, 159); nella maggior parte dei pazienti, l'analisi su ctDNA rileva mutazioni supplementari rispetto a quelle presenti nel tumore

primario che potremmo definire come driver, mentre altri presentano un profilo molecolare completamente diverso (esempio paziente n. 5, 11, 16, 23, 52, 102, 166, 177, 184).

Infine si possono evidenziare dei casi in cui l'analisi del ctDNA non presenta alcuna mutazione (pazienti n. 83 e 179) rispetto all'analisi tissutale: in questi casi il LOD medio è intorno al 3%, quindi l'analisi non è in grado di rilevare mutazioni al di sotto di questa frequenza allelica.

N	LOD	GENE	EXON	HGVSp	HGVSc	FREQ.	MUTAZIONI TESSUTO
15	1-1,29%	APC	15	p.S1400*	c.4199C>A	0,48%	NV
30	0,14-0,018%	KRAS	2	p.G12D	c.35G>A	17,80%	NV
65	0,74-0,89%	APC	15	p.N1113IfsTer13	c.3338delA	1,25%	NV
73	0,05-0,06%	APC	15	p.E1317*	c.3949G>T	22,26%	NV
		TP53	8	p.D281E	c.843C>A	63,71%	
82	0,13-0,16%	APC	15	p.R876*	c.2626C>T	12,27%	NV
		TP53	8	p.G266E	c.797G>A	47,75%	
114	0,41-0,51%	APC	15	p.R1450*	c.4348C>T	1,10%	NV
		FBXW7	9	p.R465C	c.1393C>T	0,42%	
115	0,19-0,22%	TP53	7	p.R248Q	c.743G>A	31,43%	NV
		TP53	5	p.R175H	c.524G>A	36,70%	
117	0,87-1,23%	TP53	7	p.L257R	c.770T>G	24%	NV
132	1,67-2,2%	APC	15	p.Q1367*	c.4099C>T	10,93%	NV
145	3,34- 4,21%	WT					NV
154	1,17 - 1,34%	APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delAAAGA	1,22%	NV
160	0,04-0,06%	APC	15	p.I1307K	c.3920T>A	33,73%	NV
		TP53	7	p.E258K	c.772G>A	53,44%	
		TP53	6	p.R196*	c.586C>T	11,49%	
175	1,33 - 1,53%	PIK3ca	20	p.H1047R	c.3140A>G	0,84%	NV
		TP53	5	p.R158L	c.473G>T	0,49%	
		TP53	5	p.V157F	c.469G>T	12,93%	

Tabella 4.8. Nella tabella sono rappresentate le mutazioni riscontrate nell'analisi su cfDNA mediante il pannello Oncomine colon cfDNA di 13 pazienti sui quali l'analisi tissutale non ha prodotto dati valutabili

N	LOD	GENE	EXON	HGVSp	HGVSc	FREQ.
34	0,08-0,09%	WT				
56	1,23-1,36%	WT				
59	0,15-0,18%	PIK3ca	20	p.M1043V	c.3127A>G	55,54%
62	0,68-0,81%	TP53	7	p.Y236H	c.706T>C	0,44%
71	0,76-0,98%	APC	15	p.I1307NfsTer8	c.3919_3920insA	1,43%
		TP53	7	p.R248Q	c.743G>A	1,35%
76	0,11-0,15%	APC	15	p.F1491LfsTer16	c.4473delT	40,69%
		TP53	8	p.R273H	c.818G>A	79,81%
80	1,35-1,6%	APC	15	p.S1400*	c.4199delC	9,36%
89	0,10-0,15%	TP53	8	p.V274L	c.820G>C	79,12%
		TP53	8	p.G266*	c.796G>T	0,07%
91	0,05 - 0,05%	BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	0,85%
		TP53	8	p.R282W	c.844C>T	0,67%
93	0,13 - 0,16%	BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	2,44%
		TP53	5	p.K132R	c.395A>G	0,11%
94	0,16 - 0,17%	BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	2,46%
		TP53	7	p.R248Q	c.743G>A	1,04%
96	0,41 - 0,47%	APC	15	p.R805*	c.2413C>T	34,06%
		TP53	7	p.R248Q	c.743G>A	17,89%
101	0,11-0,14%	APC	15	p.K1363*	c.4087A>T	47,11%
		BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	0,18%
		TP53	6	p.L194R	c.581T>G	65,43%
143	0,09 - 0,12%	WT				
144	0,31-0,38%	TP53	7	p.M237I	c.711G>T	45,04%
150	1,57 - 2,00%	WT				
155	1,91-2,32%	PIK3CA	9	p.E545K	c.1633G>A	2%
		KRAS	4	p.A146T	c.436G>A	0,98%
		TP53	7	p.R248Q	c.743G>A	0,65%
161	0,19-0,22%	TP53	6	p.R196*	c.586C>T	60,41%
162	1,42-1,67%	APC	15	p.N1113LfsTer13	c.3338delA	1,14%
		TP53	5	p.R175H	c.524G>A	8,68%
163	0,30-0,38%	SMAD4	9	p.R361H	c.1082G>A	6,14%
167	0,66 - 0,79%	TP53	5	p.V157F	c.469G>T	0,75%
183	0,10 - 0,14%	TP53	8	p.C275F	c.824G>T	77%
185	0,20- 0,24%	PIK3ca	9	p.E545K	c.1633G>A	0,14%
		APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delAAAGA	67,50%

Tabella 4.9. Nella tabella sono rappresentate le mutazioni riscontrate nell'analisi su cfDNA mediante il pannello Oncomine colon cfDNA di 23 pazienti dei quali il tessuto del tumore primario non era disponibile.

La correlazione del profilo molecolare dei pazienti con gli endpoint di attività ed efficacia previsti dal protocollo sono attualmente in corso.

5. Discussione

5.1 STUDIO CRICKET

L'associazione di un anticorpo monoclonale anti-*EGFR* (cetuximab o panitumumab) con un doppietto chemioterapico è una valida opzione di trattamento di prima linea per i pazienti con mCRC RAS e BRAF wild-type. (Salvatore et al., 2017).

Uno studio retrospettivo ha evidenziato la potenziale efficacia di reintrodurre cetuximab in pazienti che sono diventati resistenti alla prima linea di chemioterapia più cetuximab (Santini et al., 2012). Nonostante si tratti di uno studio retrospettivo, questa scoperta è supportata da un razionale biologico; in effetti, l'insorgenza di mutazioni RAS nei tumori inizialmente RAS wild-type è un meccanismo ben noto di resistenza acquisita agli anti-EGFR (Siravegna et al., 2015; Van Emburgh et al., 2016). Al momento non è chiaro se questo evento possa essere dovuto all'acquisizione tardiva di queste mutazioni da parte di subcloni cellulari o alla selezione progressiva di subcloni mutati inizialmente non rilevabili. Secondo quest'ultima ipotesi, una terapia a base di anti-EGFR sarebbe in grado di diminuire sostanzialmente la maggior parte delle cellule sensibili (wild-type), rendendo così progressivamente predominanti i cloni resistenti (mutanti) fino all'evidenza clinica della progressione della malattia. Durante un successivo trattamento non a base di anti-EGFR, i cloni sensibili verrebbero almeno parzialmente ripristinati, ponendo così le basi per l'attività potenziale di rechallenge con anti-EGFR.

Più recentemente, una quantità crescente di prove molecolari ha evidenziato l'eterogeneità intratumorale del CRC e l'evoluzione clonale sotto la pressione esercitata dai trattamenti. In particolare, risultati preliminari hanno evidenziato la rilevanza biologica del DNA tumorale circolante (ctDNA) come strumento estremamente sensibile per documentare l'eterogeneità tumorale in quanto mediante un prelievo di sangue è possibile valutare l'intero assetto mutazionale del tumore rispetto al prelievo tissutale; inoltre mediante prelievi ripetuti potrebbe essere possibile valutare l'evoluzione molecolare del tumore per poter guidare potenziali strategie di adattamento della terapia (Siravegna et al., 2015; Pietrantonio et al., 2017; Burrell et al., 2014).

L'insorgenza delle mutazioni RAS al momento della progressione della malattia dopo la chemioterapia di prima linea più anti-EGFR può essere seguita da una diminuzione della frazione di cloni *Ras^{mut}* acquisiti - anche a livelli non rilevabili - dopo la sospensione del blocco EGFR.

Lo studio Cricket è stato progettato per valutare prospetticamente la strategia di rechallenge con cetuximab + irinotecan come trattamento di terza linea per i pazienti che hanno avuto una risposta iniziale e poi una progressione con una terapia di prima linea con cetuximab + irinotecan e che hanno ricevuto una seconda linea a base di oxaliplatino con bevacizumab. Per la valutazione del ctDNA, è stata effettuata la raccolta di campioni di biopsia liquida dai pazienti arruolati per indagare la presenza di potenziali meccanismi di resistenza acquisita agli anticorpi monoclonali anti-EGFR.

In definitiva sono stati arruolati 25 pazienti, classificati alla diagnosi come RAS^{wt}, di cui è stato analizzato il ctDNA mediante analisi NGS e digital droplet PCR; 12 pazienti (48%) sono stati riclassificati come mutati, dimostrando la selezione di cloni RAS^{mut} durante il trattamento in prima linea con cetuximab ed evidenziando l'affidabilità della biopsia liquida come strumento per impostare strategie terapeutiche. Nessuno dei pazienti con mutazioni RAS nel ctDNA all'inizio del rechallenge ha ottenuto una risposta rendendo quindi la scelta di rechallenge inadatta. Solo nel paziente n. 24 è stata rilevata la mutazione KRAS G12D nel ctDNA al 3% di frequenza al baseline, ed ha presentato una risposta transitoria al rechallenge; una potenziale spiegazione è che si sia verificata una riduzione significativa della sua frequenza dal momento della progressione della malattia al trattamento di prima linea, suggerendo così una diminuzione dei cloni mutanti e una contemporanea prevalenza di cellule wild-type durante la terapia di seconda linea; difatti alla progressione la frazione di cloni mutati è aumentata al 17%.

13 pazienti non avevano mutazioni RAS nel ctDNA e 4 di questi (31%) hanno avuto una risposta confermata al trattamento (Tabella 4.4).

Interessante anche il paziente n. 3 che al baseline risultava essere wild-type, mentre alla seconda rivalutazione presentava una mutazione in SMO p.A612T, BRAF p.G593D e ATM p.N1801D (Tabella 4.3). Queste mutazioni sono varianti rare: la mutazione in SMO è stata ritrovata una sola volta in un caso di melanoma (COSM3922682), la mutazione in ATM è classificata come variante a significato incerto sul database Clinvar e la mutazione in BRAF è stata riscontrata in diversi lavori ma il suo ruolo non è del tutto chiarito: cellule trasfettate con BRAF^{G593D} mostrano effetti sulla fosforilazione di ERK simili alle cellule BRAF^{wt} (Acquaviva et al., 2020). Alla progressione, il paziente presentava una mutazione in KRAS p.G13D al 3% ed una mutazione di STK11 p.R333H al 2% non rilevate in precedenza; la mutazione in STK11 è

classificata come variante a significato incerto (Clinvar db) ed è stata riscontrata in un caso di adenocarcinoma intestinale (COSM6972039).

Correlando i dati clinici con i dati molecolari, è stato dimostrato che i pazienti mutati, presentano una overall survival inferiore (12.5 mesi vs 5.2 mesi nel ctDNA RAS mutati) ed una progression free survival inferiore (4 mesi vs 1.9 mesi nei ctDNA mutati) rispetto ai pazienti wt: questo dimostra la fattibilità dell'utilizzo della biopsia liquida per monitorare l'andamento della malattia durante il trattamento, individuando precocemente il momento in cui il tumore sviluppa resistenza e di conseguenza dando la possibilità di individuare i pazienti ai quali la terapia può essere riproposta.

I campioni di ctDNA sono stati analizzati anche mediante ddPCR; è presente una incongruenza tra i dati di NGS e ddPCR: il paziente n. 21 secondo l'analisi NGS presentava al baseline una mutazione in APC ed una mutazione TP53, mentre i dati della ddPCR rilevano una mutazione in KRAS G12D; questo rivela una sensibilità inferiore dell'analisi NGS rispetto alla ddPCR.

Questo si può spiegare in quanto è stato utilizzato un pannello validato per l'utilizzo sul tessuto, che anche se messo a punto per l'analisi su biopsia liquida, risulta attualmente essere inadeguato per l'analisi del cfDNA: in particolare, i pannelli di targeted sequencing standard, usati largamente in clinica per l'analisi molecolare dei campioni di tessuto, hanno una sensibilità di circa l'1- 2% che ne limita la possibilità di utilizzo per i test su ctDNA. (Ranchiglio et al., 2016).

Inoltre la percentuale di campioni non valutabili in questo studio è stata molto alta; su un totale di 43 campioni analizzati, in ben 17 casi (32,6%) non è stato possibile effettuare l'analisi dei dati in quanto non erano soddisfatti i parametri minimi di qualità per assicurare una sensibilità dell'1%.

Attualmente sono disponibili in commercio dei pannelli NGS ottimizzati per l'utilizzo su ctDNA; questi pannelli, combinano tecnologie per l'arricchimento del DNA mutato, molecular barcoding, elevato coverage e pipelines bioinformatiche dedicate, che consentono di rilevare diverse tipologie di alterazioni geniche anche a frequenze alleliche molto basse; inoltre, l'utilizzo di pannelli ad hoc consente in molti casi di ridurre in maniera significativa il tasso di falsi positivi dovuti ad artefatti di sequenziamento che sono relativamente frequenti per varianti a bassa frequenza allelica (Stetson et al., 2019).

A tal proposito per l'analisi del ctDNA per i pazienti dello studio Valentino, abbiamo utilizzato il pannello Oncomine colon cfDNA che ci consente di rilevare mutazioni presenti ad una frequenza $>0,05-0,1\%$ (Figura 3.1).

5.2 Studio Valentino

Il 5-fluorouracile (5-FU) con leucovorin (LV) e oxaliplatino (FOLFOX) è un regime chemioterapico utilizzato per il trattamento di prima linea dei pazienti mCRC.

I risultati dello studio PRIME di fase 3 hanno mostrato che l'aggiunta dell'anticorpo monoclonale anti-EGFR panitumumab con FOLFOX-4 ha migliorato l'esito clinico nei pazienti i cui tumori non presentavano mutazioni nei codoni 12 e 13 (esone 2) di *KRAS* (Douillard et al., 2010).

Oltre alle mutazioni nell'esone 2 di *KRAS*, mutazioni che si verificano negli esoni 3 o 4 di *KRAS* o negli esoni 2-4 di *NRAS* si sono recentemente dimostrati predittori negativi nei pazienti che ricevono terapia anti-EGFR con cetuximab o panitumumab in combinazione con la chemioterapia in malattia chemorefrattaria (Douillard et al., 2013). Difatti, l'uso di cetuximab e panitumumab è stato limitato dall'autorità di regolamentazione europea (EMA) ai pazienti non portatori di alcuna mutazione nei geni *KRAS* o *NRAS* codone 12, 13, 59, 61, 117 e 146, definiti come pazienti RAS wild-type.

Negli studi registrativi sui chemioterapici con o senza agenti biologici, è stata programmata la continuazione del trattamento fino a progressione della malattia o fino all'avvento di effetti tossici inaccettabili quali la neurotossicità cumulativa correlata all'oxaliplatino. Studi hanno dimostrato che, diminuendo l'intensità della chemioterapia durante il mantenimento, si riduce significativamente il carico di tossicità senza compromettere la OS. Attualmente, la migliore strategia di mantenimento è stata raggiunta con *bevacizumab* e fluoropirimidina.

Esistono scarse evidenze sulla strategia di mantenimento con i farmaci anti-EGFR, come *panitumumab*, in pazienti che ottengono un iniziale controllo di malattia dopo induzione con una chemioterapia standard associata al farmaco biologico. Lo studio di fase II MACRO-2 ha mostrato la non inferiorità in termini di PFS della terapia di mantenimento con cetuximab da solo rispetto alla combinazione con FOLFOX, ma si tratta di uno studio limitato che necessita di studi più ampi (Aranda et al., 2018).

Lo studio Valentino ha arruolato prospetticamente 229 pazienti con mCRC RAS wild-type per valutare quale sia la terapia di mantenimento più efficace tra panitumumab in monoterapia e la combinazione di panitumumab con 5-FU/Lv.

Lo studio ha dimostrato che la terapia di mantenimento con panitumumab + 5-FU/Lv risulta essere superiore in termini di PFS rispetto a panitumumab in monoterapia; ciò consente al paziente di evitare l'esposizione all'oxaliplatino garantendo la stessa efficacia ed eliminando la tossicità dovuta al suo utilizzo prolungato (Pietrantonio et al., 2019).

Il secondo scopo dello studio è quello di indagare potenziali biomarcatori e la loro correlazione con gli endpoint di attività ed efficacia e valutare in modo prospettico l'importanza clinica delle alterazioni rilevate nel ctDNA e il loro ruolo come driver e meccanismi potenzialmente farmacologici, confrontandoli con il profilo molecolare del tessuto tumorale.

A tale scopo è stata condotta l'analisi NGS su ctDNA di 190 pazienti e l'analisi NGS sul tessuto tumorale primitivo di 145 pazienti; di questi era stata condotta nei vari centri locali, l'analisi su RAS e BRAF e selezionati come wild-type.

L'utilizzo del pannello Oncomine colon cfDNA ha migliorato di molto l'analisi delle biopsie liquide, difatti in questa casistica la percentuale di casi non valutabili è stata dell'11,6% vs il 32,6% della casistica dello studio Cricket. Inoltre ha garantito una sensibilità molto alta per la maggior parte dei casi, partendo da un LOD dello 0,05%: ciò ha permesso di individuare delle mutazioni a bassissima frequenza e ad alta specificità. In particolare, l'utilizzo di barcodes molecolari, definiti anche unique molecular identifiers (UMI), associato a pipelines bioinformatiche ottimizzate, consente di ridurre in maniera significativa il tasso di falsi positivi. Dall'analisi si evince che i geni più mutati sono TP53 con il 73,8% dei casi e il gene APC per il 45,8%, entrambi sono i geni più mutati nei tumori CRC e possono essere presi di riferimento per seguire l'evoluzione molecolare del tumore; l'analisi del ctDNA ha rilevato inoltre la presenza di mutazioni RAS nel 10,1% dei pazienti, e la presenza di mutazioni BRAF nel 12,5% dei pazienti; ciò rafforza il dato che l'analisi della biopsia liquida permette di individuare precocemente le mutazioni e di monitorare la resistenza in corso di trattamento con anti-EGFR; inoltre l'individuazione di mutazioni quali BRAF e MEK (1 caso individuato in questa casistica) apre la strada a nuove possibilità terapeutiche (Kopetz et al., 2019).

Sono state rilevate mutazioni nel gene PIK3ca nel 14,3% dei pazienti; attualmente sono in corso diversi studi clinici sugli inibitori di PIK3 (van Geel et al., 2017), e l'individuazione precoce di queste mutazioni permetterebbe l'arruolamento dei pazienti in studi clinici dedicati.

Inoltre sono state individuate mutazioni in SMAD4 nel 6% dei pazienti, in FBXW7 nel 4,8% e nei geni ERBB2 e GNAS in circa il 2% dei pazienti.

L'analisi del ctDNA ha rivelato mutazioni che non sono state rilevate nel tessuto abbinato: studi mostrano che il confronto dei dati di analisi NGS su ctDNA con i dati di sequenziamento su tessuto primitivo del tumore, solitamente mostra un basso livello di concordanza (Agarwal et al., 2018); al netto degli artefatti di sequenza, che mediante le nuove tecnologie di sequenziamento sono ridotte al minimo, tale discordanza può essere dovuta alla eterogeneità del tumore.

La rilevazione di mutazioni mediante l'analisi del ctDNA non individuate nel tessuto tumorale primitivo corrispondente, dimostra che il sangue cattura in modo più completo l'eterogeneità della malattia intra-paziente. Di fatto, la genotipizzazione del tessuto tumorale ha limitazioni intrinseche; è stato dimostrato che il profilo genomico del tumore primario e delle metastasi non sono sempre concordanti a causa dell'intrinseca eterogeneità molecolare della malattia (Siravegna et al., 2015); la biopsia liquida è in grado di superare l'eterogeneità spaziale e temporale che limitano l'analisi tissutale.

Inoltre, la terapia farmacologica può alterare il panorama molecolare del tumore e ciò fa sì che i profili genomici dei pazienti con CRC dovrebbero essere valutati ripetutamente durante il corso della terapia. La biopsia liquida è sicuramente uno strumento utile per il monitoraggio dell'evoluzione molecolare dei tumori colorettali in corso di trattamento.

Nonostante i dati dello studio Valentino siano ancora parziali, si mostrano promettenti; i dati definitivi relativi all'attività ed efficacia del trattamento in correlazione ai dati molecolari saranno disponibili nel prossimo futuro e potrebbero rivelarsi utili per poter identificare dei sottogruppi di pazienti che possono beneficiare di alcune strategie di trattamento specifiche.

6. Conclusioni

Sempre più studi stanno mostrando il ruolo positivo della biopsia liquida come strumento utile al monitoraggio della dinamicità evolutiva molecolare dei tumori colorettali in corso dei trattamenti; lo studio Cricket ha dimostrato come una strategia di rechallenge con cetuximab può essere attiva in pazienti con mCRC wild-type RAS e BRAF con resistenza acquisita alla terapia di prima linea. La valutazione dello stato mutazionale di RAS su ctDNA si rivela fondamentale nella selezione dei pazienti candidati; difatti, il riconoscimento precoce di mutazioni della resistenza primaria consentirebbe un arruolamento rapido in studi clinici dedicati.

Inoltre i primi dati relativi dello studio Valentino ci mostrano come la biopsia liquida sia in grado di evidenziare l'eterogeneità intratumorale del CRC che è sostanzialmente trascurata dalle biopsie tumorali.

Attualmente per il colon-retto, l'utilizzo della biopsia liquida è raccomandata solo all'interno degli studi clinici e di laboratorio, ma è auspicabile l'introduzione nella pratica clinica di routine, in un'ottica di miglioramento della stratificazione e personalizzazione delle terapie mediante un monitoraggio non invasivo della progressione della malattia in tempo reale.

7. Bibliografia

1. Acquaviva G., de Biase D., Diquigiovanni C., Argento C. M., De Leo A., Bonora E., Rhoden K. J., Pession A., Tallini G. (2020). BRAF exon 15 mutations in papillary carcinoma and adjacent thyroid parenchyma: a search for the early molecular events associated with tumor development. *Cancers*, 12:430. doi: 10.3390/cancers12020430
2. Agarwal N., Lanman R. B., Pal S. K. (2018). Regarding the congruence between 2 circulating tumor DNA sequencing assays. *JAMA Oncology*, 4:1429-1430. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2317
3. Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM). (2019, Ottobre). Linee guida Tumori del colon. Edizione 2019. Disponibile 1 Settembre, 2020, da https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2019/10/2019_LG_AIOM_Colon-1.pdf
4. Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM) - Associazione Italiana dei Registri Tumori (AIRTUM). (2019, Settembre) I numeri del cancro in Italia 2019. Disponibile 1 Settembre, 2020, da https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2019/09/2019_Numeri_Cancro-operatori-web.pdf.
5. American Cancer Society (2020). Colorectal Cancer Facts & Figures 2020-2022. Atlanta: American Cancer Society; 2020. Disponibile 1 Settembre, 2020, da <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/colorectal-cancer-facts-and-figures/colorectal-cancer-facts-and-figures-2020-2022.pdf>.
6. André T., Boni C., Navarro M., Tabernero J., Hickish T., Topham C., Bonetti A., Clingan P., Bridgewater J., Rivera F., de Gramont A. (2009). Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *Journal of Clinical Oncology*, 27:3109-3116. doi: 10.1200/JCO.2008.20.6771
7. Andre T., Shiu K. K., Kim T. W., Jensen B. V., Jensen L. H., Punt C. J. A., Smith D. M. Garcia-Carbonero R., Benavides M., Gibbs P., De La Fouchardiere C., Rivera F., Elez E., Bendell J. C., Le D. T., Yoshino T., Yang P., Farooqui M. Z. H., Marinello P., Diaz L. A. (2020). Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high/mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer: the phase 3 KEYNOTE-177 study. *Journal of Clinical Oncology*, 38(18_suppl):LBA4. doi: 10.1200/JCO.2020.38.18_suppl.LBA4

8. Aprile G., Macerelli M., Giuliani F. (2013). Regorafenib for gastrointestinal malignancies: from preclinical data to clinical results of a novel multi-target inhibitor. *BioDrugs*, 27:213-224. doi: 10.1007/s40259-013-0014-9
9. Aranda E., García-Alfonso P., Benavides M., Sánchez Ruiz A., Guillén-Ponce C., Safont M. J., Alcaide J., Gómez A., López R., Manzano J. L., Méndez Ureña M., Sastre J., Rivera F., Grávalos C., García T., Martín-Valadés J. I., Falcó E., Navalón M., González Flores E., García Tapiador A. M., López Muñoz A. M., Barrajón E., Reboredo M., García Teijido P., Viudez A., Cárdenas N., Díaz-Rubio E., Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumours (TTD). (2018). First-line mFOLFOX plus cetuximab followed by mFOLFOX plus cetuximab or single-agent cetuximab as maintenance therapy in patients with metastatic colorectal cancer: phase II randomised MACRO2 TTD study. *European Journal of Cancer*, 101:263-272. doi: 10.1016/j.ejca.2018.06.024
10. Bagnardi V., Rota M., Botteri E., Tramacere I., Islami F., Fedirko V., Scotti L., Jenab M., Turati F., Pasquali E., Pelucchi C., Galeone C., Bellocco R., Negri E., Corrao G., Boffetta P., La Vecchia C. (2015). Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 112:580-593. doi: 10.1038/bjc.2014.579
11. Bardelli A., Siena S. (2010). Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28:1254-61. doi: 10.1200/JCO.2009.24.6116
12. Bienz M., Clevers H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, 103:311-320. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00122-7
13. Bonadona V., Bonaïti B., Olschwang S., Grandjouan S., Huiart L., Longy M., Guimbaud R., Buecher B., Bignon Y. J., Caron O., Colas C., Noguès C., Lejeune-Dumoulin S., Olivier-Faivre L., Polycarpe-Osaer F., Nguyen TD., Desseigne F., Saurin J.C., Berthet P., Leroux D., Duffour J., Manouvrier S., Frébourg T., Sobol H., Lasset C., Bonaïti-Pellié C.; French Cancer Genetics Network. (2011). Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *Journal of the American Medical Association*, 305:2304-2310. doi: 10.1001/jama.2011.743. PMID: 21642682
14. Burrell R. A., Swanton C. (2014). Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Molecular Oncology*, 8:1095-1111. doi: 10.1016/j.molonc.2014.06.005

15. Chibaudel B., Maindrault-Goebel F., Lledo G., Mineur L., André T., Bennamoun M., Mabro M., Artru P., Carola E., Flesch M., Dupuis O., Colin P., Larsen A. K., Afchain P., Tournigand C., Louvet C., de Gramont A. (2009). Can chemotherapy be discontinued in unresectable metastatic colorectal cancer? The GERCOR OPTIMOX2 study. *Journal of Clinical Oncology*, 27:5727-5733. doi:10.1200/JCO.2009.23.4344
16. Cocco E., Benhamida J., Middha S., Zehir A., Mullaney K., Shia J., Yaeger R., Zhang L., Wong D., Villafania L., Nafa K., Scaltriti M., Drilon A., Saltz L., Schram A. M., Stadler Z. K., Hyman D. M., Benayed R., Ladanyi M., Hechtman J. F. (2019). Colorectal carcinomas containing hypermethylated MLH1 promoter and wild-type BRAF/KRAS are enriched for targetable kinase fusions. *Cancer Research*, 79:1047–1053. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3126
17. Cohen R., Pudlarz T., Delattre J. F., Colle R., André T. (2020) Molecular targets for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancers (Basel)*, 12:E2350. doi: 10.3390/cancers12092350.
18. Cremolini, C., Rossini, D., Dell'Aquila, E., Lonardi, S., Conca, E., Del Re, M., Busico, A., Pietrantonio, F., Danesi, R., Aprile, G., Tamburini, E., Barone, C., Masi, G., Pantano, F., Pucci, F., Corsi, D. C., Pella, N., Bergamo, F., Rofi, E., Barbara, C., ... Santini, D. (2019). Rechallenge for Patients With RAS and BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer With Acquired Resistance to First-line Cetuximab and Irinotecan: A Phase 2 Single-Arm Clinical Trial. *JAMA oncology*, 5(3), 343–350. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.5080>
19. Cunningham D., Atkin W., Lenz H. J., Lynch H. T., Minsky B., Nordlinger B., Starling N. (2010). Colorectal cancer. *The Lancet*, 375:1030-1047. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60353-4.
20. Cunningham D., Humblet Y., Siena S., Khayat D., Bleiberg H., Santoro A., Bets D., Mueser M., Harstrick A., Verslype C., Chau I., Van Cutsem E. (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 351:337-345. doi: 10.1056/NEJMoa033025.
21. Cunningham D., Lang I., Marcuello E., Lorusso V., Ocvirk J., Shin D. B., Jonker D., Osborne S., Andre N., Waterkamp D., Saunders M. P.; AVEX study investigators. (2013). Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with

- previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 14:1077-1085. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70154-2.
22. De Rosa M., Pace U., Rega D., Costabile V., Duraturo F., Izzo P., Delrio P. (2015). Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncology Reports*, 34:1087-1096. doi: 10.3892/or.2015.4108.
 23. Dekker E., Tanis P. J., Vleugels J., Kasi P. M., Wallace M. B. (2019). Colorectal cancer. *The Lancet*, 394:1467-1480. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0
 24. Diaz L. A. Jr, Williams R. T., Wu J., Kinde I., Hecht J. R., Berlin J., Allen B., Bozic I., Reiter J. G., Nowak M. A., Kinzler K. W., Oliner K. S., Vogelstein B. (2012). The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*, 486:537-540. doi: 10.1038/nature11219
 25. Díaz-Rubio E., Gómez-España A., Massutí B., Sastre J., Abad A., Valladares M., Rivera F., Safont M. J., de Prado P. M., Gallén M., González E., Marcuello E., Benavides M., Fernández-Martos C., Losa F., Escudero P., Arrivi A., Cervantes A., Dueñas R., López-Ladrón A., Lacasta A., Llanos M., Tabernero J. M., Antón A., Aranda E.; Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors. (2012). First-line XELOX plus bevacizumab followed by XELOX plus bevacizumab or single-agent bevacizumab as maintenance therapy in patients with metastatic colorectal cancer: the phase III MACRO TTD study. *The Oncologist*, 17:15-25. doi: 10.1634/theoncologist.2011-024
 26. Douillard J. Y., Oliner K. S., Siena S., Tabernero J., Burkes R., Barugel M., Humblet Y., Bodoky G., Cunningham D., Jassem J., Rivera F., Kocáková I., Ruff P., Błasińska-Morawiec M., Šmakal M., Canon J. L., Rother M., Williams R., Rong A., Wizek J., Sidhu R., Patterson S. D. (2013). Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 369:1023-1034. doi: 10.1056/NEJMoa1305275.
 27. Douillard J. Y., Siena S., Cassidy J., Tabernero J., Burkes R., Barugel M., Humblet Y., Bodoky G., Cunningham D., Jassem J., Rivera F., Kocáková I., Ruff P., Błasińska-Morawiec M., Šmakal M., Canon J. L., Rother M., Oliner K. S., Wolf M., Gansert J. (2010). Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with

- previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *Journal of Clinical Oncology*, 28:4697-4705. doi: 10.1200/JCO.2009.27.4860
28. Fakih M., Desai J., Kuboki Y., Strickler J. H., Price T. J., Durm G. A., Falchook G. S., Denlinger C. S., Krauss J. C., Shapiro G., Kim T. W., Park K., Covelev A. L., Munster P. N., Li B. T., Kim J., Henary H. A., Ngarmchamnanrith G., Hong D. S. (2020). CodeBreak 100: activity of AMG 510, a novel small molecule inhibitor of KRASG12C, in patients with advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 38:4018. doi: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.4018
 29. Fearon E. R., Vogelstein B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61:759-767. doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-i
 30. Gupta S., Provenzale D., Llor X., Halverson A. L., Grady W., Chung D. C., Haraldsdottir S., Markowitz A. J., Slavin T. P. Jr, Hampel H., Ness R. M., Weiss J. M., Ahnen D. J., Chen L. M., Cooper G., Early D. S., Giardiello F. M., Hall M. J., Hamilton S. R., Kanth P., Klapman J. B., Lazenby A. J., Lynch P. M., Mayer R. J., Mikkelsen J, Peter S, Regenbogen SE, Dwyer M.A., Ogba N. (2019). NCCN guidelines insights: genetic/familial high-risk assessment: colorectal, Version 2.2019. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 17:1032-1041. doi: 10.6004/jnccn.2019.0044.
 31. Thorvaldsdóttir H., Robinson J. T., Mesirov J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, 14:178-192. doi: 10.1093/bib/bbs017
 32. Kabbinavar F. F., Schulz J., McCleod M., Patel T., Hamm J.T., Robert H., Mass R., Perrou B., Nelson B., Novotny W. F. (2005). Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *Journal of Clinical Oncology*, 23:3697-3705. doi: 10.1200/JCO.2005.05.112
 33. Kim B. H., Kim J. M., Kang G. H., Chang H. J., Kang D. W., Kim J. H., Bae J. M., Seo A. N., Park H. S., Kang Y. K., Lee K. H., Cho M. Y., Do I. G., Lee H. S., Chang H. K., Park D. Y., Kang H. J., Sohn J. H., Chang M. S., Jung E. S., Jin S. Y., Yu E., Han H. S., Kim Y. W.; The Gastrointestinal Pathology Study Group of the Korean Society of Pathologists (2020). Standardized pathology report for colorectal cancer, 2nd Edition. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 54:1-19. doi: 10.4132/jptm.2019.09.28.

34. Kopetz S., Desai J., Chan E., Hecht J. R., O'Dwyer P. J., Maru D., Morris V., Janku F., Dasari A., Chung W., Issa J.P., Gibbs P., James B., Powis G., Nolop K. B., Bhattacharya S., Saltz L. (2015). Phase II pilot study of vemurafenib in patients with metastatic BRAF-mutated colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33:4032-4038. doi: 10.1200/JCO.2015.63.2497.
35. Kopetz S., Grothey A., Yaeger R., Van Cutsem E., Desai J., Yoshino T., Wasan H., Ciardiello F., Loupakis F., Hong Y. S., Steeghs N., Guren T. K., Arkenau H. T., Garcia-Alfonso P., Pfeiffer P., Orlov S., Lonardi S., Elez E., Kim T. W., Schellens J. H. M., Guo C., Krishnan A., Dekervel J., Morris V., Calvo Ferrandiz A., Tarpgaard L. S., Braun M., Gollerkeri A., Keir C., Maharry K., Pickard M., Christy-Bittel J., Anderson L., Sandor V., Tabernero J. (2019). Encorafenib, binimetinib, and cetuximab in BRAF V600E-mutated colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 381:1632-1643. doi: 10.1056/NEJMoa1908075.
36. Lenz H. J., Van Cutsem E. Limon M. L., Wong K. Y., Hendlisz A., Aglietta M., Garcia-Alfonso P., Neyns B., Luppi, G., Cardin D., Dragovich T., Shah U., Atasoy A., Postema R., Boyd Z., Ledezine J., Overman M., Lonardi S. (2018). Durable clinical benefit with nivolumab (NIVO) plus low-dose ipilimumab (IPI) as first-line therapy in microsatellite instability-high/mismatch repair deficient (MSI-H/dMMR) metastatic colorectal cancer (mCRC). *Annals of Oncology*, 29(Suppl. 8). doi: 10.1093/annonc/mdy424.019
37. Leoz M. L., Carballal S., Moreira L., Ocaña T., Balaguer F. (2015). The genetic basis of familial adenomatous polyposis and its implications for clinical practice and risk management. *The Application of Clinical Genetics*, 8:95-107. doi: 10.2147/TACG.S51484
38. Li Q. H., Wang Y. Z., Tu J., Liu C. W., Yuan Y. J., Lin R., He W. L., Cai S. R., He Y. L., Ye J. N. (2020). Anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: mechanisms and potential regimens of drug resistance. *Gastroenterology Report*, 8:179-191. doi: 10.1093/gastro/goaa026.
39. Limsui D., Vierkant R. A., Tillmans L. S., Wang A. H., Weisenberger D. J., Laird P. W., Lynch C. F., Anderson K. E., French A. J., Haile R. W., Harnack L. J., Potter J. D., Slager S. L., Smyrk T. C., Thibodeau S. N., Cerhan J. R., Limburg P. J. (2010). Cigarette smoking and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes. *Journal of the National Cancer Institute*, 102:1012-1022. doi: 10.1093/jnci/djq201.

40. Lowy D. R., Willumsen B. M. (1993). Function and regulation of ras. *Annual Review of Biochemistry*, 62:851-891. doi: 10.1146/annurev.bi.62.070193.004223
41. Luthra R., Chen H., Roy-Chowdhuri S., Singh R. R. (2015). Next generation sequencing in clinical molecular diagnostics of cancer: advantages and challenges. *Cancers (Basel)*, 7:2023-2036.
42. Malek M., Kielkowska A., Chessa T. Anderson K. E., Barneda D., Pir P., Nakanishi H., Eguchi S., Koizumi A., Sasaki J., Juvin V., Kiselev V. Y., Niewczal I., Gray A., Valayer A., Spensberger D., Imbert M., Felisbino S., Habuchi T., Beinke S., Cosulich S., Le Novère N., Sasaki T., Clark J., Hawkins P. T., Stephens L. R. (2017). PTEN regulates PI(3,4)P₂ signaling downstream of Class I PI3K. *Molecular Cell*, 68:566–580.e10. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.024
43. McLaren W., Gil L., Hunt S. E., Riat H. S., Ritchie G. R., Thormann A., Flicek P., Cunningham F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology*, 17:122. doi:10.1186/s13059-016-0974-4
44. Normanno N., Cervantes A., Ciardiello F., De Luca A., Pinto C. (2018). The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: current applications and future scenarios. *Cancer Treatment Reviews*, 70:1-8. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.07.007
45. Normanno N., Rachiglio A. M., Roma C., Fenizia F., Esposito C., Pasquale R., La Porta M. L., Iannaccone A., Micheli F., Santangelo M., Bergantino F., Costantini S., De Luca A. (2013). Molecular diagnostics and personalized medicine in oncology: challenges and opportunities. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114:514-524. doi: 10.1002/jcb.24401.
46. Overman M., Lonardi S., Wong K., Lenz H., Gelsomino F., Aglietta M., Morse M., Van Cutsem E., McDermott R., Hill A., Sawyer M. B., Hendlish A., Neyns B., Svrcek M., Moss R. A., Ledezine J. M., Cao Z. A., Kamble S., Kopetz S., André T. (2018). Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high metastatic colorectal. *Journal of Clinical Oncology*, 36:773–779. doi: 10.1200/JCO.2017.76.9901
47. Pietrantonio F., Vernieri C., Siravegna G., Mennitto A., Berenato R., Perrone F., Gloghini A., Tamborini E., Lonardi S., Morano F., Piccioni B., Busico A., Volpi C. C., Martinetti A., Battaglin F., Bossi I., Pellegrinelli A., Milione M., Cremolini C., Di Bartolomeo M., Bardelli A., de Braud F. (2017). Heterogeneity of acquired resistance to anti-EGFR monoclonal

- antibodies in patients with metastatic colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 23:2414-2422. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1863
48. Pietrantonio F., Petrelli F., Coinu A., Di Bartolomeo M., Borgonovo K., Maggi C., Cabiddu M., Iacovelli R., Bossi I., Lonati V., Ghilardi M., de Braud F., Barni S. (2015). Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *European Journal of Cancer*, 51:587–594. doi: 10.1016/j.ejca.2015.01.054
 49. Pietrantonio, F., Morano, F., Corallo, S., Miceli, R., Lonardi, S., Raimondi, A., Cremolini, C., Rimassa, L., Bergamo, F., Sartore-Bianchi, A., Tampellini, M., Racca, P., Clavarezza, M., Berenato, R., Caporale, M., Antista, M., Nigro, M., Smirardo, V., Murialdo, R., Zaniboni, A., ... de Braud, F. (2019). Maintenance Therapy With Panitumumab Alone vs Panitumumab Plus Fluorouracil-Leucovorin in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA oncology*, 5(9), 1268–1275. Advance online publication. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.1467>
 50. Pino M. S., Chung D.C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138:2059-2072. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.065
 51. Popat S., Hubner R., Houlston R. S. (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, 23:609-618. doi: 10.1200/JCO.2005.01.086
 52. Rachiglio A. M., Abate R. E., Sacco A., Pasquale R., Fenizia F., Lambiase M., Morabito A., Montanino A., Rocco G., Romano C., Nappi A., Iaffaioli R. V., Tatangelo F., Botti G., Ciardiello F., Maiello M. R., De Luca A., Normanno N. (2016). Limits and potential of targeted sequencing analysis of liquid biopsy in patients with lung and colon carcinoma. *Oncotarget*, 7:66595-66605. doi: 10.18632/oncotarget.10704
 53. Rawla P., Sunkara T., Barsouk A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 2019;14:89-103. doi:10.5114/pg.2018.81072
 54. Siegel R. L., Miller K. D., Goding Sauer A., Fedewa S. A., Butterly L. F., Anderson J. C., Cercek A., Smith R. A., Jemal A. (2020) Colorectal cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70:145-164. doi: 10.3322/caac.21601

55. Robsahm T. E., Aagnes B., Hjartåker A., Langseth H., Bray F. I., Larsen I. K. (2013). Body mass index, physical activity, and colorectal cancer by anatomical subsites: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Cancer Prevention*, 22:492-505. doi: 10.1097/CEJ.0b013e328360f434.
56. Salvatore L., Aprile G., Arnoldi E., Aschele C., Carnaghi C., Cosimelli M., Maiello E., Normanno N., Sciallero S., Valvo F., Beretta G. D. (2017). Management of metastatic colorectal cancer patients: guidelines of the Italian Medical Oncology Association (AIOM). *ESMO Open*, 2:e000147. doi: 10.1136/esmoopen-2016-000147
57. Santini D., Vincenzi B., Addeo R., Garufi C., Masi G., Scartozzi M., Mancuso A., Frezza A. M., Venditti O., Imperatori M., Schiavon G., Bronte G., Cicero G., Recine F., Maiello E., Cascinu S., Russo A., Falcone A., Tonini G. (2012). Cetuximab rechallenge in metastatic colorectal cancer patients: how to come away from acquired resistance? *Annals of Oncology*, 23:2313-2318. doi: 10.1093/annonc/mdr623
58. Sartore-Bianchi A., Trusolino L., Martino C., Bencardino K., Lonardi S., Bergamo F., Zagonel V., Leone F., Depetris I., Martinelli E., Troiani T., Ciardiello F., Racca P., Bertotti A., Siravegna G., Torri V., Amatu A., Ghezzi S., Marrapese G., Palmeri L., Valtorta E., Cassingena A., Lauricella C., Vanzulli A., Regge D., Veronese S., Comoglio P. M., Bardelli A., Marsoni S., Siena S. (2016). Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, *KRAS* codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 17:738–46. doi: 10.1016/S1470-2045(16)00150-9
59. Schmoll H. J., Tabernero J., Maroun J., de Braud F., Price T., Van Cutsem E., Hill M., Hoersch S., Rittweger K., Haller D. G. (2015). Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer: final results of the NO16968 randomized controlled phase III trial. *Journal of Clinical Oncology*, 33:3733-3740. doi: 10.1200/JCO.2015.60.9107.
60. Schmoll H. J., Van Cutsem E., Stein A., Valentini V., Glimelius B., Haustermans K., Nordlinger B., van de Velde C. J., Balmana J., Regula J., Nagtegaal I. D., Beets-Tan R. G., Arnold D., Ciardiello F., Hoff P., Kerr D., Köhne C. H., Labianca R., Price T., Scheithauer W., Sobrero A., Tabernero J., Aderka D., Barroso S., Bodoky G., Douillard J.Y., El Ghazaly H., Gallardo J., Garin A., Glynne-Jones R., Jordan K., Meshcheryakov A., Papamichail D.,

- Pfeiffer P., Souglakos I., Turhal S., Cervantes A. (2012). ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Annals of Oncology*, 23:2479-2516. doi: 10.1093/annonc/mds236
61. Sepulveda A. R., Hamilton S. R., Allegra C. J., Grody W., Cushman-Vokoun A. M., Funkhouser W. K., Kopetz S. E., Lieu C., Lindor N. M., Minsky B. D., Monzon F. A., Sargent D. J., Singh V. M., Willis J., Clark J., Colasacco C., Rumble R. B., Temple-Smolkin R., Ventura C. B., Nowak J. A. (2017). Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: guideline from the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*, 35:1453-1486. doi: 10.1200/JCO.2016.71.9807
 62. Sepulveda A. R., Hamilton S. R., Allegra C. J., Grody W., Cushman-Vokoun A. M., Funkhouser W. K., Kopetz S. E., Lieu C., Lindor N. M., Minsky B. D., Monzon F. A., Sargent D. J., Singh V. M., Willis J., Clark J., Colasacco C., Rumble R. B., Temple-Smolkin R., Ventura C. B., Nowak J. A. (2017). Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 147:221-260. doi: 10.1093/ajcp/aqw209.
 63. Siddiqui A. D., Piperdi B. (2010). KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy. *Annals of Surgical Oncology*, 17:1168-1176. doi: 10.1245/s10434-009-0811-z.
 64. Siena S. (2020, Maggio 29-31). A phase II, multicenter, open-label study of trastuzumab deruxtecan (T-DXd; DS-8201) in patients (pts) with HER2-expressing metastatic colorectal cancer (mCRC): DESTINY-CRC01. *ASCO Virtual Meeting*, Abstract 4000.
 65. Siravegna G., Mussolin B., Buscarino M., Corti G., Cassingena A., Crisafulli G., Ponzetti A., Cremolini C., Amatu A., Lauricella C., Lamba S., Hobor S., Avallone A., Valtorta E., Rospo G., Medico E., Motta V., Antoniotti C., Tatangelo F., Bellosillo B., Veronese S., Budillon A., Montagut C., Racca P., Marsoni S., Falcone A., Corcoran R. B., Di Nicolantonio F., Loupakis F., Siena S., Sartore-Bianchi A., Bardelli A. (2015). Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nature Medicine*, 21:795-801. doi: 10.1038/nm.3870

66. Soreide K., Janssen E.A., Soiland H., Korner H., Baak J. P. (2006). Microsatellite instability in colorectal cancer. *British Journal of Surgery*, 93:395-406. doi: 10.1002/bjs.5328
67. Stetson D., Ahmed A., Xu X., Nuttall B. R. B., Lubinski T. J., Johnson J. H., Barrett J. C., Dougherty B. A. (2019). Orthogonal comparison of four plasma NGS tests with tumor suggests technical factors are a major source of assay discordance. *JCO Precision Oncology*. doi: 10.1200/PO.18.00191
68. Tournigand C., Cervantes A., Figer A., Lledo G., Flesch M., Mineur M. B., Carola E., Etienne P. L., Rivera F., Chirivella I., Perez-Staub N., Louvet C., André T., Tabah-Fisch I., de Gramont A. (2006). OPTIMOX1: a randomized study of FOLFOX4 or FOLFOX7 with oxaliplatin in a stop-and-Go fashion in advanced colorectal cancer - a GERCOR study. *Journal of Clinical Oncology*, 24:394-400. doi: 10.1200/JCO.2005.03.0106
69. Van Cutsem E., Köhne C. H., Láng I., Folprecht G., Nowacki M. P., Cascinu S., Shchepotin I., Maurel J., Cunningham D., Tejpar S., Schlichting M., Zubel A., Celik I., Rougier P., Ciardiello F. (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *Journal of Clinical Oncology*, 29:2011-9. doi: 10.1200/JCO.2010.33.5091.
70. Van Emburgh B. O., Arena S., Siravegna G., Lazzari L., Crisafulli G., Corti G., Mussolin B., Baldi F., Buscarino M., Bartolini A., Valtorta E., Vidal J., Bellosillo B., Germano G., Pietrantonio F., Ponzetti A., Albanell J., Siena S., Sartore-Bianchi A., Di Nicolantonio F., Montagut C., Bardelli A. (2016). Acquired RAS or EGFR mutations and duration of response to EGFR blockade in colorectal cancer. *Nature Communications*, 7:13665. doi: 10.1038/ncomms13665
71. van Geel R., Tabernero J., Elez E., Bendell J. C., Spreafico A., Schuler M., Yoshino T., Delord J. P., Yamada Y., Lolkema M. P., Faris J. E., Eskens F. A. L. M., Sharma S., Yaeger R., Lenz H. J., Wainberg Z. A., Avsar E., Chatterjee E., Jaeger S., Tan E., Maharry K., Demuth T., Schellens J. H. M. (2017). A phase Ib doseescalation study of encorafenib and cetuximab with or without alpelisib in metastatic BRAF-mutant colorectal cancer. *Cancer Discovery*, 7:610-619. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0795
72. World Health Organization (WHO). (2019). WHO classification of tumours: digestive system tumours. 5th ed. Ginevra (Svizzera): World Health Organization.

73. Zhao Z., Feng Q., Yin Z., Shuang J., Bai B., Yu P., Guo M., Zhao Q. (2017). Red and processed meat consumption and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 8:83306-83314. doi: 10.18632/oncotarget.20667.