



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN

" *Medicina Molecolare* "

CICLO XXXIV

Cancro del colon-retto metastatico e refrattario alla chemioterapia

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Prisco Mirandola

Tutore:

Chiar.mo Prof. Roberto Perris

Dottorando: Capone Iolanda

Anni Accademici 2018/2019 – 2021/2022

INDICE

ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1. Epidemiologia del cancro del colon-retto	6
1.2. Eziologia e fattori di rischio	9
1.2.1. Fattori di rischio non modificabili	10
1.2.2. Fattori di rischio modificabili	12
1.3. CRC e patogenesi	14
1.3.1. Instabilità cromosomica (CIN)	15
1.3.2. Instabilità dei microsatelliti (MSI)	16
1.3.3. Ipermetilazione delle CpG island (CIMP)	17
1.4. Classificazione	18
1.5. Diagnosi	20
1.6. Stadiazione	21
1.7. CRC e trattamento	23
1.7.1. Malattia localizzata	23
1.7.2. Malattia metastatica	25
1.7.3. Farmacogenomica	25
1.7.4. Terapia di mantenimento	26
1.7.5. Target Therapy	27
1.7.6. Biomarcatori molecolari	29
1.8. Screening molecolare nei pazienti mCRC	33
1.8.1. Screening molecolare in un laboratorio di patologia molecolare	34
1.8.2. Biopsia liquida e CRC	36
2. SCOPO DEL PROGETTO	38
3. MATERIALI E METODI	38
3.1. Materiali e metodi studio MAYA	41
3.1.1. Disegno dello studio e partecipanti	42
3.1.2. Procedura	42
3.1.3. End point dello studio	42
3.1.4. Analisi statistica	45
3.1.5. Screening molecolare	45

3.2. Materiali e metodi studio PARERE	56
3.2.1. Disegno dello studio e partecipanti	56
3.2.2. End point dello studio	58
3.2.3. Raccolta dei campioni	59
3.2.4. Preparazione delle librerie NGS	59
3.2.5. Sequenziamento NGS	59
4. RISULTATI	65
4.1. Risultati studio MAYA	66
4.2. Risultati studio PARERE	77
5. DISCUSSIONE	87
5.1. Studio MAYA	88
5.2. Studio PARERE	92
6. CONCLUSIONI	96
6.1. Conclusioni studio MAYA	97
6.2. Conclusioni studio PARERE	97
7. BIBLIOGRAFIA	99

ABSTRACT

Il carcinoma del colon retto (CRC) è la terza causa di decessi correlati al cancro in entrambi i generi in tutto il mondo. Esso è generalmente asintomatico negli stadi iniziali e quando compaiono i sintomi, come il sanguinamento rettale, l'anemia o il dolore addominale, nella maggior parte dei pazienti sono già in fase avanzata di malattia. Il 30% dei nuovi casi viene diagnosticato come carcinoma coloretale metastatico (mCRC) normalmente associato ad una bassa sopravvivenza globale. Per questo i programmi di screening sono stati implementati negli ultimi anni in molti paesi del mondo.

La chemioterapia è attualmente l'approccio terapeutico di elezione nei pazienti con mCRC ma spesso questi pazienti vanno incontro a resistenza divenendo chemiorefrattari. Ciò spiega il crescente interesse sviluppatosi negli ultimi anni verso la ricerca di nuovi protocolli terapeutici per questo tipo di pazienti. In questo contesto si collocano lo studio MAYA.

Gli inibitori del checkpoint immunitario (ICI) hanno fornito un beneficio senza precedenti nel piccolo sottogruppo di pazienti mCRC, circa il 5%, che presentano un'alta instabilità microsatellitare.

La temozolomide (TMZ) è un agente alchilante orale approvato per i pazienti con glioblastoma che presentano la metilazione del promotore del gene O6-metilguanina-DNA metiltransferasi (MGMT). Anche se la metilazione MGMT è riscontrabile in circa il 40% dei CRC, diversi studi hanno mostrato un'attività modesta della TMZ in pazienti con mCRC selezionati per la presenza di metilazione nel gene MGMT, con un tasso di risposta globale inferiore al 10%.

La resistenza alla TMZ dopo una prima fase di risposta può essere legata alle sue proprietà mutagene ed è spesso associata all'insorgenza di mutazioni secondarie nei geni MMR che simulano uno stato di dMMR-like con maggior sensibilità all'immunoterapia.

Dopo un iniziale fase in cui i 135 pazienti arruolati sono stati trattati con solo TMZ, nella seconda fase di trattamento, in pazienti idonei con controllo precoce della malattia, la TMZ è stata associata a nivolumab più ipilimumab a basso dosaggio. Solo 33 pazienti hanno iniziato la seconda fase della terapia. Complessivamente in 12 pazienti su 33 si è raggiunta un tasso di progression free survival (PFS) superiore a 8 mesi.

Lo studio MAYA ha fornito la prova che l'ipermutazione indotta da TMZ può essere sfruttata per ottenere risposte durevoli alla combinazione di ipilimumab e nivolumab a basse dosi in pazienti con mCRC che presentano stabilità microsatellitare (pMMR/MSS) e MGMT silenziato.

Un altro studio a cui ho lavorato è lo studio PARERE che è attualmente ancora in fase di arruolamento ed ha lo scopo di indagare il rechallenge dell'anti-EGFR in pazienti con mCRC chemiorefrattari che ne hanno tratto beneficio in un trattamento di prima linea e che non risultano portatori di mutazioni nei geni KRAS-NRAS e BRAF.

Recenti studi hanno evidenziato l'efficacia del regorafenib, il quale sembra anche aumentare la sensibilità del tumore agli agenti anti-EGFR.

Nello studio PARERE pazienti chemiorefrattari wt su cf-DNA in KRAS, BRAF, NRAS vengono arruolati e sottoposti a terapia con anti-EGFR seguita da regorafenib o sequenza inversa in un rapporto 1:1.

Ad oggi sono 74 i pazienti arruolati. La fine dello studio è prevista nel 2023.

1. *Introduzione*

1.1. Epidemiologia del cancro del colon-retto

Il cancro è attualmente considerata una delle principali cause di morte in ogni paese del mondo. Secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 2019, il cancro è la prima o la seconda causa di morte prima dei 70 anni in 112 paesi su 183 e si colloca al terzo o quarto posto in altri 23 paesi. Il fatto che il cancro sia ad oggi la principale causa di morte riflette da una parte il calo dei tassi di mortalità per ictus e malattia coronarica in molti paesi, dall'altra l'invecchiamento generale della popolazione e la crescente prevalenza di fattori di rischio consolidati come fumo, sovrappeso e inattività fisica associati all'urbanizzazione e allo sviluppo economico [1].

Ci sono stati circa 19,3 milioni di nuovi casi diagnosticati e 10 milioni di decessi per cancro in tutto il mondo nel 2020. Si stima che la metà di tutti i nuovi casi e il 58,3% dei decessi per cancro si verifichino in Asia dove risiede il 59,5% della popolazione mondiale. L'Europa rappresenta il 22,8% dei casi totali di cancro e il 19,6% dei decessi per cancro, sebbene rappresenti il 9,7% della popolazione mondiale. A seguire c'è l'America con il 20,9% dell'incidenza e dal 14,2% della mortalità.

A differenza di altre regioni, la quota di decessi per cancro in Asia (58,3%) e Africa (7,2%) è superiore alla quota di incidenza (49,3% e 5,7%, rispettivamente) probabilmente a causa dei più elevati tassi di mortalità in queste regioni.

A livello globale, il cancro del colon retto (CRC) è la terza causa di decessi correlati al cancro in entrambi i generi in tutto il mondo, con 515.637 decessi stimati tra i maschi e 419.536 decessi tra le femmine nel 2020. La prevalenza di CRC è cresciuta drasticamente a un tasso allarmante a livello globale negli ultimi anni. Secondo le stime di GLOBOCAN 2020, ci sono 1,15 milioni di nuovi casi di cancro del colon, 0,7 milioni di nuovi casi di cancro rettale e 50.000 nuovi casi di cancro anale nel 2020 a livello globale. Con il continuo progresso è previsto un aumento di questi casi rispettivamente a 1,92 milioni, 1,16 milioni, e 78.000 nel 2040.

Nel 2020 l'incidenza del CRC ha rappresentato il 10% dell'incidenza globale del cancro ed il 9,4% di tutti i decessi dovuti al cancro (Fig. 1° e B).

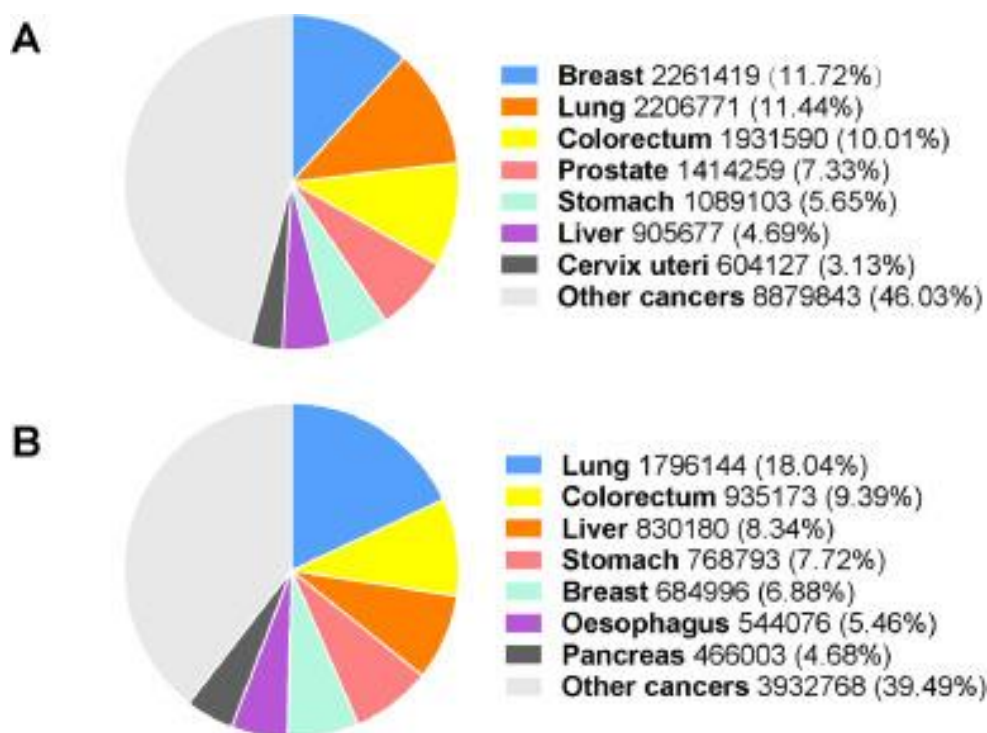


Fig. 1: Stime e proporzione dell'incidenza e dei decessi dei principali tipi di cancro nel mondo nel 2020. (A) Numero stimato di nuovi casi di cancro nel 2020 a livello mondiale. (B) Stima del numero di decessi per cancro nel 2020 a livello mondiale. Fonte: GLOBOCAN 2020.

Sono state osservate differenze significative nel tasso di sopravvivenza dei CRC, anche nella maggior parte dei paesi altamente sviluppati. La diagnosi nei diversi stadi clinici del CRC può spiegare parzialmente le marcate differenze nei tassi di sopravvivenza [2]. Esso è generalmente asintomatico. Quando compaiono i sintomi, come il sanguinamento rettale, l'anemia o il dolore addominale, la maggior parte dei pazienti sono già nella fase avanzata in cui il tumore è aggressivo, maligno e metastatico. La diagnosi in stadi avanzati è uno dei fattori determinanti della disparità nella sopravvivenza e di un gran numero di decessi CRC in tutto il mondo.

Pertanto, programmi di screening basati sulla popolazione sono stati ampiamente proposti e implementati in alcuni paesi altamente sviluppati negli ultimi 10 anni, con l'obiettivo di spostare la diagnosi CRC alle fasi iniziali e migliorare i risultati della terapia [3,4,5].

Globalmente, l'incidenza di CRC varia con differenze anche significative tra i vari paesi del mondo. I tassi di incidenza più elevati si registrano in Australia e Nuova Zelanda, Europa e Nord America, mentre i tassi più bassi si riscontrano in Africa e nell'Asia centro-meridionale [6]. Queste differenze geografiche sembrano essere attribuibili a differenze nelle esposizioni alimentari e ambientali, a un basso status socioeconomico e a tassi inferiori di screening CRC proposti in alcuni Paesi [7,8].

La Cina con 0,56 milioni di nuovi casi e gli Stati Uniti con 0,16 milioni di nuovi casi hanno il più alto numero stimato di nuovi casi di CRC nel 2020, e il numero di nuovi casi dovrebbe crescere continuamente nei prossimi 20 anni sulla base di fattori demografici. Inoltre, anche la Federazione Russa, l'India, la Germania, il Brasile, il Regno Unito, l'Italia e la Francia sono tra i primi 10 paesi con la più alta incidenza di CRC nel 2020.

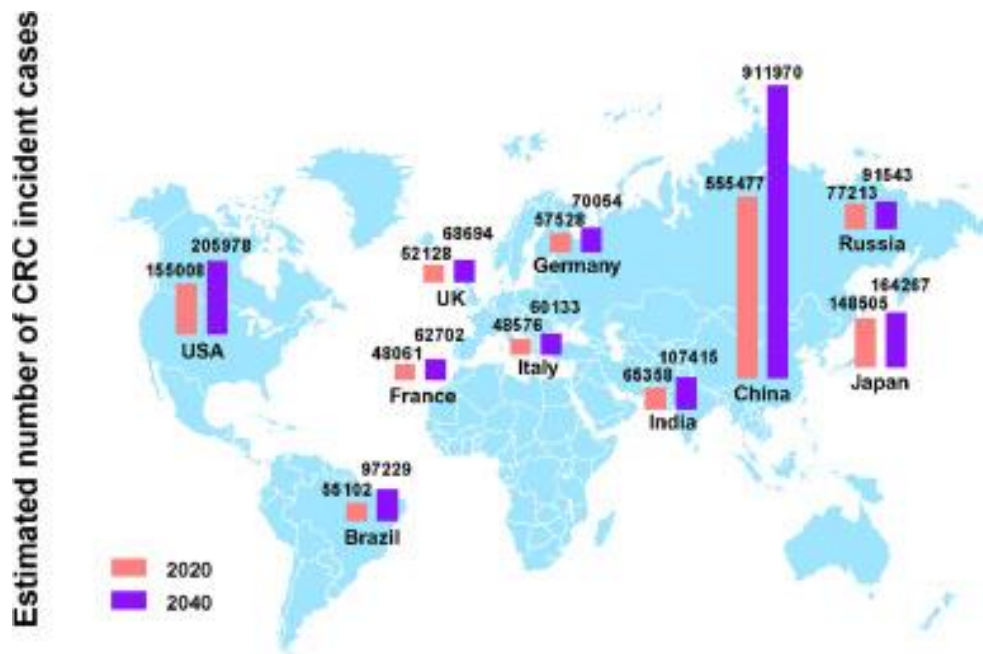


Fig. 2: Il numero di nuovi casi di CRC nei primi 10 Paesi con i più alti casi di incidenti nel 2020 e proiezioni per il 2040. Fonte: GLOBOCAN 2020.

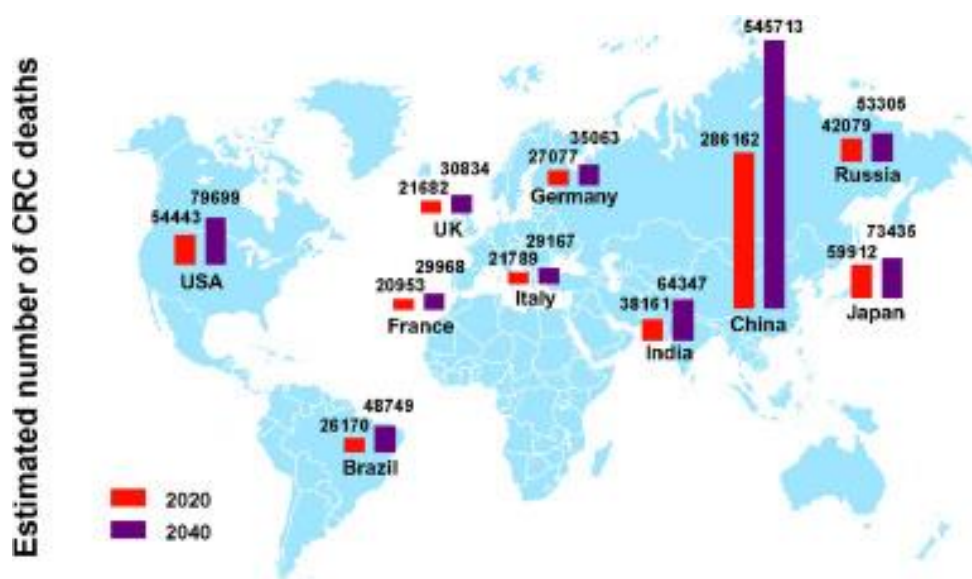


Fig. 3. Morti per CRC nei primi 10 Paesi con i più alti casi di incidenti nel 2020 e proiezioni per il 2040. Fonte: GLOBOCAN 2020.

Secondo i dati ISTAT, in Italia, nel 2020 ci sono state circa 43.700 nuove diagnosi di CRC che rappresenta 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%).

Il carcinoma del colon-retto e ano presenta complessivamente una prognosi favorevole rispetto a molti altri tumori solidi; la sopravvivenza a 5 anni mostra leggere differenze tra i due sessi e tra i diversi gruppi di età passando dal 69,9% nelle femmine e 73,4% nei maschi di età compresa tra i 15 e 44 anni, al 53,9% nelle donne e 51,8% negli uomini con più di 75 anni. (Fig. 4) [9].

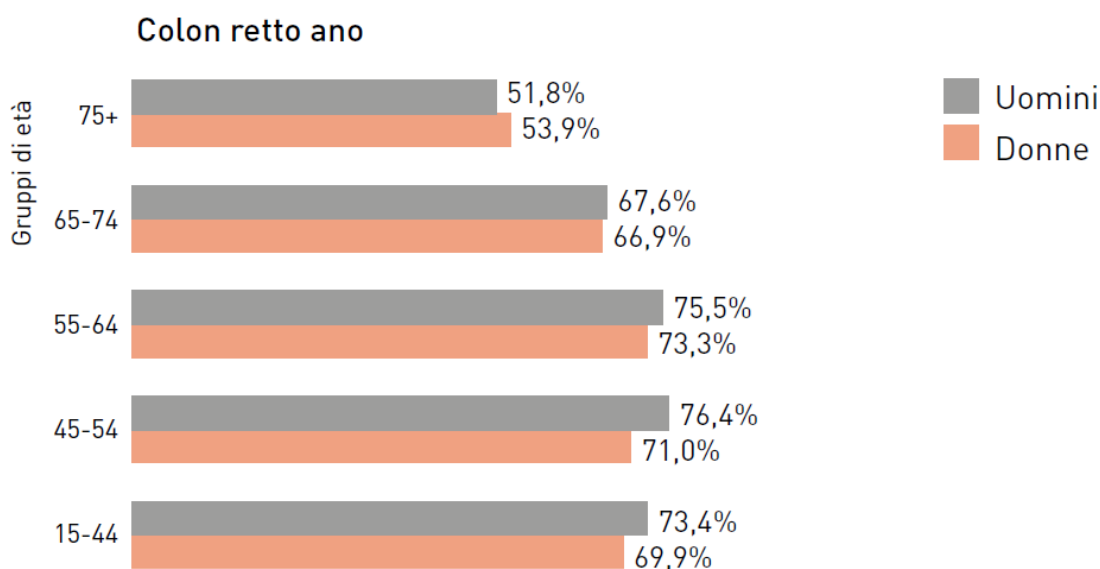


Fig. 4: sopravvivenza a 5 anni per età e sesso nel tumore Carcinoma colon-retto e ano. Fonte: GLOBOCAN 2020.

1.2 Eziologia e fattori di rischio

Il cancro del colon retto rappresenta un gruppo molto eterogeneo di malattie il cui sviluppo e progressione è spesso guidato dall'interazione tra fattori ambientali e fattori genetici [10].

Esistono 2 forme principali di tumore del colon retto: tumori coloretali sporadici (CRC), dovuto a mutazioni somatiche, che rappresentano circa 70% di tutti i CRCs, e CRC familiare, e questo gruppo comprende sia le forme ereditarie, che rappresentano il 5-7%, che forme di tumore connesse non ad un'eredità mendeliana, ma solo ad una predisposizione familiare a sviluppare il cancro e sono circa il 10-30% [11].

I fattori di rischio associato allo sviluppo del carcinoma del colon retto si dividono in non modificabili, come età e fattori genetici, e modificabili quali dieta, fumo, sedentarietà.

1.2.1 Fattori di rischio non modificabili

Età

Il rischio di sviluppare il CRC aumenta con l'età. Secondo i recenti studi coloro che hanno più di 65 anni hanno una probabilità di avere una diagnosi di CRC circa tre volte superiore rispetto alle persone con un'età compresa tra i 50-64 anni, e circa trenta volte superiore rispetto alle persone con un'età compresa tra 25-49 anni.

Mentre il tasso di incidenza della malattia è diminuito negli ultimi decenni tra le persone di età superiore ai 50 anni grazie agli attuali programmi di screening, il tasso di incidenza per le persone di età inferiore ai 50 anni è effettivamente aumentato [12]. I ricercatori ritengono che questo possa essere un riflesso di uno stile di vita più sedentario e da allora hanno raccomandato di abbassare l'età dello screening a 45 anni, al fine di rilevare i casi negli adulti più giovani [13].

Predisposizione familiare

Fino al 30% dei pazienti con CRC ha una storia familiare di neoplasia. Quelli con un parente di primo grado con la malattia hanno un rischio da due a quattro volte più alto di svilupparla. L'aumento del rischio va anche al di là dei parenti di primo grado [11,10].

I CRC ereditari rappresentano il 5-7% di tutti i casi e comprendono il cancro coloretale ereditario non poliposico (HNPCC) e le sindromi poliposiche adenomatose (FAP e MAP) e amartomatose (PJS, JPS, PHTS) [14,15] i cui geni coinvolti sono ben noti.

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-BMPR1A	Dominant
Polymerase Proofreading-Associated Polyposis (PPAP)	POLD1-POLE	Dominant

Sindrome di lynch

La sindrome ereditaria più comune è l'HNPCC, attualmente conosciuta come sindrome di Lynch, che rappresenta il 2-4% di tutti i casi ereditari e come la maggior parte delle sindromi ereditarie della CRC, essa presenta un modello autosomico dominante di ereditarietà.

L'80% dei pazienti con sindrome di Lynch presenta mutazioni germinali dei *geni del mismatch repair (MMR)* soprattutto nei geni *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* e *hPMS2*; inoltre la maggior parte di questi tumori presenta una instabilità dei microsatelliti, presente anche nel 12% circa di CRC sporadico [16]. Le mutazioni della linea germinale MLH1 e MSH2, le mutazioni MSH6 e le mutazioni hPMS2 rappresentano rispettivamente circa il 90%, 7% ,10% e meno del 5% delle mutazioni riscontrate nella sindrome di Lynch[17]. Il 20% dei soggetti con questa sindrome hanno il rischio di sviluppare CRC entro i 50 anni ed il 50% di svilupparla dall'età 70 anni (gli uomini presentano un rischio ancora più alto rispetto alle donne). La sindrome di Lynch aumenta anche il rischio di cancro dell'esofago, dell'endometrio, dell'intestino tenue, delle ovaie e dello stomaco [18].

Sindromi da poliposi

La poliposi adenomatosa familiare (FAP) è la seconda sindrome genetica predisponente più comune e rappresenta meno dell'1% di tutti i CRC. È caratterizzata dallo sviluppo di centinaia di polipi coloretali a partire dai 10-12 anni. Senza un intervento tempestivo, il rischio di CRC nel corso della vita è quasi del 100% entro i 40 anni [19]. La mutazione genetica che causa la FAP è solitamente ereditata, tuttavia la mutazione può anche verificarsi spontaneamente. Le

mutazioni germinali sono a carico del gene oncosoppressore APC, un gene importante per lo sviluppo, l'omeostasi e per l'adesione e migrazione cellulare [20].

La poliposi associata a *MUTYH* (MAP) è meno definita clinicamente e i malati possono sviluppare un numero inferiore di polipi rispetto alla FAP [21]. Il fenotipo di questa sindrome è simile a quello della FAP attenuata ed è caratterizzato da una propensione allo sviluppo di neoplasie del colon prossimale [22].

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 [10].

1.2.2 Fattori di rischio modificabili

Obesità e inattività fisica

Sia l'obesità che l'inattività fisica rappresentano il contributo comportamentale più significativo allo sviluppo del CRC. Gli studi hanno scoperto che coloro che svolgono attività fisica regolare hanno una probabilità inferiore del 25% di sviluppare CRC. Nel frattempo, coloro che sono più sedentari hanno un rischio aumentato fino al 50% di sviluppare CRC. L'inattività fisica di solito si traduce in obesità, che può alterare la microflora intestinale e irritare e infiammare l'epitelio dell'intestino crasso, promuovendo così la carcinogenesi. L'obesità contribuisce anche allo sviluppo del cancro al di fuori del tratto digestivo.

Gli uomini obesi sembrano avere un rischio del 50% maggiore di cancro del colon e del 20% maggiore di cancro rettale (questi numeri sono 20% e 10% per le donne, rispettivamente).

L'eccesso di rischio conferito dall'obesità è indipendente dal rischio conferito dall'inattività fisica. Il grasso addominale è particolarmente pericoloso per lo sviluppo di CRC (così come le malattie cardiache e ictus), e quindi sia la circonferenza della vita e BMI sono utilizzati per valutare l'aumento del rischio di CRC. L'obesità e l'inattività fisica non solo predispongono a tassi di incidenza più elevati, ma riducono anche la probabilità di sopravvivenza globale [23].

Dieta

La dieta può svolgere un ruolo avverso o protettivo nello sviluppo di CRC indipendentemente dall'obesità.

Carni rosse e trasformati sono noti per aumentare il rischio di CRC, così come i tumori gastrici e piccoli tumori intestinali. Studi prospettici hanno rilevato un rischio relativo (RR) di 1,22 tra coloro che hanno consumato le carni più rosse e trasformate [24]. La maggior parte della carcinogenesi deriva probabilmente dalla cottura ad alta temperatura, dalla salatura e dall'affumicatura della carne.

Nel 2015, l'Agencia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC) ha definito la carne trasformata "cancerogena" e la carne rossa "probabilmente cancerogena", soprattutto a causa del suo impatto sul rischio di sviluppo del CRC [25].

Calcio, fibre, vitamina D e frutta e verdura hanno dimostrato di avere un effetto protettivo contro la CRC. Una considerazione a se va fatta sui folati: la supplementazione di folato sembra inibire la carcinogenesi ma promuovere la crescita di tumori esistenti. Questa relazione complessa porta la maggior parte delle agenzie a sconsigliare il consumo di folato a meno che i consumatori non siano in gravidanza o abbiano un disturbo metabolico specifico, come una mutazione MTHFR, che predispone a livelli elevati di omocisteina.

Le fibre comunemente presenti nella frutta, nella verdura e nei cereali integrali sono particolarmente protettive perché favoriscono tempi di transito più rapidi per le feci e quindi riducono al minimo l'esposizione a potenziali agenti cancerogeni [26].

Fumo e abuso di sostanze alcoliche

Il consumo di alcol da moderato a pesante (superiore a una dose giornaliera) è associato ad un aumento del rischio di CRC [27]. Le persone che bevono 2-3 bevande alcoliche al giorno hanno un rischio aumentato del 20% di sviluppare CRC, mentre per coloro che assumono più di tre bevande, questo rischio aumenta al 40%. L'associazione è più forte negli uomini, probabilmente a causa delle variazioni ormonali nel metabolismo dell'alcol.

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 [28]. La cessazione del fumo è stata associata a un miglioramento della sopravvivenza globale e specifica del CRC [29].

1.3 CRC e patogenesi

Nel 1990, Fearon e Vogelstein hanno definito il paradigma genetico della formazione di CRC [10]. Secondo il loro modello genetico, lo sviluppo del cancro colon-rettale è un processo multistep alla cui base ci sono alterazioni genetiche ed epigenetiche nei geni chiave coinvolti nel silenziamento dei geni oncosoppressori (TSG) e nell'attivazione degli oncogeni [30,31,32]. Queste alterazioni sono coinvolte in eventi che portano all'inizio della trasformazione neoplastica dell'epitelio sano che progredisce verso gli stadi maligni [33] (Fig 5). Tra le mutazioni più comuni 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 [30]. Ci sono tre vie principali alla base dell'instabilità genetica di CRC e della sua patogenesi: instabilità cromosomica (CIN), instabilità dei microsatelliti (MSI) e l'ipermetilazione in particolari regioni dette CpG island del DNA (CIMP) [33,34]

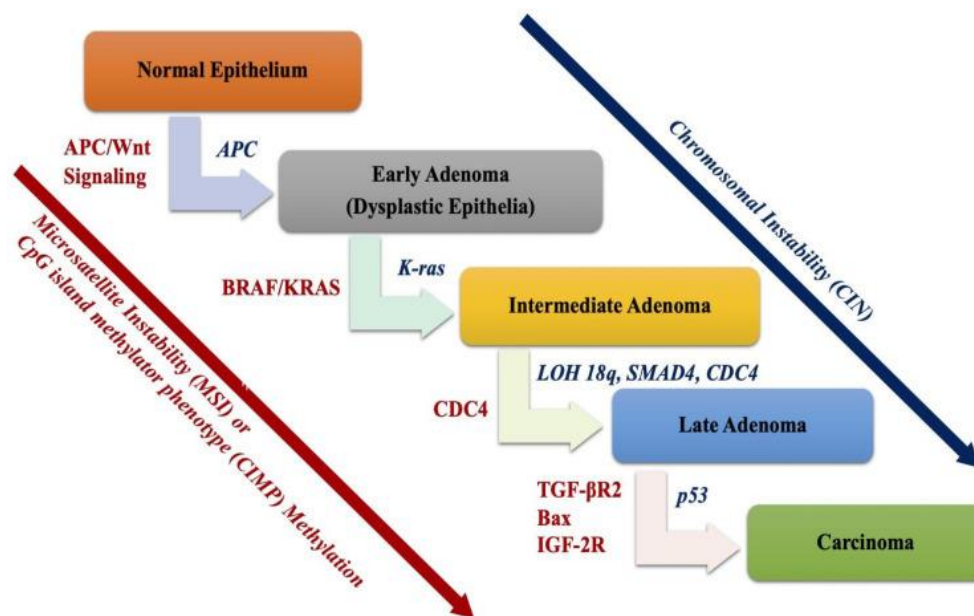


Fig 5: modello genetico multistep che descrive lo sviluppo dell'adenocarcinoma del colonretto. Ci sono 3 diverse pathways che portano allo sviluppo del CRC: Instabilità cromosomica (CIN), instabilità dei microsatelliti (MSI), e ipermetilazione delle CpG island (CIMP).

1.3.1 instabilità cromosomica (CIN)

L'instabilità cromosomica si riferisce ad un aumento significativo di mutazioni a carico di geni oncogeni o oncosoppressori, come *APC*, *TP53*, *SMAD2*, *SMAD4*, *DCC*, *KRAS*, *PIK3ca* [35,36]. Inoltre è caratterizzata da modifiche nel numero e nella struttura dei cromosomi, incluse delezioni, guadagni e traslocazioni. Essa rappresenta l'instabilità genetica più comune presentandosi in circa l'85% delle transizioni da adenoma a carcinoma [35,37].

Secondo il modello genetico multistep definito da Fearon e Vogelstein [30], il primo passo comprende il silenziamento dell'APC, seguito da mutazioni oncogeniche del KRAS nello stadio adenomatoso, e, infine, la cancellazione del cromosoma 18q e l'inattivazione del TP53 che si verificano durante il passaggio alla forma di cancro [30,38,39]. Inoltre, recentemente, sono state riscontrate aberrazioni genetiche in TGF- β R e PI3KCA [40,41].

Inoltre, sono state identificate alcune perdite alleliche ricorrenti di tutti i bracci cromosomici in CRC che includono perdite ai bracci cromosomici 1p, 5q, 8p, 17p, 18p, 18q, 20p e 22q. D'altra parte, i guadagni cromosomici sono stati identificati al cromosoma 7 e bracci cromosomici 1q, 8q, 12q, 13q e 20q [41,42,43].

I geni della poliposi adenomatosa del colon (APC) rappresentano una classe di oncosoppressori la cui principale funzione è quella di inibire le vie di segnalazione che favoriscono la crescita. Mutazioni in APC sono riscontrate nell'70-80% di carcinomi coloretali non familiari.

Un'importante funzione della proteina APC consiste nel controllare l'attività della β -catenina fungendo da regolatore negativo della via WNT, determinando in condizioni normali la degradazione della β -catenina, evitandone l'accumulo nel citoplasma. Quando viene meno questo controllo negativo, la β -catenina passa nel nucleo e stimola la proliferazione cellulare aumentando la trascrizione di MYC e di ciclina D1 (Fig 6) [44,45]. Successivamente si accumulano ulteriori mutazioni, comprese le mutazioni attivanti in KRAS che promuovono la crescita e prevengono l'apoptosi. Le proteine RAS fanno parte di una famiglia di piccole proteine G associate alla membrana che legano i nucleotidi di guanosina (guanosina trifosfato, GTP e guanosina difosfato, GDP). Le mutazioni delle proteine RAS ne riducono l'attività GTPasica, determinando una costante produzione di segnali di crescita.

Altri geni oncosoppressori sono associati alla progressione neoplastica, come quelli che codificano per SMAD2 e SMAD4, attuatori della segnalazione di TGF β che normalmente inibisce il ciclo cellulare, per cui la perdita di questi geni può consentire la crescita incontrollata. Il gene oncosoppressore TP53 è mutato nel 70-80% dei tumori del colon. Questo

gene regola il ciclo cellulare, la riparazione del DNA e l'apoptosi per cui la perdita di TP53 causa danni non riparati al DNA.

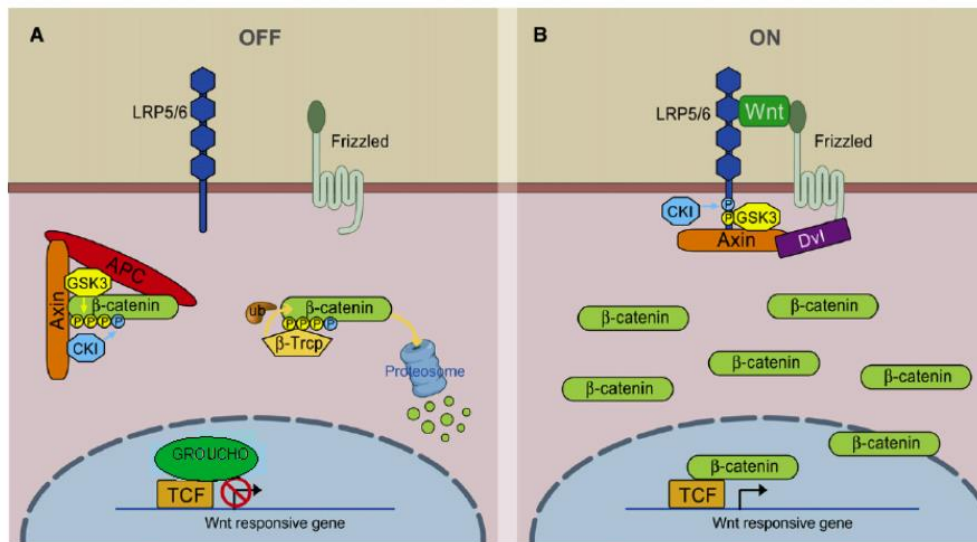


Fig. 6: La via di segnalazione Wnt. A) Nelle cellule non esposte al Wnt, β-catenina si associa con ed è fosforilata dalla distruzione del complesso composto da Axin, APC, and GSK-3. La β-catenina fosforilata è poi degradata. Nello stesso tempo, i geni target del Wnt sono soppressi dall'associazione di TCF con Groucho. B) Il legame di Wnt con il recettore induce la fosforilazione di LRP e il reclutamento di Axin. Il complesso Axin/APC/GSK-3 è inibito, portando all'accumulazione di β-catenina citosolica che poi transloca nel nucleo e attiva i geni target.

1.3.2 Instabilità dei microsatelliti (MSI)

I microsatelliti sono delle brevi sequenze ripetute di DNA non codificante (1-6 bp) presenti sul 3% dell'intero genoma, sono zone altamente polimorfiche e più soggette ad errore nel corso della replicazione del DNA. Per instabilità microsatellitare si intende una condizione in cui è alterato il numero di ripetizioni di queste sequenze. Lo status di instabilità microsatellitare rappresenta un fattore prognostico e predittivo per i tumori colorettali.

La via MSI si verifica in circa il 15% dei tumori CRC sporadici e nel 95% di tutti i casi di sindrome di Lynch.

La formazione di MSI è considerata un indicatore di un deficit di funzionalità del sistema di riparazione del DNA (MMR). Il sistema del MMR è formato da 5 geni: *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* e *MSH6*; le mutazioni più frequenti riguardano *MSH2* e *MLH1*. Un difetto del MMR porta ad un enorme accumulo di mutazioni somatiche in questi geni durante la replicazione innescando la cancerogenesi.

Alcune sequenze di microsatelliti si trovano nelle regioni codificanti o promotrici dei geni che si occupano della regolazione della crescita cellulare, come *BAX* e *TGF-Bii*.

In base al profilo di instabilità microsatellitare i tumori sono classificati seguendo il pannello Bethesda che si basa sulla percentuale dei loci mutati e si dividono in: altamente instabili (MSI-H), poco instabili (MSI-L) e stabili (MSS) (Fig 7). 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 [46].

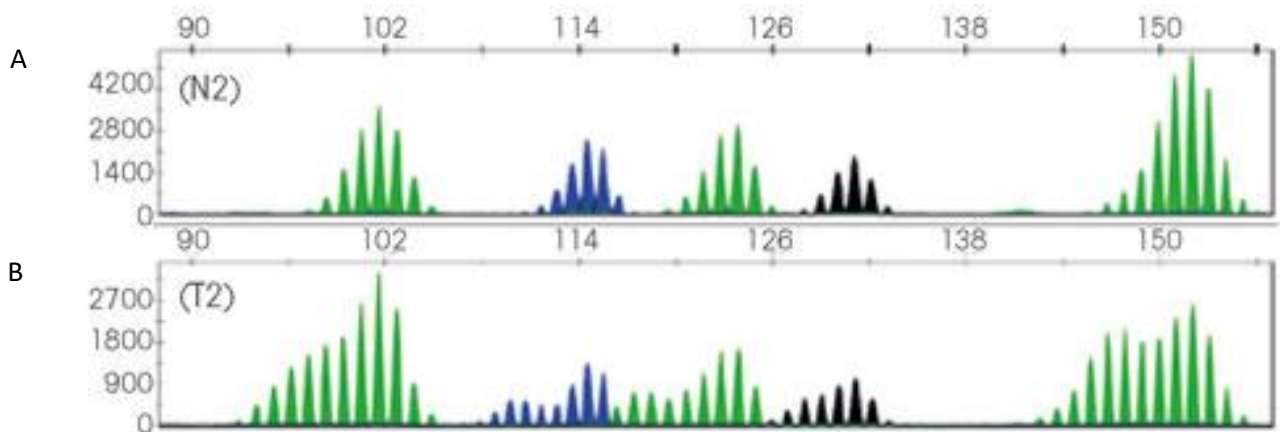


Fig. 7: A) Profilo di un tumore stabile (MSS). B) Profilo di un tumore altamente instabile (H-MSI).

1.3.3 Ipermetilazione delle CpG island (CIMP)

La metilazione del DNA, osservata per la prima volta nel 1948, è un meccanismo di silenziamento genico ed è il meccanismo epigenetico più studiato e di cui attualmente si ha un'ampia, seppur non completa, conoscenza (Fig 8). Nel genoma umano le regioni altamente metilate coinvolgono le isole CpG (CGI). Le CGI sono sequenze ricche di GC della lunghezza di circa 500 bp e la maggior parte, se non tutte, le CGI si trovano a livello dei promotori e delle regioni 5' dei geni, infatti, circa il 60% dei geni umani presenta promotori con CGI.

Le tecnologie attuali consentono il rilevamento della metilazione anche in un singolo sito CpG in qualsiasi tipo cellulare. Il processo di metilazione è causata dal legame covalente di un gruppo metilico (-CH₃) sul carbonio in posizione 5 dei residui di citosina con formazione di 5-metilcitosina [47].

La metilazione della citosina è anche un importante fattore di mutazione. Infatti mentre la deaminazione della citosina produce uracile, una base azotata che non appartiene al DNA (bensì all'RNA) ed è immediatamente riconosciuta come estranea, la deaminazione della 5-metil citosina

(⁵meC) la trasforma in timina, generando un *mismatch*, nel quale il sistema di riparazione dei mismatch (*mismatch repair*) non sempre riesce ad inserire la corretta base azotata.

La via CIMP è caratterizzata quindi da un aumento dell'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*.

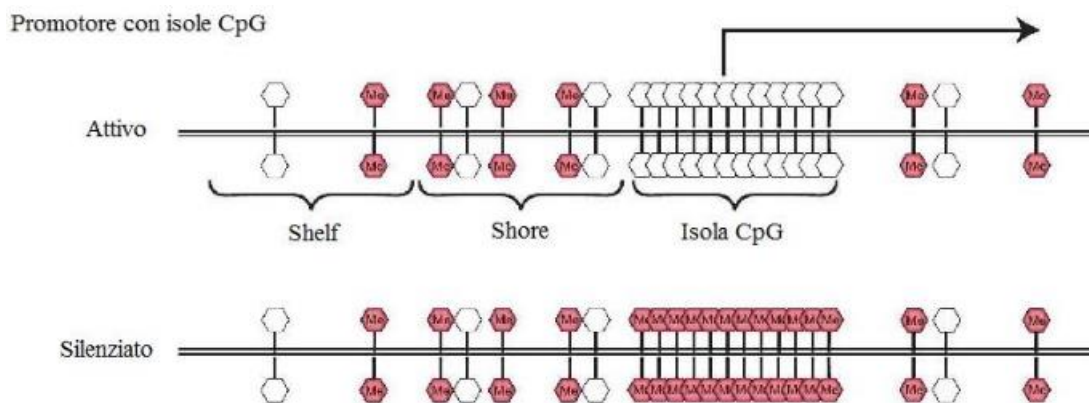


Fig. 8: La metilazione delle CGIs induce il silenziamento a lungo termine del gene (I cerchi vuoti simboleggiano i residui CpG non metilati; I cerchi pieni sono i residui CpG metilati)

1.4 Classificazione

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

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;

- forma anulare o stenosante: estesa per tutta la circonferenza intestinale determinando restringimento del lume; ha superficie irregolare e tendenza ulcerativa.

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

Per quanto riguarda i tumori epiteliali distinguiamo:

- Adenocarcinoma, è composto da tumori ben differenziati simili all'adenoma villosa nella porzione invasiva, che mostrano un confine spinto e una desmopatia minima;
- Adenocarcinoma mucinoso, caratterizzato dalla presenza di abbondante muco extracellulare che costituisce oltre il 50 % della lesione;
- Adenocarcinoma a cellule ad anello a castone, caratterizzato 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, immunohistochimiche 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. È inoltre 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 [48].

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*).

1.5 Diagnosi

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

Il CRC tende ad essere asintomatico negli stadi iniziali della malattia dove il sospetto può insorgere dopo la positività del test del sangue occulto nelle feci. Un sanguinamento rettale di recente insorgenza in pazienti di età ≥ 50 anni dovrebbe essere sempre una spia d'allarme. In questi pazienti è necessario eseguire subito ulteriori accertamenti strumentali ai fini diagnostici.

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 >6 mm.

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 [11].

La TC total body con mezzo di contrasto è necessaria per la valutazione dell'estensione locale della malattia, dell'interessamento linfonodale e per la ricerca di metastasi a distanza. Per la ricerca delle metastasi epatiche può anche essere utilizzata l'ecografia addomino-pelvica o, in alternativa,

la Risonanza Magnetica (RM) epatica con mezzo di contrasto epatospecifico, la quale ha una maggiore sensibilità rispetto alla TC [49,50]. Per la valutazione dell'estensione locale del carcinoma del retto vengono utilizzate la RM pelvi con mezzo di contrasto e l'ecografia transrettale per studiare in modo accurato la diffusione del e la presenza di linfadenopatie periviscerali.

La PET (Positron Emission Tomography) con 18Fluoro-2-desossi-D-glucosio non è strettamente indicata tra gli esami radiologici di stadiazione. Può essere però utile per identificare eventuali sedi extraepatiche di malattia in pazienti con metastasi potenzialmente resecabili e viene dunque riservata a casi selezionati [51].

1.6 Stadiazione

Dopo aver eseguito una corretta diagnosi la stadiazione della malattia è uno step fondamentale per determinare l'entità di diffusione della neoplasia e la sua prognosi nonché per indirizzare 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) [52].

Tabella 1: Classificazione TNM-AJCC del CRC.

T- Tumore primario	
Tx	Materiale non sufficiente
T0	Non evidenza di malattia
Tis	Carcinoma in situ:tumore piatto
Ta	Non infiltrante la tonaca sottomucosa
T1	Infiltrante la tonaca sottomucosa
T2a	Infiltrante la prima metà della tonaca muscolare
T2b	Infiltrante la seconda metà della tonaca muscolare
T3a	Infiltrazione microscopica del grasso peri-vescicale
T3b	Infiltrazione macroscopica del grasso peri-vescicale
T4a	Infiltrazione organi vicini: prostata,vescicole seminali utero, vagina
T4b	Infiltrazione parete pelvica e/o addominale
N-Linfonodi	
Nx	Linfonodi non valutabili
N0	Assenza di metastasi nei linfonodi regionali
N1	Metastasi in un singolo linfonodo di una stazione endopelvica (otturatori, iliaci interni, iliaci esterni, presacrali)
N2	Metastasi multiple di stazioni endopelviche
N3	Metastasi multiple di stazioni endopelviche
M- Metastasi a distanza	
Mx	Metastasi a distanza non valutabili
M0	Assenza di metastasi a distanza
M1	Presenza di metastasi a distanza

Sulla base della stadiazione TNM sono stati stabiliti quattro stadi clinici da I a IV (Tabella 2):

- 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

Tabella 2 Stadiazione clinica sulla base dei criteri TNM

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
------------------	---------------------------

Il CRC può diffondersi in organi vicini mediante infiltrazione neoplastica nella parete intestinale con estensione lungo la parete dell'organo, e mediante infiltrazione di organi circostanti come 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 paracolic (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.

Il 25-30% dei pazienti alla diagnosi presenta metastasi epatiche e/o polmonare (mCRC) [53].

Il 35% dei pazienti con malattia resecabile totalmente sviluppa una ripresa di malattia che nella maggioranza dei casi (80%) si verifica entro i primi 3 anni dall'intervento chirurgico e, solitamente, entro i primi 5 anni [51]. Le sedi più frequenti di ripresa di malattia sono fegato, linfonodi addominali, peritoneo e polmone [54].

1.7 CRC e trattamento

1.7.1 Malattia localizzata

La stadiazione della malattia è di fondamentale importanza per poter decidere poi la strategia terapeutica a cui il paziente deve esser sottoposto.

Circa l'80% dei pazienti con cancro del colon si presenta alla diagnosi con malattia resecabile radicalmente.

Dati di letteratura evidenziano come lo stadio T influenzi la prognosi in misura maggiore rispetto allo stadio N e come sia importante, nel definire la prognosi, il rapporto tra linfonodi positivi e linfonodi analizzati.

La chemioterapia si definisce terapia neoadiuvante se somministrata prima dell'intervento 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 [52].

Per pazienti in stadio I l'uso della chemioterapia sistemica adiuvante non trova evidenza in letteratura, ed i potenziali benefici di un trattamento precauzionale sono nettamente inferiori ai potenziali rischi correlati alla somministrazione dello stesso.

L'indicazione terapeutica nello stadio II è tuttora controversa in quanto i pazienti esposti al 5-Fluorouracile (in monochimioterapia) hanno un beneficio assoluto del 3-4% [55-56]. Nella scelta terapeutica è pertanto indicata una valutazione ad hoc per ogni singolo paziente in modo da valutare il rapporto beneficio/rischio sul singolo paziente soprattutto tenendo conto della presenza o meno di fattori prognostici sfavorevoli come occlusione, perforazione del peritoneo viscerale e/o invasione diretta di altri organi o strutture (T4), Grading G3-4, inadeguato numero di linfonodi analizzati (<12), presenza di invasione vascolare, linfatica e/o perineurale. [57].

Nei pazienti operati per un adenocarcinoma del colon in stadio III la chemioterapia adiuvante ha dimostrato una riduzione del rischio relativo di morte del 33%, con un beneficio assoluto in sopravvivenza del 10-15%. Tali risultati sono stati ottenuti già in studi degli anni '90 mediante l'impiego di schemi contenenti 5-Fluorouracile e acido folinico somministrati con schedula mensile o settimanale per almeno 6 mesi. Gli schemi che utilizzano il 5-Fluorouracile in infusione prolungata sono equiefficaci a quelli che utilizzano il 5-Fluorouracile in bolo, ma l'impiego del 5-Fluorouracile in bolo è legato a maggiore tossicità [58-59].

Un singolo studio randomizzato di ampie dimensioni in pazienti in stadio III ha dimostrato che il trattamento con Capecitabina ha pari efficacia e migliore tollerabilità rispetto ai regimi con acido folinico e 5-Fluorouracile in bolo e che questo farmaco può essere considerato una valida alternativa[60].

Diverse evidenze hanno valutato l'impiego del trattamento con la combinazione di 5-Fluorouracile, acido folinico e Oxaliplatino o di Capecitabina e Oxaliplatino come prima scelta per pazienti radicalmente resecati per tumore del colon in stadio III e buon PS, soprattutto se di età inferiore ai 70 anni. Infatti, negli stadi III l'impiego di combinazioni di 5-fluorouracile, acido folinico e Oxaliplatino, sia con regimi infusionali (tra cui il regime FOLFOX4) che bolo (FLOX), ha consentito di ottenere, rispetto all'associazione 5-Fluorouracile + acido folinico, un ulteriore significativo vantaggio in termini di sopravvivenza libera da malattia (DFS) a 3 e 5 anni e di sopravvivenza globale (OS) a 6 e 10 anni con il regime FOLFOX4.

Le evidenze disponibili orientano pertanto verso l'impiego del trattamento con la combinazione di 5-Fluorouracile, acido folinico e Oxaliplatino o di Capecitabina e Oxaliplatino come prima scelta [61].

1.7.2 Malattia metastatica

Circa il 20% dei pazienti con carcinoma coloretale presenta una malattia avanzata alla diagnosi.

Circa il 35% dei pazienti trattati con intento curativo svilupperà una malattia avanzata.

La malattia metastatica ha una prognosi infausta: il tasso di sopravvivenza a 5 anni è <10% ed il tempo di sopravvivenza mediano dei pazienti trattati con una terapia di supporto ottimale senza alcuna chemioterapia è 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.

I farmaci che hanno dimostrato utilità nel trattamento della malattia avanzata sono le fluoro pirimidine sia orali che endovenose, l'irinotecan, l'oxaliplatino il regorafenib, la trifluridina/tipiracil (TAS-102) e, in studi molto datati, la mitomicina C. 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. La scelta dei farmaci e delle combinazioni da impiegare deve essere effettuata valutando le caratteristiche del paziente e della malattia [52].

La presenza di mutazioni somatiche nei geni KRAS ed NRAS è un meccanismo di resistenza agli anticorpi monoclonali anti-EGFR e, pertanto, l'analisi mutazionale è indispensabile per una corretta programmazione terapeutica[52].

1.7.3 Farmacogenomica

I farmaci citotossici sono metabolizzati attraverso complessi meccanismi nei quali sono coinvolte diverse attività enzimatiche. La tossicità dei farmaci citotossici è da considerare nella scelta terapeutica del paziente, infatti è ormai noto che una ridotta funzionalità degli enzimi deputati al metabolismo di questi farmaci comportano un accumulo del farmaco o di suoi metaboliti attivi con possibile incremento della tossicità.

Numerosi studi hanno evidenziato che varianti geniche di enzimi coinvolti nel metabolismo delle fluoropirimidine e dell'irinotecano sono associate ad un più elevato rischio di tossicità [61].

Nel caso delle fluoropirimidine l'enzima coinvolto è codificato dal gene DPYD e varianti note di questo gene (c.1236G>A, c.1129-5923C>G, c.1679T>G, c.1905+1G>A, c.2846°>T) sono associate ad una ridotta attività enzimatica.

L'UGT (uridina-glucuronosil-transferasi) è l'enzima coinvolto nel metabolismo epatico di un metabolita attivo dell'irinotecano [62].

La variante allelica UGT1A1*28 è associata a ridotto metabolismo dell'irinotecano. Numerosi studi hanno rivelato che pazienti con tale variante vanno incontro più frequentemente a tossicità ematologica e diarrea [62].

Al fine di prevenire reazioni avverse potenzialmente molto gravi e potenzialmente fatali, l'EMA Pharmacovigilance Risk Assessment Committee nella nota del 13/3/2020 raccomanda l'esecuzione di test genetici per rilevare la presenza dei diversi polimorfismi del gene DPYD e delle diverse varianti del gene UGT prima dell'inizio della chemioterapia specifica.

1.7.4 Terapia di mantenimento

Negli studi clinici, l'utilizzo della doppietta chemioterapica in combinazione o meno al farmaco biologico, è programmata fino alla progressione della malattia o all'avvento di effetti tossici inaccettabili [63]. 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 overall survival (OS).

Secondo le ultime linee guida la migliore strategia di mantenimento è stata raggiunta con bevacizumab: 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 [52,63]

Anche Regorafenib, un piccolo inibitore delle chinasi, è stato identificato come un potenziale candidato per la monoterapia di mantenimento [64].

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 [65].

1.7.5 Target Therapy

Negli ultimi anni le crescenti conoscenze circa i meccanismi biomolecolari alla base della trasformazione e progressione tumorale hanno permesso notevoli progressi nell’ambito dello sviluppo di nuove opzioni terapeutiche che hanno radicalmente cambiato la l’OS dei pazienti con mCRC. La terapia con farmaci a bersaglio molecolare, in associazione ai farmaci citotossici, ha migliorato notevolmente l’OS di questi pazienti.

Attualmente nel trattamento del mCRC sono due le principali classi di farmaci che vengono utilizzate: farmaci anti-angiogenici, quali bevacizumab e farmaci anti-EGFR, quali cetuximab e panitumumab. Inoltre, recentemente, regorafenib, un inibitore tirosin-chinasico multitarget è stato registrato per il trattamento in monoterapia in linee avanzate.

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 (Fig. 9). 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 progression free survival (PFS) mediana è stata di 9.2 mesi vs 5.5 mesi [66].

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 [67].

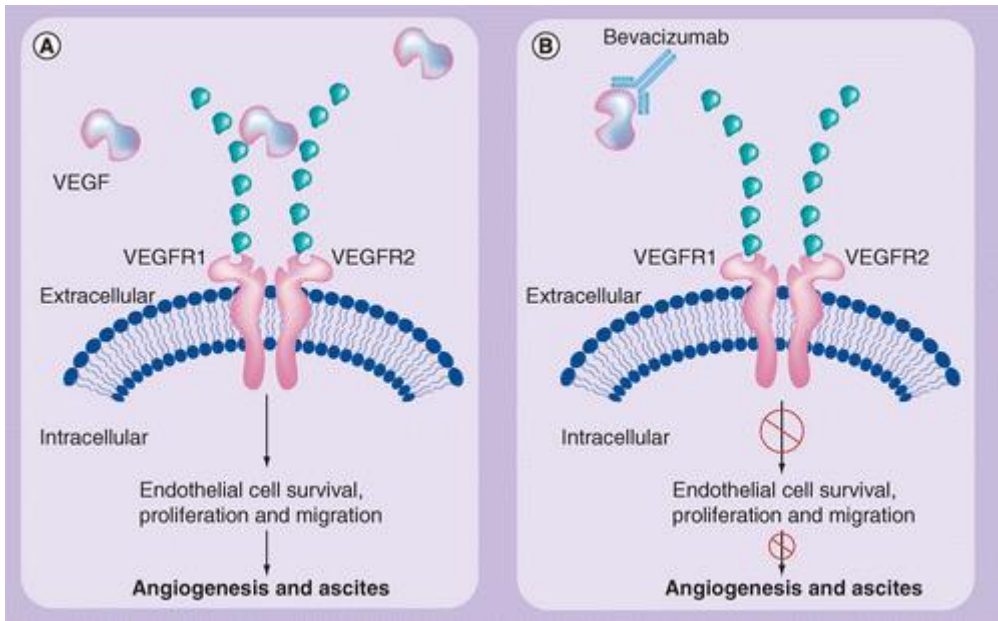


Fig. 9: Meccanismo d'azione del farmaco Bevacizumab.

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. (Fig. 10).

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 [68].

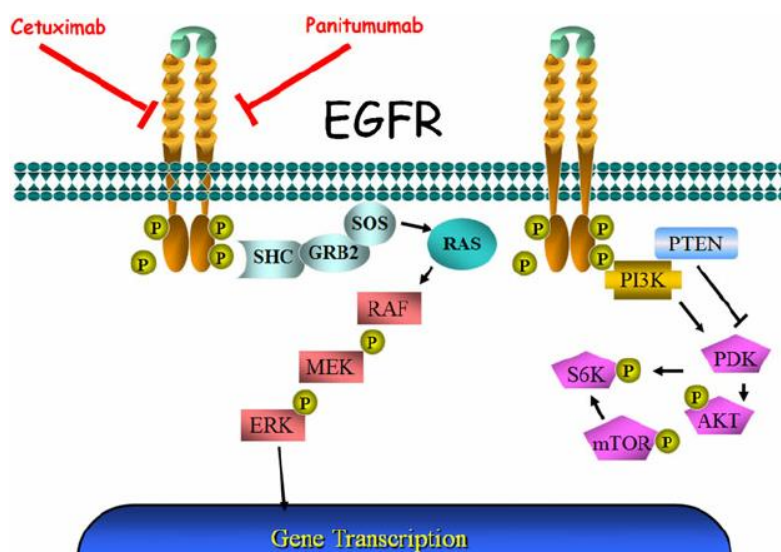


Fig. 10: Meccanismo d'azione dei farmaci anti-EGFR cetuximab e panitumumab.

OPUS, COIN e Prime sono gli studi principali che hanno evidenziato come il beneficio dell'utilizzo di anticorpi anti-EGFR è evidente solo in una popolazione molecolarmente 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 PFS (9.6 vs 8 mesi) e l' OS (23.9 vs 19.7) nei pazienti con tumori *KRAS* wild-type.

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 [69].

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 [52].

1.7.6 Biomarcatori molecolari

Un biomarcatore molecolare in ambito clinico è un indicatore biologico. Esso può avere un significato prognostico, cioè fornisce informazioni sulla storia naturale della patologia di un particolare paziente, indipendentemente dal trattamento, oppure un significato predittivo (o di risposta) ed in questo caso aiuta a distinguere 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 [70].

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 il quale, 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 [71]. (Fig. 11).

Le tre principali proteine 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 in presenza di qualsiasi mutazione di *RAS* non è stato osservato nessun beneficio.

Sulla base di questi risultati EMA ed AIFA hanno ristretto l'impiego di panitumumab e cetuximab ai soli pazienti *RAS*^{wt} e che quindi lo stato di *RAS* deve essere stabilito prima di iniziare il trattamento.

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.

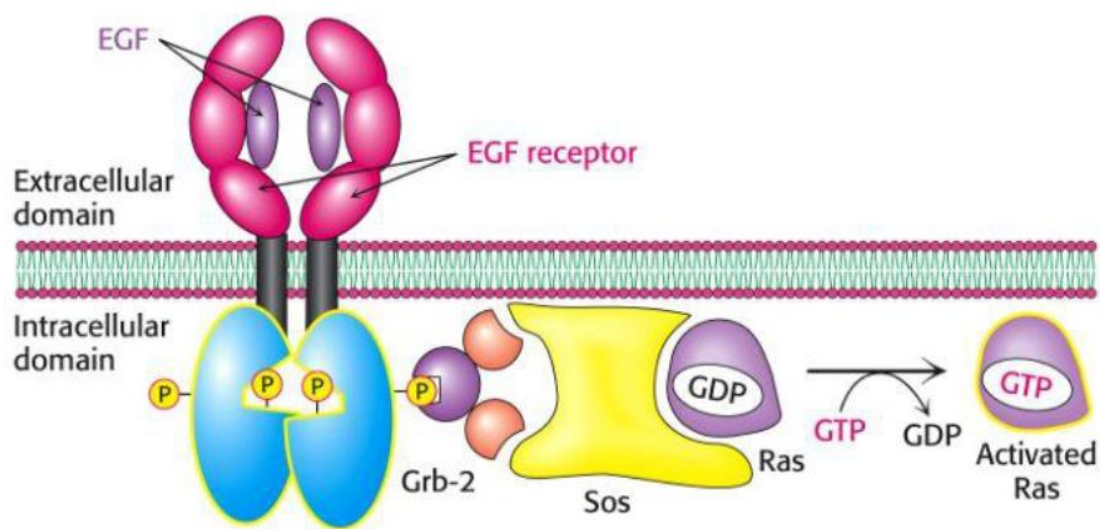


Fig. 11: Meccanismo d'azione di Ras

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 OS tra i 4 e i 6 mesi dopo progressione dal trattamento di I linea [71].

Il vemurafenib, farmaco a bersaglio molecolare usato in diversi tumori in presenza della mutazione di *BRAF^{V600E}* nei pazienti con mCRC non risulta efficace [72].

Diversi studi degli ultimi anni hanno evidenziato l'utilizzo di farmaci anti-EGFR quali cetuximab o panitumumab, non sono efficaci per i pazienti *BRAF^{V600E}* [73].

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 con una 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}*[74].

Successivamente 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.

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. Nei tumori sporadici si evidenzia un'associazione, nel 20% dei casi, tra la mutazione *BRAF*^{V600E} ed un'alta instabilità dei microsatelliti (MSI).

L'instabilità dei microsatelliti è un importante fattore prognostico, infatti i tumori con alta instabilità dei microsatelliti sono spesso stati associati a prognosi favorevole rispetto ai tumori che presentavano stabilità dei microsatelliti [75].

Circa il 5% dei pazienti con mCRC presenta un MSI e questo marcatore rappresenta uno dei principali predittori dell'efficacia degli inibitori del checkpoint immunitario (ICIs). L'alta instabilità dei microsatelliti nei tumori è spesso associata da un alto carico mutazionale [76]. 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.

Lo studio di fase III KEYNOTE-177 ha recentemente dimostrato la superiorità in termini di PFS del pembrolizumab in monoterapia rispetto alla chemioterapia standard di prima linea (FOLFOX o FOLFIRI, con o senza *bevacizumab* o *cetuximab*) (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 presto lo standard di cura in prima linea nei pazienti con mCRC MSI [77].

Metilazione del gene MGMT

il gene MGMT codifica per l'enzima O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasi (MGMT) il quale è una proteina di riparazione del DNA che rimuove gli addotti mutageni e citotossici dalla O⁶-guanina nel DNA. MGMT protegge le cellule da queste lesioni, trasferendo il gruppo alchilico dalla O⁶-guanina nel DNA a una cisteina attiva nella sua stessa sequenza. Tale reazione inattiva una molecola MGMT per ogni lesione riparata [78]. L'inattivazione dei geni oncosoppressori, in particolare del gene MGMT [79], per la presenza di meccanismi di metilazione delle isole CpG presenti a livello

della regione promotrice, negli ultimi anni è diventato un meccanismo cruciale da considerare nella gestione dei pazienti oncologici [80].

È noto che circa il 40% dei CRC ha un silenziamento del gene MGMT. È interessante notare che in un'analisi retrospettiva su 244 campioni di CRCs, è stato trovato che il 71% dei tumori con mutazione da G ad A in KRAS presenta l'inattivazione epigenetica di MGMT, mostrando una forte associazione tra l'inattivazione di MGMT tramite ipermetilazione del promotore e la comparsa di mutazioni da G ad A in KRAS [81]. Inoltre, la ipermetilazione MGMT è stata trovata anche nel 35% dei CRC KRAS wild-type. Nelle cellule, la perdita di espressione di MGMT può giocare un ruolo significativo nella progressione del cancro e nella risposta alla chemioterapia come avviene nel glioma [82-83]. I primi studi che indicano la metilazione del gene MGMT come importante marker tumorale in gliomi risalgono agli anni 2000 e negli anni successivi sono stati intrapresi svariati trial al fine di capire la relazione tra l'efficacia della terapia con gli agenti alchilanti e lo stato di MGMT. L'importanza di questo marker tumorale e l'efficacia di agenti alchilanti in tumori mCRC è stato oggetto di diversi studi negli ultimi anni.

1.8 Screening molecolare nei pazienti mCRC

La caratterizzazione molecolare ha assunto negli ultimi anni 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* e *NRAS*, in quanto la presenza di mutazioni in questi geni è un noto 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 candidati a ricevere la terapia anti-EGFR [84].

Importante ad oggi è anche la valutazione dello stato mutazionale di *BRAF* che oltre ad avere un significato prognostico rappresenta un utile target terapeutico.

Altri screening raccomandati riguardano la valutazione dello stato microsatellitare, l'amplificazione di HER2 e il rilevamento di fusioni in NTRK.

La metilazione del gene MGMT è attualmente approvato come target terapeutico solo nei gliomi ma diversi studi degli ultimi anni hanno evidenziato come questo sia un utile target anche nei mCRC.

1.8.1 Screening molecolare in un laboratorio di patologia molecolare

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.

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 è essenzialmente rappresentato dal fatto che trattandosi di un sequenziamento mediante elettroforesi capillare, ogni frammento di DNA target deve essere corso separatamente, aumentando la durata complessiva del processo ed inoltre limitando il numero di reazioni che possono essere eseguite in parallelo.

Difatti, la valutazione dei diversi biomarcatori in ogni paziente sarebbe difficile da attuare con metodologia Sanger in quanto richiederebbe lunghi tempi ed inoltre 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).

Inoltre c'è da considerare anche il fatto che il limite di sensibilità (LOD) del Sanger sequencing è troppo alto per la ricerca di mutazioni di resistenza in seguito ad un trattamento con anti-EGFR.

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.

I test NGS sono molto sensibili rispetto alle tecnologie tradizionali il che consente il rilevamento di cloni tumorali che presentano una mutazione di resistenza i quali possono essere presenti a bassissima frequenza anche prima dell'inizio del trattamento.

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.

Il metodo Sanger risulta ad oggi il metodo più utilizzato insieme all'immunoistochimica (IHC) per l'analisi dell'instabilità dei microsatelliti.

L'analisi della metilazione del promotore MGMT fino a pochi anni fa veniva valutata esclusivamente mediante PCR con primer specifici (MSP) seguita da sequenziamento dei prodotti di PCR o da semplice corsa degli stessi su gel di poliacrilamide. La PCR viene preceduta dalla conversione dei loci specifici con bisolfito.

Tuttavia questa tecnica pur essendo una tecnica molto affidabile presenta alcune limitazioni che hanno fatto sì che con il tempo venisse sostituito dal Pirosequenziamento che ad oggi rappresenta, secondo le linee guida WHO per l'indagine dei target nei gliomi, il 'gold standard' per l'analisi della metilazione del gene MGMT [87].

Uno dei limiti del MSP è dovuto al fatto che non ci sia un controllo interno per ogni campione che indichi che la reazione di conversione con bisolfito sia avvenuta correttamente, il che spiega le rilevate da studi comparativi tra i casi metilati rilevati con questa metodica e quelli rilevati con Pyrosequencing. L'assenza di un controllo interno ad ogni reazione infatti potrebbe causare la presenza di falsi positivi. Inoltre il pyrosequencing a differenza del MSP restituisce una percentuale di metilazione per ogni sito analizzato quindi in questo caso l'analisi è operatore indipendente. Inoltre questa metodica necessita di quantità di DNA di partenza molto inferiori, il che è un

vantaggio enorme dato che non sempre si ha a disposizione grandi quantità di materiale tumorale di partenza [88].

1.8.2 Biopsia liquida e CRC

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. 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, 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 12).

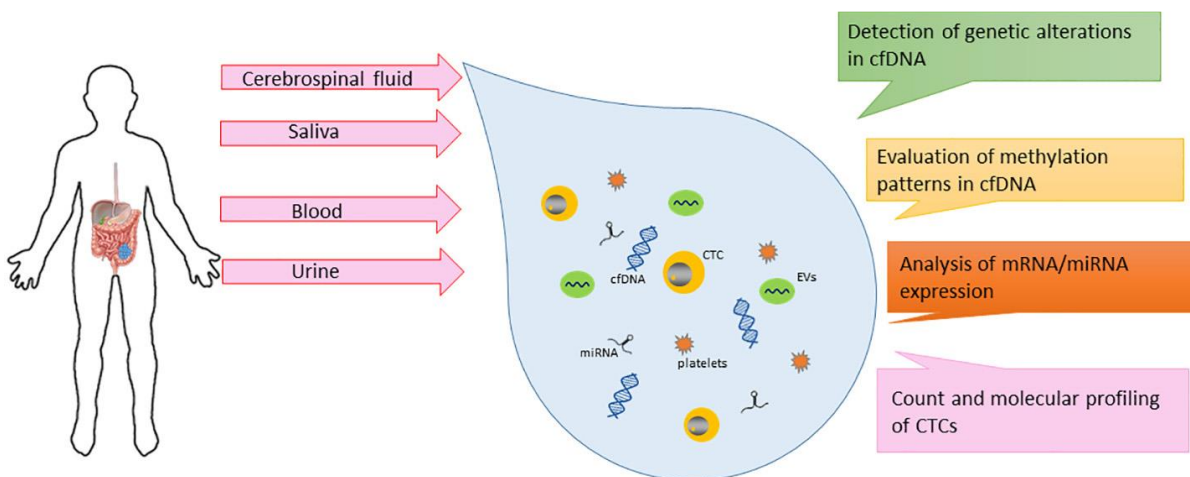


Fig.12: Applicazioni della biopsia liquida in pazienti con CRC.

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 [89]. Inoltre è possibile fornire informazioni più complete circa l'intero carico mutazionale del paziente e quindi fare un quadro dell'eterogeneità del tumore.

La biopsia liquida rappresenta un utile alternativa quando non sia disponibile una biopsia tessutale o quando il materiale derivante da questa risulti inadeguato per l'analisi molecolare.

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 e 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.

Nonostante negli ultimi anni la biopsia liquida è stata descritta come un utile strumento per monitorare l'evoluzione della malattia nel CRC [90] attualmente l'impiego nella pratica clinica è consentito solo nei carcinomi al polmone per individuare la presenza di mutazioni di resistenza o nel caso in cui non è disponibile una biopsia tessutale. Nel CRC attualmente la biopsia liquida è considerata un approccio sperimentale ed è limitato a studi clinici. Lo studio PARERE è il primo studio clinico in cui la biopsia liquida viene utilizzata per l'arruolamento dei pazienti.

2. Scopo del progetto

2. SCOPO DEL PROGETTO

Durante il mio dottorato ho lavorato contemporaneamente su due progetti riguardanti il carcinoma del colon retto metastatico entrambi afferenti al laboratorio di patologia molecolare presso la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano.

Il primo progetto fa parte dello studio MAYA [91] e ha lo scopo principale di valutare se il trattamento con temozolomide (TMZ) in pazienti che presentano il silenziamento di MGMT, sia a livello genico che a livello proteico, e che presentano all'origine uno stato di stabilità microsatellitare, generi, con l'ipermutazione che ne consegue, un immunosensibilizzazione dei pazienti.

Come precedentemente riportato, gli inibitori del checkpoint immunitario (ICI) hanno fornito un beneficio senza precedenti nel piccolo sottogruppo di pazienti con cancro coloretale metastatico (mCRC), circa il 5%, che presentano un'alta instabilità microsatellitare. La base biologica di tale immunosensibilità si basa sull'ipermutazione relativa al macchinario del MMR (Mismatch repair deficiency, dMMR), con aumento del carico di neoantigeni clonali e immunogenici e up-regolazione di diversi checkpoint immunitari. Infatti, la maggior parte dei pazienti con mCRC che non presentano alterazioni nel sistema del MMR e che presentano una stabilità microsatellitare hanno tumori che mostrano con resistenza intrinseca alle ICI.

La temozolomide (TMZ) è un agente alchilante orale approvato per i pazienti con glioblastoma (GBM) che presentano la metilazione del promotore della O6-metilguanina-DNA metiltransferasi (MGMT) . Infatti, poiché MGMT è un enzima chiave coinvolto nella riparazione dei danni al DNA indotti da agenti alchilanti, il silenziamento epigenetico di MGMT rappresenta un meccanismo di letalità sintetica dopo l'esposizione alla TMZ. Anche se la metilazione MGMT si trova in circa il 40% dei tumori colorettali, la dacarbazina e il suo prodrug TMZ hanno prodotto un'attività modesta in pazienti selezionati con mCRC metilati con MGMT, con un tasso di risposta globale <10% in diversi studi [9-93].

La resistenza farmacologica che si presenta dopo una prima fase di risposta alla TMZ può essere legata alle sue proprietà mutagene ed è spesso associata con l'emergere di mutazioni secondarie nei geni MMR, soprattutto MSH6 [94-95]. Su questi presupposti nasce lo studio MAYA che è stato progettato per valutare la sicurezza e l'efficacia di TMZ combinato con nivolumab più ipilimumab a basso dosaggio in pazienti idonei con controllo precoce della malattia dopo un trattamento di inizio con TMZ a singolo agente.

Il secondo progetto a cui ho preso parte è lo studio PARERE che è uno studio prospettico multicentrico di fase II che prevede l'arruolamento di 214 pazienti con mCRC. Questi pazienti, refrattari alla chemioterapia devono risultare wt su cfDNA in RAS/BRAF ed aver mostrato in precedenza un beneficio dal trattamento di prima linea a base di anti-EGFR. La biopsia liquida su cui si effettua lo screening viene raccolta al momento dell'inclusione. I pazienti con queste caratteristiche saranno randomizzati in un rapporto 1:1 a ricevere panitumumab seguito dopo la progressione da regorafenib contro la sequenza inversa [96].

Questo studio rappresenta il primo studio in cui l'analisi mutazionale su biopsia liquida viene utilizzato per l'arruolamento dei pazienti.

Il rationale scientifico di questo studio deriva da un recente studio giapponese randomizzato di fase II, REVERCE [97], che ha riportato una migliore sopravvivenza con regorafenib seguito alla progressione da cetuximab ± irinotecan rispetto alla sequenza standard inversa in pazienti mCRC refrattari alla chemio e anti-EGFR-naïve, RAS wild-type (wt).

Oggi l'uso di anticorpi anti-EGFR è più frequentemente anticipato alla prima linea di terapia soprattutto nei pazienti con tumori RAS/BRAF wt sul lato sinistro. Analisi retrospettive e gli studi di fase II a braccio singolo, hanno mostrato un'attività promettente del riutilizzo degli anti-EGFR nei pazienti con cancro coloretale metastatico (mCRC) che hanno precedentemente ottenuto un beneficio da un trattamento di prima linea basato sugli anti-EGFR. Le analisi di questi studi hanno evidenziato che la rilevazione di mutazioni RAS nel DNA tumorale circolante (ct-DNA) al momento del ritrattamento può essere utile per identificare i pazienti resistenti.

L'arruolamento è ad oggi ancora in corso ed i primi risultati di questo studio sono previsti entro il 2023.

3. Materiali e metodi

3.1 Materiali e metodi studio MAYA

3.1.1 Disegno dello studio e partecipanti

Lo studio MAYA è uno studio di fase II multicentrico, a braccio singolo, in aperto, a cui hanno partecipato 12 ospedali in Italia.

I pazienti eleggibili avevano le seguenti caratteristiche:

- età ≥ 18 anni;
- performance status secondo i criteri dell'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) di 0 o 1;
- adenocarcinoma del colon e/o del retto metastatico e inoperabile confermato istologicamente;
- malattia in progressione a terapia a base di oxaliplatino, irinotecan, chemioterapia a base di fluoropirimidine e agenti anti-EGFR (nei tumori RAS/BRAF wild type), o controindicazione ad agenti specifici a giudizio degli investigatori locali;
- stato MSS confermato centralmente dalla PCR multiplex
- metilazione del promotore MGMT tramite pirosequenziamento e espressione MGMT assente tramite IHC.

3.1.2 Procedura

Lo pre-screening molecolare è stato eseguito centralmente su campioni fissati in paraffina inviati al Centro di Coordinamento, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano.

L'algoritmo adottato (Fig. 13) è partito dall'esame patologico del tumore e dall'IHC di MGMT: i campioni con qualsiasi colorazione di MGMT nelle cellule tumorali sono stati dichiarati esclusi nel pre-screening, mentre quelli con assenza di espressione proteica sono stati sottoposti a pirosequenziamento del promotore di MGMT per la conferma della metilazione di MGMT utilizzando il cut-off del 6% [98] ed all'analisi dello stato di MSS con la tecnica della PCR multiplex in cui i loci analizzati sono stati: BAT 25, BAT 26, NR-21, NR-22, NR-24 [99].

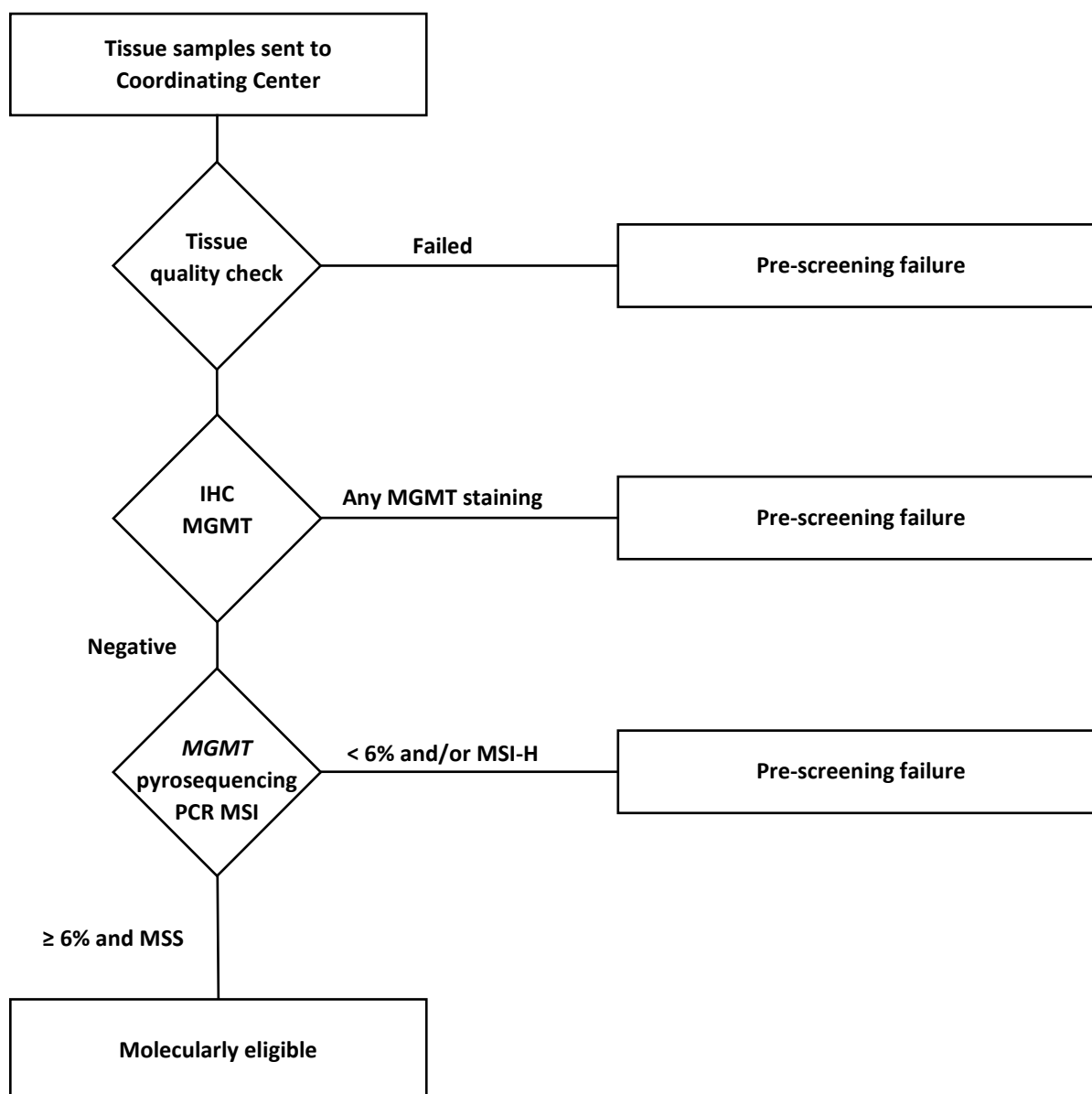


Fig. 13: algoritmo del pre-screening[91]

I pazienti ritenuti idonei secondo i criteri di ammissibilità sia molecolare che clinica sono stati arruolati. Questi pazienti hanno iniziato la prima fase di trattamento con una somministrazione orale di TMZ alla dose di 150 mg/mq al giorno nei giorni 1-5 ogni 4 settimane, per 2 cicli.

Alla fine della prima fase di trattamento, è stata eseguita la ristadiazione radiologica alla settimana 7 +/- 5 giorni.

In caso di progressione di malattia (PD) secondo RECIST v1.1 i pazienti erano fuori dallo studio.

In caso di risposta completa (CR), risposta parziale (PR), o malattia stabile (SD) secondo RECIST v1.1, i pazienti hanno iniziato la seconda fase di trattamento e hanno ricevuto TMZ alla dose e al programma precedentemente adottati, in combinazione con nivolumab alla dose di 480 mg

somministrato per via endovenosa ogni 4 settimane più ipilimumab a basso dosaggio a 1 mg/Kg somministrato per via endovenosa ogni 8 settimane (Fig. 14) [91].

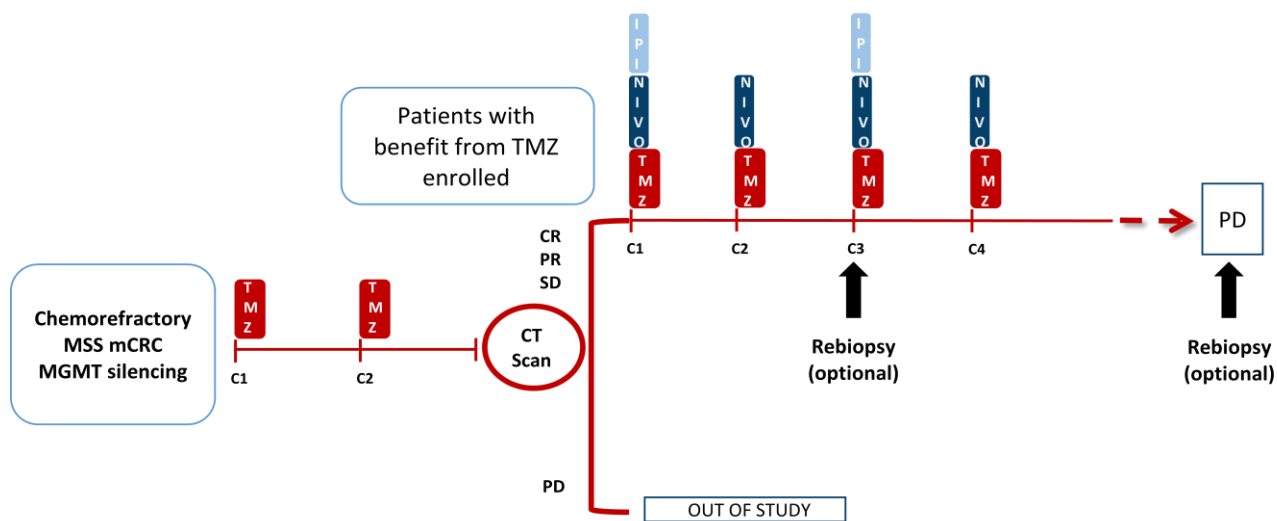


Fig.14 disegno dello studio: il disegno dello studio prevede una prima parte di trattamento con due cicli di temozolomide e la seconda parte di trattamento, comprendente la combinazione di temozolomide e nivolumab più ipilimumab a basso dosaggio. CT, tomografia computerizzata; CR, risposta completa; IPI, ipilimumab; NIVO, nivolumab; PD, malattia progressiva; PR, risposta parziale; SD, malattia stabile; TMZ, temozolomide. [91]

Nella prima fase di trattamento e nella seconda fase i pazienti hanno ricevuto i trattamenti dello studio fino alla PD, alla tossicità inaccettabile, al ritiro del consenso o al decesso, a seconda di ciò che si è verificato prima.

Valutazioni radiografiche (CT preferita o MRI dell'addome e del bacino, CT del torace) sono state fatte allo screening e ogni 8 settimane durante i primi 12 mesi, poi ogni 12 settimane.

I test clinici di laboratorio e le valutazioni di sicurezza sono stati fatti allo screening e ad ogni visita prevista ogni 4 settimane. Le valutazioni di sicurezza includevano la registrazione dell'incidenza, della natura e della gravità degli eventi avversi, dei cambiamenti nei segni vitali e delle anomalie di laboratorio, classificati secondo i criteri di terminologia comune per gli eventi avversi del National Cancer Institute (NCI CTCAE), versione 4.0.

La qualità della vita è stata valutata ogni 8 settimane durante i primi 12 mesi, poi ogni 12 settimane, attraverso strumenti PRO (Patient Reported Outcomes) completati integralmente dal paziente.

Dopo la progressione, tutti i pazienti sono stati seguiti per la sopravvivenza e la successiva terapia antitumorale ogni 3 mesi fino al decesso, alla perdita del follow-up o al ritiro del consenso, a seconda di cosa si è verificato prima.

3.1.3 End point dello studio

L'end point primario dello studio è stato il tasso di sopravvivenza libera da progressione (PFS) valutato dallo sperimentatore a 8 mesi nei pazienti che hanno iniziato la seconda parte del trattamento ed indica la proporzione di pazienti vivi e liberi da progressione entro 8 mesi dall'inizio della prima parte del trattamento [91].

Gli end point secondari erano: la PFS, definita come l'intervallo dalla data di arruolamento nella prima parte del trattamento alla data di progressione della malattia (PD) o alla morte per qualsiasi causa; la sopravvivenza globale (OS), definita come l'intervallo dalla data di arruolamento nella prima parte del trattamento alla data di morte per qualsiasi causa; il tasso di risposta complessivo (ORR), definito come la proporzione di pazienti che ottengono una risposta obiettiva (risposta completa o PR) usando come riferimento il quadro clinico ottenuto prima della monoterapia con temozolomide come baseline; durata della risposta (DoR).

3.1.4 Analisi statistica

La dimensione del campione è stata calcolata sulla base dell'end point primario del tasso di PFS a 8 mesi. Secondo risultati precedentemente pubblicati [100-101-102] la PFS dei pazienti con mCRC con MGMT-silenziato e beneficio clinico da temozolomide a singolo agente è quasi sempre < 8 mesi. In questo studio si mira ad aumentare il tasso di PFS a 8 mesi dal 5% al 20% con la combinazione di temozolomide, nivolumab e ipilimumab.

PFS, OS e DoR sono stati valutati con il metodo Kaplan-Meier.

Per l'analisi QoL, sono stati descritti i punteggi medi (con deviazione standard) ad ogni punto temporale, e confrontati con i punteggi al basale mediante il test T appaiato[91].

3.1.5 Screening molecolare

Estrazione del DNA da campioni paraffinati

Per ogni campione FFPE pervenuto è stata eseguita una valutazione da parte del patologo sul vetrino colorato con ematossilina-eosina il quale, dopo un esame istopatologico, procede alla selezione dell'area tumorale e all'identificazione della percentuale di cellule tumorali presenti.

Mediante macrodissezione, per ogni paziente sono state raccolte da 2 a 10 sezioni da 5 µm ed usando bisturi sterile è stata prelevata l'aria corrispondente a quella tumorale evidenziata dal patologo. Il numero di sezioni sottoposte a macrodissezione dipende dalle dimensioni dell'area selezionata e dalla cellularità del campione. Il tessuto ottenuto è stato raccolto in provette Eppendorf da 1.5 ml e le eppendorf sono state centrifugate per far scendere il pellet sul fondo. Il pellet è stato poi sottoposto a deparaffinatura ed estrazione del DNA secondo il protocollo indicato di seguito:

Protocollo:

- aggiungere 500 µl di xilolo in ogni provetta da 1,5 ml di raccolta per deparaffinare il campione. Vortexare e centrifugare il campione per 5 minuti alla velocità di 1400rpm ed in seguito eliminare il surnatante. Questo passaggio va eseguito 2 volte consecutive.
- aggiungere 500 µl di etanolo in ogni provetta. Vortexare e centrifugare il campione per 5 minuti alla velocità di 1400rpm ed in seguito eliminare il surnatante. Questo passaggio va eseguito 2 volte consecutive.
- Asciugare il pellet in stufa a 56°C per circa 5 minuti
- Risospendere il pellet in 50-500ul (a seconda delle dimensioni del pellet) di Lysis Buffer (20mM TrisHCl pH8, 20mM EDTA, 2% SDS) più proteinasi K (stock 10-20 mg/ml) in rapporto LysisB: prot.K = 4:1.
- Lasciare in stufa a 56°C overnight per permettere alla proteinasi K di digerire il pellet
- Bloccare l'azione della proteinasi K ponendo il campione a 95 ° per 10 minuti
- quantificare i campioni allo spettrofotometro

Valutazione della stabilità microsatellitare

La valutazione dello stato dei microsatelliti è stata eseguita mediante una reazione di PCR multipla in cui sono stati amplificati contemporaneamente 5 loci: BAT 25, BAT 26, NR-21, NR-22, NR-24. Per ogni coppia di primer specifici per un locus uno è marcato con un fluorocromo (HEX; FAM; NED). I primer usati sono indicati nella tabella seguente:

Tabella 3: primer utilizzati per la valutazione dello stato dei microsatelliti

LOCUS	PRIMER	MARCATURA
BAT 25 F	TCGCCTCCAAGAATGTAAGT	*NED/TAMRA
BAT25 R	TCTGCATTTTAACTATGGCTC	NO
BAT 26 F	TGACTACTTTTGACTTCAGCC	NO
BAT 26 R	AACCATTCAACATTTTAAACCC	*6-FAM
NR 21 F	TAAATGTATGTCTCCCCTGG	NO
NR 21 R	ATTCCTACTCCGCATTCACA	*HEX
NR 22 F	GAGGCTTGCAAGGACATAA	NO
NR 22 R	AATTCGGATGCCATCCAGTT	*6-FAM
NR 24 F	CCATTGCTGAATTTTACCTC	NO
NR 24 R	ATTGTGCCATTGCATTCCAA	*HEX

Per ogni campione da analizzare è stata eseguita una doppia PCR usando quantità diverse di DNA di partenza. Nella prima PCR sono state amplificati 100 ng di DNA mentre nella seconda 200ng di DNA.

La ricetta per la PCR è la seguente:

- Buffer10X (Ci) = 5µl →1X (Cf)
- Primer (F/R) 10µM(Ci) = 2µl per ogni primer (20µl tot; 0,5µM (Cf)
- WonderTaq 5U/µl→0.5U/s = 0.06µl
- H₂O = 10µl

Ogni seduta di reazione prevedeva l'amplificazione di un controllo MSS e di un bianco di reazione.

Il profilo termico della reazione di PCR è:

Stage	Temperature	Time
Hold	94°C	5 min
40 cicli	94°C	30 sec
	55°C	30 sec
	72°C	30 sec
Hold	4°C	7 min
Hold		

La PCR è stata poi caricata su piastra di sequenza: 1µl di prodotto PCR + 9µl di Formamide+ROX [(9.5µ+0.5µl)mix]. La piastra è stata denaturata a 94° per 3 min e messa in ghiaccio. La piastra è stata poi caricata sul sequenziatore Genetic Analyzer 3500DX impostando come programma di corsa un'analisi dei frammenti.

L'analisi dei frammenti così sequenziati è stata poi eseguita su Gene Mapper software 4.1.

Pyrosequencing

Il principio del pirosequenziamento si basa sul sequenziamento mediante sintesi consentendo il monitoraggio della sintesi di DNA mediante il rilevamento della bioluminescenza prodotta al termine di una cascata di reazioni enzimatiche. Il processo può essere diviso in diversi passaggi: durante la prima fase, che è la vera e propria fase di sequenziamento, la DNA polimerasi catalizza l'incorporazione di un dNTP per volta all'interno del filamento di DNA se è complementare alla base del filamento stampo (Fig. 15).

Ogni evento di incorporazione è accompagnato dal rilascio del pirofosfato in quantità equimolare a quella del nucleotide incorporato. In presenza di adenosina-5'-fosfosolfato (APS), l'ATP solforilasi converte il Ppi in ATP. L'ATP, a sua volta, guida la conversione, catalizzata dalla luciferasi, della luciferina in ossiluciferina con conseguente produzione di luce di intensità proporzionale all'ATP.

A questo punto un enzima, l'apirasi, degrada continuamente tutti i dNTP che non vengono incorporati e l'ATP in eccesso.

Non appena la degradazione è completata viene aggiunto un altro dNTP. I dNTP vengono aggiunti ciclicamente uno alla volta.

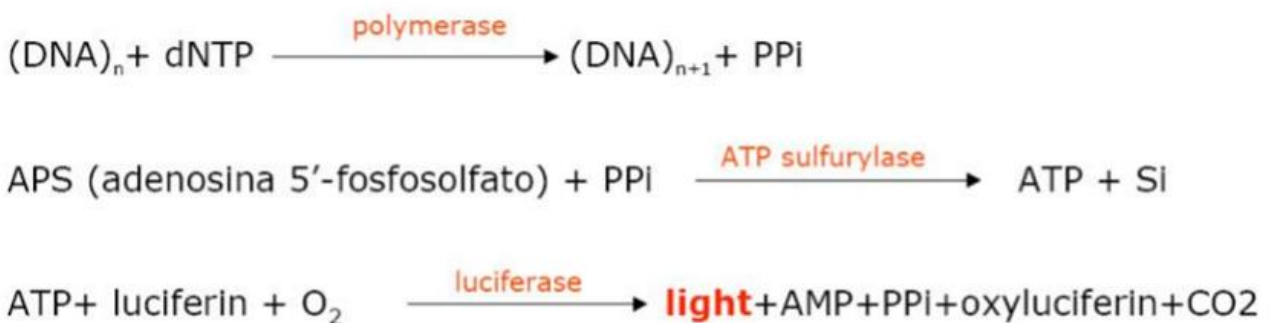


Fig15: sequenze di reazioni che si accompagnano all'attacco di un dNTPs al filamento polimerizzato

Il segnale luminoso così generato viene rilevato da una camera fotosensibile (CCD Camera) e registrato in un apposito pirogramma in cui ogni picco rappresenta un dNTP incorporato e l'intensità del segnale è proporzionale al numero di ripetizioni della base lungo lo stesso filamento: un picco doppio o triplo, per esempio, è indice dell'inglobamento nello stesso ciclo di 2 o 3 stessi dNTPs che risultano consecutivi nel template (figura 16).

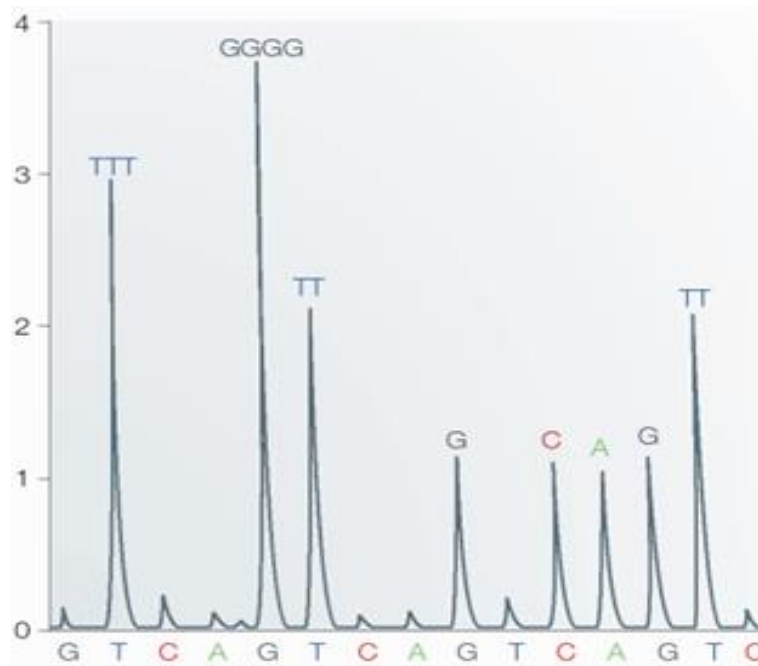


Fig16: la sequenza nucleotidica è determinata dall'altezza dei picchi del pirogramma.

In questo modo è possibile ricostruire la sequenza nucleotidica d'interesse.

Valutazione dello stato di metilazione del gene MGMT mediante Pyrosequencing

Le metodiche attualmente in uso per detectare lo stato di metilazione del gene MGMT prevedono una prima fase di "conversione" del DNA, eseguita con Sodio Bisolfito. Questo metodo sfrutta l'accresciuta sensibilità della citosina rispetto ai 5-metilcitosina (5-MEC) alla deaminazione con bisolfito in condizioni acide quindi il bisolfito deamina preferenzialmente citosina a uracile nel DNA a singolo filamento, mentre la 5-MEC, è refrattario al bisolfito-mediata deaminazione. Le citosine non metilate possono essere in questo modo distinte dalle citosine metilate dopo amplificazione del DNA genomico di interesse in quanto l'uracile è amplificato come timina mentre 5-MEC residui permangono come citosine.

La chimica della deaminazione delle Citosine da Bisolfito di Sodio comporta tre fasi:

1) la solfonazione ossia l'aggiunta di bisolfito al legame doppio 5-6 della citosina;

- 2) la deaminazione idrolitica del derivato citosina-bisolfito per dare un derivato uracile-bisolfito;
- 3) la rimozione del gruppo solfonato mediante trattamento alcalino per dare l'uracile.

Per questa metodica noi abbiamo utilizzato il kit CE-IVD MGMT PLUS commercializzato dalla Diatech Pharmacogenetics il quale prevede 3 fasi:

1. Conversione con Bisolfito
2. PCR dei prodotti convertiti
3. Pirosequencing

Protocollo di conversione con bisolfito

La conversione con bisolfito prevede una serie di passaggi di seguito descritti:

- Diluire il DNA in modo da ottenere una quantità compresa tra 200 e 500 ng in 20 µl.
- Aggiungere 5 µl di Dilution buffer e 25 µl di H₂O ad ogni campione in modo da avere un volume finale di 50 µl.
- Mescolare i campioni accuratamente e centrifugare brevemente.
- Incubare i campioni a 37°C per 15 minuti.
- Aggiungere 100 µl di conversion reagent (CT) risospeso ad ogni campione, miscelare e centrifugare brevemente.
- Incubare i campioni a 50°C per 12-16 ore al buio.
- Incubare i campioni in ghiaccio per 10 minuti.
- Prelevare una Spin column IC per ogni campione e posizionarla in un Collection tube.
- Dispensare 400 µl di Binding buffer in ogni colonnina poi aggiungere il campione. Chiudere il tappo della colonnina e mescolare varie volte per inversione e centrifugare per 30 secondi a 1200 rpm. Vuotare il Collection tube.
- Aggiungere 100 µl di Wash buffer in ogni colonnina e centrifugare per 30 secondi a 1200 rpm.
- Aggiungere 200 µl di Desulphonation buffer in ogni colonnina ed incubare a temperatura ambiente per 20 minuti. Dopo l'incubazione centrifugare per 30 secondi a 1200 rpm.. Vuotare il collection tube.
- Aggiungere 200 µl di Wash buffer in ogni colonnina e centrifugare per 30 secondi a 1200 rpm..
- Aggiungere altri 200 µl di Wash buffer in ogni colonnina centrifugare per 30 secondi a 1200 rpm..

- Trasferire la Spin column IC in una eppendorf da 1,5 ml ed aggiungere 12 μ l di Elution buffer al centro del filtro della colonnina. Per eluire il DNA centrifugare per 30 secondi a 1200 rpm.

Per ogni seduta di reazione sono stati inseriti i controlli positivi MGMT Methylated Ctrl DNA e MGMT Non-Methylated Ctrl DNA propri del kit ed un controllo negativo.

Protocollo di amplificazione dei prodotti convertiti

La PCR è stata eseguita su Rotor-Gene. La mix di amplificazione contiene specifici primer biotinilati che servono nella fase successiva di sequenziamento e una sonda intercalante del DNA (green dye) che serve per valutare se la PCR è avvenuta correttamente e quindi se si può procedere con il sequenziamento.

La mix di PCR è così composta:

Amp-mix	Volume reagente per 1 reazione (μ l)
H ₂ O	29
MGMT primers	1,0
HS 5x buffer ⁽¹⁾	10,0
10 mM dNTP mix	1,0
50 mM Mg ²⁺ solution ⁽¹⁾	1,0
Green Dye (20x) ⁽²⁾	2,5
HS polymerase (5 U/ μ l) ⁽¹⁾	0,5
Volume Totale	45

Ai 45 μ l di mix va aggiunto 5 μ l del prodotto di conversione.

Il profilo termico utilizzato è il seguente:

Hold 1	95°C per 5 minuti
45 cicli	95°C per 30 secondi / 53°C per 30 secondi / 72°C per 20 secondi
Hold 2	72°C per 5 minuti
5 cicli	60°C per 20 secondi

Procedura Pyrosequencing:

la reazione di sequenziamento è stata eseguita in una piastra di sequenza e prevede diversi step prima del vero e proprio sequenziamento:

- 1) Impostazione di un nuovo assay e di una nuova corsa:

Il saggio di analisi della metilazione delle CpG Islands è stato impostato secondo il seguente schema:

Assay ID	Sequenza da analizzare	Ordine di dispensazione
MGMT	YGTTTTGYGTTYGAYGTTYGTAGGT	GTCGTTAGTCTGTTTCGATCAGTCGCTAT
	TTYGYGGTGYGTATYGTTTGYGA	GTTTCAGTCGTAGTCGTGATCGTAGTCG
Evidenziato in giallo il controllo di efficienza della conversione con bisolfito		

Per la programmazione della corsa è stato necessario indicare i pozzetti della piastra utilizzati per il caricamento. In base al numero di pozzetti e quindi di campioni caricati lo strumento ha indicato i volumi di enzima, substrato e dNTPs da caricare nelle rispettive posizioni della cartuccia (Fig. 17).



Fig.17: Pyro ID cartridge

- 2) Preparazione di una piastra di ibridazione in cui la PCR è stata messa a contatto con una mix di binding contenente biglie di streptavidina necessarie per la cattura degli strand biotinilati della PCR.

La mix di Binding è stata così preparata:

Binding-Mix	Volume reagente per 1 reazione (μl)
H ₂ O	20
Binding buffer di sequenziamento	37
Biglie di streptavidina	3
Volume Totale	60

60 μl di mix sono state dispensate in ogni pozzetto ed a questo sono state aggiunte 20 μl di prodotto di PCR (campione/ controllo metilato/controllo non metilato/bianco)

La piastra è stata agitata su agitatore automatico per 15 minuti alla velocità di 1400 rpm.

3) Preparazione della piastra di sequenziamento

La mix usata per la piastra di sequenziamento è detta Annealing Mix ed è stata così preparata:

Annealing-Mix	Volume reagente per 1 reazione (μl)
Annealing buffer	38
Primer di sequenziamento	2
Volume Totale	40

40 μl di questa mix sono stati dispensati nella piastra di sequenziamento facendo attenzione a utilizzare i pozzetti corrispondenti a quelli caricati nella piastra di binding.

4) Immobilizzazione dei prodotti di PCR nella piastra di sequenziamento

Questa fase è stata eseguita mediante la **PyroMark Q96 Vacuum Workstation** che sfrutta il sistema di pompa a vuoto e un braccio con filtri alla base (vacuum tool). Questi vanno a pescare gli amplificati nella piastra di binding e dopo diversi passaggi di lavaggio degli amplificati nelle diverse posizioni della workstation avviene il loro rilascio nella piastra di sequenziamento.

La workstation è composta da 8 diverse posizioni (Fig. 18)



Fig 18: PyroMark Q96 Vacuum Workstation

La workstation è stata così preparata:

- Versare circa 180 ml di Etanolo 70%, SEQ denaturation solution, SEQ washing buffer e SEQ water rispettivamente nelle vaschette “Ethanol”, “Denaturation solution”, “Washing buffer” e “Water”.
- Posizionare la piastra di binding e la piastra di sequenziamento rispettivamente nelle posizioni “PCR plate” e “PSQ plate” indicate in figura.

La procedura prevede i seguenti step:

- Verificare che l’interruttore del vuoto del Worktable sia spento (OFF) ed accendere la pompa poi applicare il vuoto alla workstation posizionando l’interruttore su ON.
- Lavare i filtri del Tool immergendoli nella “Parking position water” per circa 20 secondi.
- Catturare le biglie introducendo il Tool delicatamente nella **pietra di binding**
- Assicurarsi che il liquido sia stato completamente aspirato da tutti i pozzetti e che tutte le biglie siano state immobilizzate sulla punta dei filtri.
- Spostare il Tool nella vaschetta con Etanolo 70% e far fluire la soluzione attraverso i filtri del tool per 5 secondi.
- Spostare il Tool nella vaschetta con **denaturation solution** e far fluire la soluzione attraverso i filtri del tool per 5 secondi.
- Spostare il Tool nella vaschetta con **washing buffer** e far fluire la soluzione attraverso i filtri del tool per 5 secondi.
- Sollevare il Tool e porlo per alcuni secondi in posizione verticale per permettere al liquido di essere completamente aspirato.
- Togliere il vuoto al Tool posizionando su OFF l’interruttore del Worktable.

- Trasferire il Tool nella piastra di sequenziamento e agitarlo delicatamente in modo da favorire il completo rilascio delle biglie nei pozzetti della piastra.

La piastra di sequenziamento così preparata è stata denaturata a 80°C per 2 minuti e poi caricata nel sequenziatore.

Nel frattempo è stata caricata la cartuccia con le quantità di enzima, mix di substrato e dNTPs indicati dopo la programmazione della corsa.

Analisi dei risultati

Alla fine della reazione è stata eseguita l'analisi dei risultati: l'analisi del pirosequenziamento è stata eseguita automaticamente dal software dedicato il quale ha attribuito ad ogni campione una percentuale. Dopo l'analisi i pozzetti mostravano un colore blu o giallo se l'analisi di quel campione poteva essere ritenuta valida, rossa se l'analisi doveva essere ripetuta perché considerata non affidabile. Un cut-off del 6% è stato utilizzato per l'arruolamento dei pazienti nello studio maya, al di sotto del quale i pazienti sono stati considerati non metilati.

3.2 Materiali e metodi studio PARERE

3.2.1 Disegno dello studio e partecipanti

Lo studio PARERE è uno studio prospettico multicentrico di fase II in cui i pazienti con mCRC RAS e BRAF wt su biopsia liquida sono randomizzati in un rapporto 1:1 per ricevere panitumumab seguito dopo progressione da regorafenib (braccio A) contro la sequenza inversa (braccio B). Attualmente lo studio è in fase di arruolamento (Fig.19).

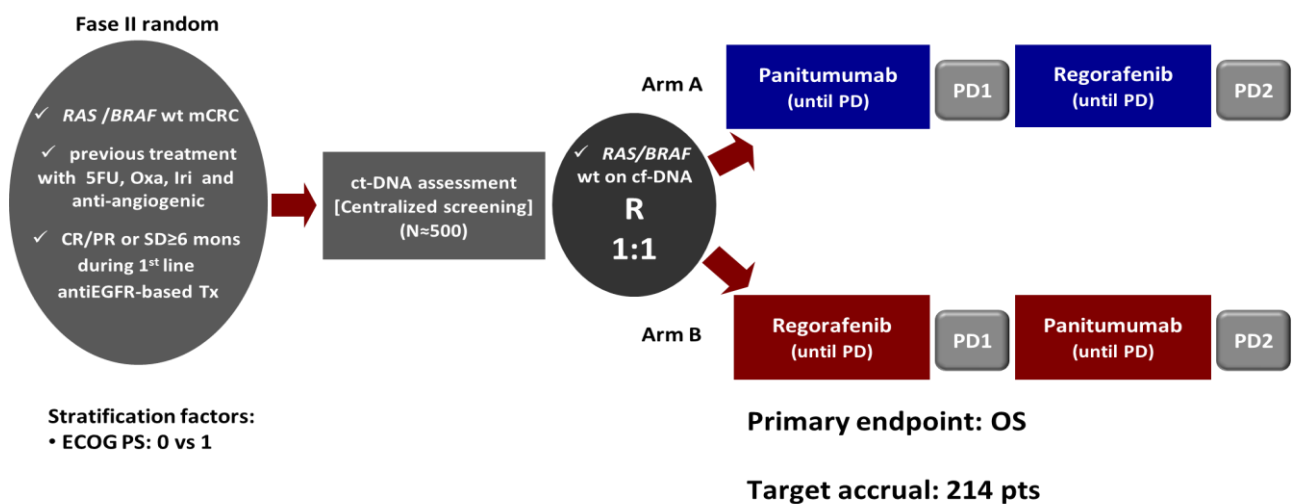


Fig 19: Disegno dello studio

I criteri di inclusione ed esclusione sono descritti nelle seguenti tabelle.

Tabella 4: Criteri di inclusione

➤ Età ≥ 18 anni
➤ Diagnosi istologicamente provata di CRC
➤ Almeno una 56uattr misurabile secondo RECIST1.1
➤ ECOG PS ≤ 1
➤ mCRC precedentemente trattato per malattia metastatica con 56uattro5656te56dine, oxaliplatino, 56uattro5656te e anticorpo monoclonale anti-angiogenico (bevacizumab o aflibercept) o non 56uattro5656te candidato a tale trattamento
➤ Stato wt di RAS (codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 dei geni KRAS e NRAS) e BRAF (mutazione V600E) del CRC primario o delle metastasi correlate

➤ Precedente terapia di prima linea contenente anti-EGFR che abbia prodotto almeno una risposta parziale o una malattia stabile ≥ 6 mesi
➤ Sono trascorsi almeno 4 mesi tra la fine della somministrazione di anti-EGFR di prima linea e lo screening
➤ Almeno una linea di terapia tra la fine della somministrazione di anti-EGFR di prima linea e lo screening
➤ Stato wt del ct-DNA di RAS (codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 dei geni KRAS e NRAS) e BRAF (mutazione V600E) allo screening.
➤ Aspettativa di vita di almeno 12 settimane.
➤ Adeguata funzionalità epatica, renale e del midollo osseo.

Tabella 5: Criteri di esclusione

➤ Precedente trattamento con regorafenib
➤ Evidenza di diatesi emorragica o coagulopatia
➤ Ipertensione non controllata e precedenti anamnestici di crisi ipertensiva o encefalopatia ipertensiva
➤ Malattia cardiovascolare clinicamente significativa, ad esempio accidenti cerebrovascolari (≤ 6 mesi), infarto del miocardio (≤ 6 mesi), angina instabile, insufficienza cardiaca congestizia di grado II o superiore della New York Heart Association (NYHA), aritmia cardiaca grave che richiede farmaci
➤ Malattia vascolare significativa entro 6 mesi dall'arruolamento nello studio
➤ Qualsiasi precedente tromboembolia venosa \geq NCI CTCAE Grado 4
➤ Anamnesi di fistola addominale, perforazione gastrointestinale, ascesso intra-addominale o emorragia gastrointestinale attiva nei 6 mesi precedenti il primo trattamento in studio.
➤ Altre neoplasie maligne coesistenti o diagnosticate negli ultimi 5 anni, ad eccezione del carcinoma basale e squamoso localizzato o del cancro cervicale in situ.
➤ Diagnosi di polmonite interstiziale o fibrosi polmonare

Lo stato di RAS e BRAF sul tessuto tumorale di ogni paziente è stato precedentemente valutato su pezzo.

Le biopsie liquide raccolte al momento dello screening sono analizzate centralmente presso la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano mediante il pannello NGS Ion Torrent™ OncoPrint™ Colon cf-DNA.

Lo studio prevede l'arruolamento di 214 pazienti. Ad oggi sono stati scrinati 119 pazienti e di questi 9 pazienti sono stati esclusi perché il materiale è risultato non adeguato all'analisi e 74 pazienti sono stati arruolati.

Il panitumumab viene somministrato alla dose di 6 mg/kg iv, giorno 1 ogni 2 settimane, e regorafenib viene somministrato alla dose di 160 mg/giorno per 3 settimane e 1 settimana di riposo ogni 28 giorni. Tutti i trattamenti sono continuati fino a progressione della malattia, tossicità inaccettabile o rifiuto del paziente.

3.2.2 End point dello studio

L'obiettivo primario di questo studio è quello di confrontare l'efficacia in termini di sopravvivenza globale (OS) di panitumumab seguito dopo la progressione della malattia da regorafenib (braccio A) rispetto alla sequenza inversa (braccio B) in pazienti mCRC chemorefrattari con precedente beneficio dal trattamento di prima linea basato su anti-EGFR e che presentano RAS/BRAF wt su ct-DNA al momento dell'ingresso nello studio.

Gli obiettivi secondari di questo studio sono di valutare i due trattamenti proposti in termini di:

- Durata della sopravvivenza libera da progressione durante la prima linea di trattamento dello studio (1st- PFS);
- Durata della sopravvivenza libera da progressione durante la seconda linea di trattamento dello studio (2nd- PFS);
- Durata del Tempo al fallimento della strategia (TFS);
- Tasso di risposta obiettiva (ORR) durante panitumumab e regorafenib;
- Tasso di tossicità globale;
- Tasso di tossicità G3/4.

Sono previste inoltre analisi traslazionali esplorative dei biomarcatori nel tentativo di aumentare la comprensione del meccanismo di resistenza acquisita alla terapia anti-EGFR. A tal fine è previsto un confronto tra l'analisi del ctDNA di campioni raccolti durante il trattamento con Panitumumab

rechallenge rispetto all'analisi del ctDNA di campioni raccolti durante il trattamento con Regorafenib.

3.2.3 Raccolta dei campioni

I centri attivi nello studio ad oggi sono 44. I prelievi di sangue periferico viene eseguita in provette standard contenente EDTA, per i pazienti afferenti direttamente presso l'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano mentre per i pazienti provenienti da centri esterni il sangue viene raccolto in provette streck ed inviate al centro di riferimento. Il sangue raccolto in provette contenente EDTA viene plasmato entro 2 ore dal prelievo. Il sangue raccolto in provette streck viene plasmato nel momento in cui viene consegnato al centro, in genere il giorno dopo l'esecuzione del prelievo.

Il plasma viene isolato mediante una centrifugazione a bassa velocità a 1600g per 10 minuti a 4°C e conservato, là dove non viene estratto immediatamente, a -80°C, temperatura che garantisce una maggiore stabilità del cfDNA.

Il cfDNA viene estratto dal plasma mediante l'estrattore automatico Maxwell RSC Instrument e il kit Maxwell RSC ccfDNA plasma kit. Il kit prevede l'utilizzo di 1,5 ml di plasma di partenza.

3.2.4 Preparazione delle librerie NGS

La fase di preparazione delle librerie è stata eseguita con il pannello Oncomine™ Colon cfDNA che utilizza la chimica Oncomine TagSequencing. Questa chimica prevede l'utilizzo di barcodes molecolari, definiti anche unique molecular identifiers (UMI), associato a pipelines bioinformatiche dedicate (Figura 20).

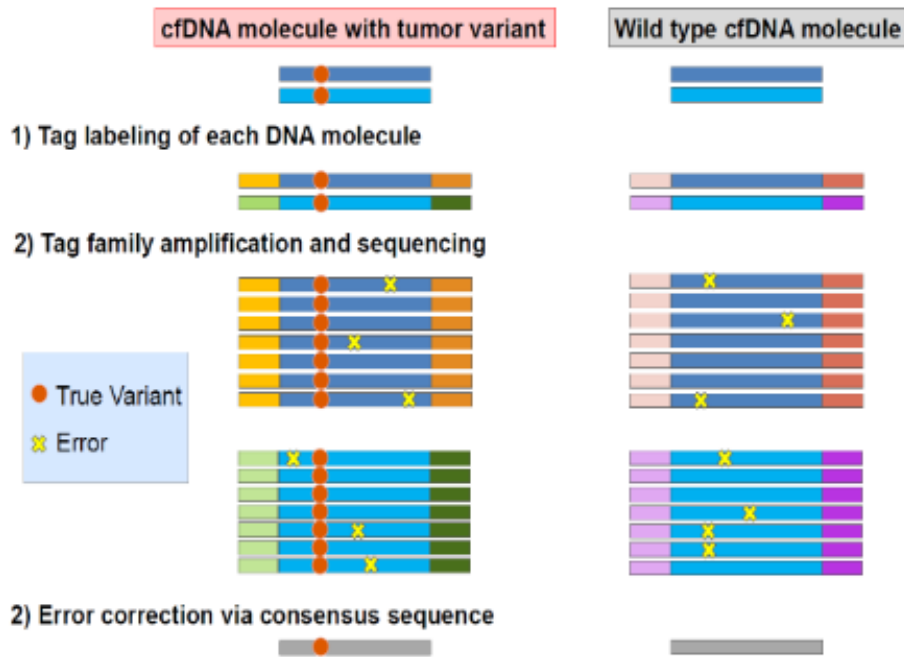


Fig.20: Chimica Oncomine Colon cfDNA: ad ogni molecola di cfDNA viene assegnato un tag molecolare univoco attraverso una prima reazione di PCR; successivamente i frammenti di libreria contrassegnati vengono amplificati in un secondo ciclo di PCR per produrre “famiglie” di librerie. Una mutazione viene chiamata quando almeno 2 famiglie molecolari presentano la stessa variante.

Questo consente di ridurre in maniera significativa il tasso di falsi positivi nell’analisi del cfDNA e consente di raggiungere livelli di rilevamento estremamente bassi e ad alta specificità, pari allo 0.05-0.1% (Figura 21).

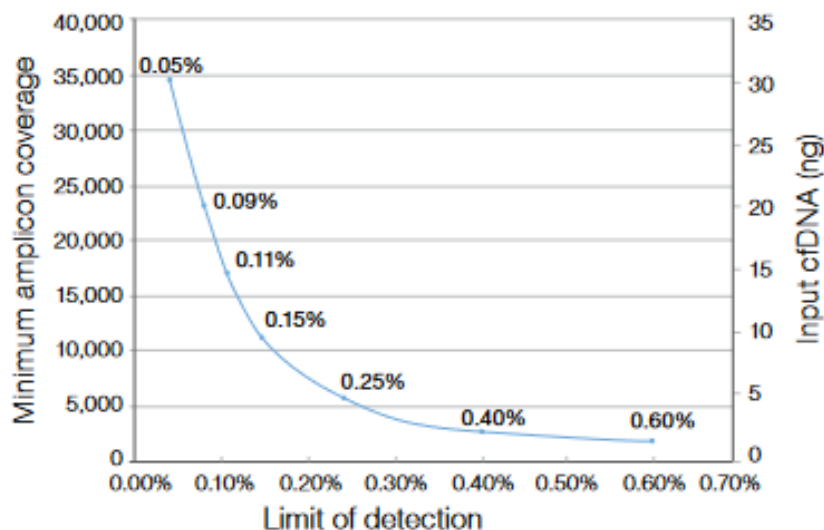


Fig 21: LOD del pannello oncomine colon cf assay

Questo pannello consente l’amplificazione di oltre 250 regioni hotspot di 14 geni che sono frequentemente mutati nel tumore del colon (figura 22).

Oncomine Colon cfDNA Assay		
<i>AKT1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>NRAS</i>
<i>APC</i>	<i>FBXW7</i>	<i>PIK3CA</i>
<i>BRAF</i>	<i>GNAS</i>	<i>SMAD4</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>
<i>EGFR</i>	<i>MAP2K1</i>	

Fig 22: geni contenenti nel pannello Oncomine Colon cfDNA assay

Il pannello Oncomine™ Colon cfDNA consente l'amplificazione di quantità anche limitate di DNA. Il range di cfDNA che si può utilizzare è 1-50 ng di cfDNA in 13 µl ma per raggiungere la sensibilità dello 0,1% è auspicabile utilizzare almeno 20 ng di cfDNA. Tuttavia partendo, a volte, da quantità minime di cfDNA non sempre si riesce ad ottenere 20 ng totali. La concentrazione del cfDNA viene misurata mediante "Qubit® 2.0 Fluorometer" utilizzando il kit "High sensitivity assay kit Qubit® dsDNA" il quale è progettato per quantificare concentrazioni iniziali del campione da 10 pg / µL a 100 ng / µL.

Protocollo operativo per Oncomine colon cfDNA

Amplificazione target da cfDNA

Per ogni campione la mix di amplificazione è così composta:

Reagenti	Volume
cfDNA, 1-50ng	X µl
acqua nuclease-free	13-X µl
cfDNA panel	2 µl
cfDNA PCR master mix	15 µl
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 45µl (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 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 24 µl di TE, vortexare ed incubare 5 minuti nella piastra magnetica
- Trasferire 23 µl in un nuovo pozzetto

Amplificazione degli ampliconi con i primer tag

Per ogni paziente aggiungere i seguenti reagenti 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 µl (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 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 30 µl di TE, vortexare ed incubare 5 minuti nella piastra magnetica
- Posizionare la piastra sul magnete e incubare per 2 min
- Trasferire 28 µl 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.

La concentrazione delle librerie così ottenute viene valutata mediante "Qubit® 2.0 Fluorometer" utilizzando il kit "High sensitivity assay kit Qubit® dsDNA".

3.2.5 Sequenziamento NGS

Ogni libreria viene diluita in H₂O in maniera tale da ottenere una concentrazione di ~50pM. Le librerie sono successivamente combinate per poter essere sequenziate. Mediante l'Ion Chef System si procede in maniera automatica alla preparazione del template e successivamente caricamento di questo nell'ion chip.

Ogni chip in media contiene 6 campioni su un Ion 530 chip. Questo pannello necessita di una copertura di lettura mediana >25000 ed una copertura molecolare mediana >2500, per poter rilevare una variante con un MAF dello 0,1%.

Analisi dei dati ngs

I dati di sequenziamento generati sotto forma di BAM file sono stati caricati sul software Ion reporter 5.18 ed analizzati mediante il workflow OncoPrint Colon Liquid Biopsy v.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, Compex). 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.

4. *Risultati*

4.1 Risultati dello studio MAYA

L'arruolamento dei pazienti nello studio è avvenuto tra marzo 2019 e novembre 2020. L'analisi molecolare è stata eseguita su 703 campioni tumorali e di questi 13 casi sono risultati non adeguati all'analisi e quindi esclusi. Nel laboratorio di Patologia Molecolare presso la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano è pervenuto materiale tumorale fissato in FFPE su cui è stata fatta in primis l'analisi dei microsatelliti. I 213 pazienti che presentavano una stabilità microsatellitica sono stati poi sottoposti ad analisi IHC e pyrosequencing per l'analisi del profilo di silenziamento del gene MGMT. Per questo progetto io mi sono occupata dell'analisi dei microsatelliti e del pyrosequencing di questi casi.

Di questi 213 pazienti, 28 sono risultati non analizzabili mentre dei casi analizzati 135 pazienti risultavano avere un silenziamento del gene MGMT con una media del 23% di metilazione. Il cut-off utilizzato per distinguere il paziente metilato dal paziente non metilato è del 6% al di sotto del quale il paziente risultava escluso dallo studio. Dal confronto fra analisi IHC e pyrosequencing si evincono ben 67 discordanze di cui 62 notate nei pazienti che al pyrosequencing risultavano non metilati e 5 nei pazienti che risultavano metilati al pyrosequencing (tabella 6) [91].

Tabella 6: pz scrinati per il gene MGMT con Immunoistochimica e pyrosequencing

N. pazienti	Cellularità	IHC del gene MGMT	risultato pyrosequencing	% di metilazione
pz 1	30%	positiva	metilato	12%
pz 2	80%	negativa	non metilato	1%
pz 3	30%	negativa	metilato	4%
pz 4	60%	positiva	non metilato	3%
pz 5	70%	positiva	non metilato	3%
pz 6	60%	positiva	metilato	17%
pz 7	70%	positiva	non metilato	1%
pz 8	80%	positiva	non metilato	3%
pz 9	80%	negativa	metilato	31%
pz 10	80%	negativa	metilato	46%
pz 11	80%	negativa	metilato	8%
pz 12	90%	negativa	metilato	39%
pz 13	70%	negativa	metilato	33%
pz 14	20%	negativa	metilato	11%
pz 15	70%	positiva	non metilato	7%
pz 16	20%	positiva	non metilato	3%
pz 17	20%	negativa	metilato	36%

pz 18	30%	negativa	non metilato	2%
pz 19	70%	negativa	non metilato	2%
pz 20	30%	positiva	metilato	28%
pz 21	60%	positiva	metilato	49%
pz 22	80%	negativa	non metilato	5%
pz 23	70%	negativa	metilato	48%
pz 24	20%	negativa	non metilato	2%
pz 25	70%	negativa	metilato	6%
pz 26	40%	negativa	metilato	26%
pz 27	60%	negativa	metilato	38%
pz 28	40%	negativa	metilato	10%
pz 29	54%	negativa	metilato	54%
pz 30	60%	negativa	metilato	47%
pz 31	60%	negativa	metilato	8
pz 32	80%	negativa	metilato	6%
pz 33	10%	negativa	metilato	27%
pz 34	10%	negativa	metilato	8%
pz 35	60%	positiva	non metilato	2%
pz 36	70%	positiva	non metilato	3%
pz 37	50%	positiva	non metilato	3%
pz 38	70%	negativa	metilato	34%
pz 39	60%	negativa	metilato	34%
pz 40	20%	negativa	metilato	43%
pz 41	20%	negativa	metilato	31%
pz 42	60%	negativa	non metilato	4%
pz 43	10%	positiva	non metilato	5%
pz 44	90%	negativa	metilato	6%
pz 45	80%	negativa	metilato	55%
pz 46	60%	negativa	metilato	64%
pz 47	20%	negativa	metilato	19%
pz 48	50%	negativa	metilato	35%
pz 49	60%	negativa	non metilato	2%
pz 50	40%	negativa	non metilato	2%
pz 51	30%	negativa	metilato	11%
pz 52	50%	negativa	metilato	36%
pz 53	70%	negativa	metilato	7%
pz 54	70%	negativa	non metilato	2%
pz 55	30%	positiva	non metilato	3%
pz 56	50%	negativa	metilato	30%
pz 57	30%	negativa	metilato	20%
pz 58	80%	negativa	metilato	34%
pz 59	10%	negativa	non metilato	3%
pz 60	70%	negativa	non metilato	3%
pz 61	30%	negativa	non metilato	2%
pz 62	60%	negativa	metilato	48%
pz 63	60%	negativa	non metilato	5%

pz 64	70%	negativa	metilato	42%
pz 65	50%	negativa	metilato	39%
pz 66	60%	negativa	metilato	6%
pz 67	60%	negativa	metilato	34%
pz 68	30%	negativa	metilato	8%
pz 69	30%	negativa	non metilato	2%
pz 70	70%	negativa	metilato	47%
pz 71	70%	negativa	metilato	8%
pz 72	50%	negativa	metilato	39%
pz 73	50%	negativa	metilato	33%
pz 74	70%	negativa	metilato	47%
pz 75	70%	negativa	metilato	25%
pz 76	50%	negativa	metilato	33%
pz 77	50%	negativa	non metilato	3%
pz 78	50%	negativa	metilato	49%
pz 79	50%	negativa	metilato	58%
pz 80	80%	negativa	metilato	69%
pz 81	70%	negativa	metilato	6%
pz 82	70%	negativa	metilato	55%
pz 83	50%	negativa	non metilato	3%
pz 84	60%	negativa	metilato	45%
pz 85	50%	positiva	metilato	36%
pz 86	10%	negativa	non metilato	5%
pz 87	60%	negativa	non metilato	2%
pz 88	30%	negativa	non metilato	4%
pz 89	60%	negativa	metilato	36%
pz 90	20%	negativa	metilato	14%
pz 91	30%	negativa	metilato	18%
pz 92	40%	negativa	non metilato	1%
pz 93	50%	negativa	metilato	8%
pz 94	40%	negativa	metilato	17%
pz 95	70%	negativa	non metilato	3%
pz 96	60%	negativa	metilato	45%
pz 97	60%	negativa	non metilato	1%
pz 98	40%	negativa	metilato	8%
pz 99	40%	negativa	non metilato	2%
pz 100	70%	negativa	metilato	50%
pz 101	70%	negativa	metilato	34%
pz 102	50%	negativa	non metilato	2%
pz 103	30%	negativa	metilato	30%
pz 104	40%	negativa	metilato	47%
pz 105	30%	negativa	metilato	14%
pz 106	80%	negativa	metilato	16%
pz 107	80%	negativa	metilato	51%
pz 108	40%	negativa	metilato	37%
pz 109	70%	negativa	non metilato	3%

pz 110	90%	negativa	non metilato	3%
pz 111	80%	negativa	metilato	33%
pz 112	70%	negativa	non metilato	4%
pz 113	30%	negativa	non metilato	3%
pz 114	80%	negativa	metilato	37%
pz 115	30%	negativa	metilato	22%
pz 116	70%	negativa	metilato	50%
pz 117	70%	negativa	non metilato	4%
pz 118	70%	negativa	metilato	48%
pz 119	20%	negativa	metilato	13%
pz 120	40%	negativa	metilato	24%
pz 121	70%	negativa	non metilato	4%
pz 122	80%	negativa	metilato	34%
pz 123	60%	negativa	metilato	45%
pz 124	70%	negativa	metilato	31%
pz 125	60%	negativa	metilato	25%
pz 126	60%	negativa	metilato	24%
pz 127	70%	negativa	non metilato	1%
pz 128	60%	negativa	non metilato	4%
pz 129	20%	negativa	metilato	10%
pz 130	80%	negativa	metilato	22%
pz 131	70%	negativa	metilato	20%
pz 132	90%	negativa	non metilato	2%
pz 133	60%	negativa	metilato	26%
pz 134	60%	negativa	metilato	51%
pz 135	50%	negativa	non metilato	4%
pz 136	30%	negativa	metilato	8%
pz 137	30%	negativa	non metilato	2%
pz 138	70%	negativa	non metilato	3%
pz 139	80%	negativa	non metilato	2%
pz 140	70%	negativa	non metilato	3%
pz 141	20%	negativa	metilato	6%
pz 142	70%	negativa	metilato	44%
pz 143	10%	negativa	non metilato	4%
pz 144	60%	negativa	metilato	23%
pz 145	5%	negativa	non metilato	3%
pz 146	70%	negativa	non metilato	2%
pz 147	50%	negativa	non metilato	5%
pz 148	20%	negativa	non metilato	1%
pz 149	20%	negativa	metilato	6%
pz 150	20%	negativa	metilato	35%
pz 151	70%	negativa	non metilato	5%
pz 152	70%	negativa	non metilato	2%
pz 153	20%	negativa	non metilato	4%
pz 154	20%	negativa	non metilato	2%
pz 155	90%	negativa	non metilato	1%

pz 156	60%	negativa	metilato	30%
pz 157	70%	negativa	non metilato	4%
pz 158	70%	negativa	metilato	50%
pz 159	50%	negativa	metilato	16%
pz 160	70%	negativa	metilato	53%
pz 161	70%	negativa	metilato	41%
pz 162	50%	negativa	non metilato	1%
pz 163	40%	negativa	metilato	26%
pz 164	80%	negativa	non metilato	5%
pz 165	70%	negativa	non metilato	5%
pz 166	70%	negativa	metilato	36%
pz 167	80%	negativa	metilato	19%
pz 168	60%	negativa	metilato	42%
pz 169	30%	negativa	metilato	12%
pz 170	60%	negativa	metilato	35%
pz 171	80%	negativa	metilato	34%
pz 172	70%	negativa	metilato	57%
pz 173	20%	negativa	non metilato	4%
pz 174	80%	negativa	non metilato	4%
pz 175	40%	negativa	metilato	8%
pz 176	50%	negativa	metilato	46%
pz 177	40%	negativa	metilato	10%
pz 178	80%	negativa	metilato	30%
pz 179	70%	negativa	metilato	10%
pz 180	70%	negativa	metilato	10%
pz 181	40%	negativa	metilato	22%
pz 182	70%	negativa	metilato	9%
pz 183	60%	negativa	metilato	31%
pz 184	60%	negativa	metilato	26%
pz 185	40%	negativa	metilato	39%
pz 186	60%	negativa	metilato	15%
pz 187	80%	negativa	non metilato	4%
pz 188	20%	negativa	non metilato	3%
pz 189	50%	negativa	non metilato	2%
pz 190	30%	negativa	metilato	26%
pz 191	70%	negativa	metilato	34%
pz 192	70%	negativa	metilato	5%
pz 193	60%	negativa	metilato	7%
pz 194	50%	negativa	metilato	31%
pz 195	60%	negativa	metilato	10%
pz 196	50%	negativa	metilato	10%
pz 197	80%	negativa	metilato	55%
pz 198	50%	negativa	metilato	8%
pz 199	10%	negativa	non metilato	1%
pz 200	30%	negativa	metilato	37%
pz 201	70%	negativa	metilato	29%

pz 202	30%	negativa	metilato	6%
pz 203	80%	negativa	metilato	29%
pz 204	70%	negativa	non metilato	3%
pz 205	50%	negativa	non metilato	2%
pz 206	60%	negativa	non metilato	1%
pz 207	40%	negativa	non metilato	4%
pz 208	70%	negativa	metilato	25%
pz 209	50%	negativa	metilato	52%
pz 210	50%	negativa	metilato	6%
pz 211	50%	negativa	metilato	16%
pz 212	40%	negativa	metilato	38%
pz 213	10%	negativa	metilato	12%

Di questi 213 pazienti 135 sono stati arruolati iniziando la prima fase di trattamento con temozolomide. Tra i 135 arruolati solo 33 pazienti hanno iniziato la seconda fase di terapia che prevedeva la terapia combinata di temozolomide, bassi dosaggi di ipilimumab e nivolumab.

102 pazienti (76%) a causa di morte o progressione della malattia sono stati esclusi dalla seconda fase di trattamento.

Nella seconda fase di trattamento, alla data di interruzione del raccoglimento dei dati, 30 settembre 2021, 11 pazienti erano ancora in studio mentre 22 pazienti hanno interrotto il trattamento a causa di progressione della malattia (n=19) e morte (n=3 di cui 1 decesso dovuta a progressione clinica e 2 decessi dovuta a COVID-19).

La tabella seguente mostra le caratteristiche basali dei pazienti e della malattia nella popolazione complessiva dello studio, nei pazienti che sono stati esclusi dallo studio per PD o morte dopo il primo trattamento con TMZ o nei 33 pazienti che hanno iniziato la seconda fase di trattamento. Nel complesso, c'era una predominanza di tumori mutati RAS (72%) e solo il 2% di tumori BRAF mutati, coerentemente con il profilo di ipermetilazione MGMT.

I pazienti hanno ricevuto ≥ 3 linee di trattamento precedenti nel 55% dei casi[91].

Tabella 7: caratteristiche dei pazienti alla baseline, dopo la prima fase di trattamento e pazienti nella seconda fase di trattamento [91].

	Overall Study Population N = 135 (%)	Patients with PD or death after the First Treatment Phase N = 102 (%)	Patients in Second Treatment Phase N = 33 (%)	P value*
Median age (years, IQR)	63 (55-71)	65 (55-71)	58 (53-65)	0.020

Gender				
Male	72 (53%)	55 (53%)	17 (52%)	0.843
Female	63 (47%)	47 (46%)	16 (48%)	
ECOG performance status				
0	86 (64%)	64 (63%)	22 (67%)	0.835
1	49 (36%)	38 (37%)	11 (33%)	
Primary tumor resected				
Yes	119 (88%)	88 (86%)	31 (94%)	0.356
No	16 (12%)	14 (14%)	2 (6%)	
Synchronous metastases				
Yes	77 (57%)	61 (60%)	16 (48%)	0.313
No	58 (43%)	41 (40%)	17 (52%)	
Number of metastatic sites				
1	20 (15%)	13 (13%)	7 (21%)	0.198
2	57 (42%)	41 (40%)	16 (48%)	
≥3	58 (43%)	48 (47%)	10 (31%)	
Primary tumor location				
Right colon	40 (30%)	25 (24%)	15 (45%)	0.011
Left colon	72 (53%)	57 (56%)	15 (46%)	
Rectum	23 (17%)	20 (20%)	3 (9%)	
RAS status				
Wild-type	38 (28%)	30 (29%)	8 (24%)	0.660
Mutated	97 (72%)	72 (71%)	25 (76%)	
BRAF status				
Wild-type	127 (98%)	95 (98%)	32 (100%)	1.000
Mutated	2 (2%)	2 (2%)	0	
Not assessed	6	5	1	
Number of prior lines				
1	16 (12%)	14 (14%)	2 (6%)	0.146
2	44 (33%)	29 (28%)	15 (46%)	
≥3	75 (55%)	59 (58%)	16 (48%)	
Previous oxaliplatin				
Yes	129 (96%)	97 (95%)	32 (97%)	1.000
No	6 (4%)	5 (5%)	1 (3%)	
Previous irinotecan				
Yes	127 (94%)	95 (91%)	32 (97%)	0.679
No	8 (6%)	7 (9%)	1 (3%)	
Previous anti-VEGF agent				
Yes	117 (87%)	89 (87%)	28 (85%)	0.770
No	18 (13%)	13 (13%)	5 (15%)	
Previous anti-EGFR agent				
Yes	38 (28%)	30 (29%)	8 (24%)	0.660
No	97 (72%)	72 (71%)	25 (76%)	

Confrontando le varie caratteristiche dei pazienti (sesso, presenza e caratteristiche delle metastasi, trattamenti precedenti, localizzazione del tumore primitivo, etc.), con o senza beneficio clinico, dopo il primo trattamento con TMZ, non sono state osservate differenze statisticamente significative, ad eccezione dei pazienti con una fascia di età media di 58 anni. Nei pazienti che hanno iniziato la seconda fase di trattamento le uniche differenze significative sono state osservate in pazienti con localizzazione del tumore primario sul lato destro (45% versus 24%).

Tra i pazienti durante la seconda fase di trattamento facendo un confronto tra i pazienti con PFS>8 mesi e PFS < 8 mesi non sono state osservate differenze statisticamente significative (tabella 8) [91].

Tabella 8:caratteristiche dei pazienti al secondo stadio di trattamento in base allo stato di PFS a 8 mesi.

	Patients with PFS<8 months N = 21 (%)	Patients with FS>8 months N = 12 (%)	P value*
Median age (years, IQR)	58 (53.5-66.5)	59 (50-62.5)	0.561
Gender			
Male	11 (52%)	6 (50%)	1.000
Female	10 (48%)	6 (50%)	
ECOG performance status			
0	13 (62%)	9 (75%)	0.703
1	8 (38%)	3 (25%)	
Primary tumor resected			
Yes	20 (95%)	11 (92%)	1.000
No	1 (5%)	1 (8%)	
Synchronous metastases			
Yes	10 (48%)	6 (50%)	1.000
No	11 (52%)	6 (50%)	
Number of metastatic sites			
1	5 (24%)	2 (17%)	0.692
2	9 (43%)	7 (58%)	
≥3	7 (33%)	3 (25%)	
Primary tumor location			
Right colon	8 (38%)	7 (58%)	0.292
Left colon	10 (48%)	5 (42%)	
Rectum	3 (14%)	0	
RAS status			
Wild-type	3 (14%)	5 (42%)	0.108
Mutated	18 (86%)	7 (58%)	
BRAF status			
Wild-type	20 (100%)	12 (100%)	NA
Mutated	0	0	
Not assessed	1	0	
Number of prior lines			
1	2 (10%)	0	0.142
2	7 (33%)	8 (67%)	
≥3	12 (57%)	4 (33%)	
Previous oxaliplatin			
Yes	21 (100%)	11 (92%)	0.364
No	0	1 (8%)	
Previous irinotecan			
Yes	20 (95%)	12 (100%)	1.000
No	1 (5%)	0	
Previous anti-VEGF agent			
Yes	19 (90%)	9 (75%)	0.328
No	2 (10%)	3 (25%)	

Previous anti-EGFR agent			
Yes	3 (14%)	5 (42%)	0.108
No	18 (86%)	7 (58%)	

Considerando i pazienti nella seconda parte del trattamento lo studio ha raggiunto il suo end point primario con 12 su 33 pazienti che hanno ottenuto una PFS > 8 mesi, con un tasso di PFS a 8 mesi del 36%. La PFS mediana e la OS erano 7,0 mesi e 18,4 mesi, rispettivamente (Fig. 23); la PFS a 12 e 18 mesi era del 24% e 20%, rispettivamente.

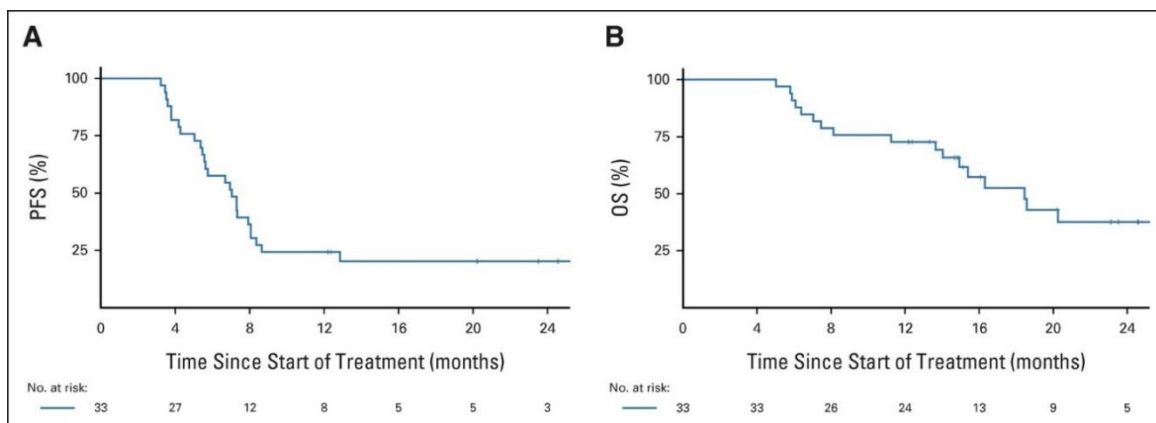


Fig.23: curve di Kaplan-Meier per (A) PFS e (B) OS dei pazienti alla seconda linea di trattamento. OS, sopravvivenza complessiva; PFS, sopravvivenza libera da progressione[91].

L'ORR complessiva, cioè considerando sia la prima fase di trattamento che la seconda, è risultata del 45%, con 15 PR. In dettaglio, otto PR sono state osservate alla prima valutazione della malattia dopo la prima parte del trattamento, mentre le restanti sette PR si sono verificate durante la seconda parte del trattamento, con cinque di esse ritardate dopo il punto temporale di 8 mesi (Fig 24B). In 26 casi su 33 (79%), è stata osservata una contrazione tumorale (Fig 24). L'ORR ottenuto esclusivamente nella seconda parte del trattamento è stato del 18%. La DoR mediana è stata di 4,8 mesi.

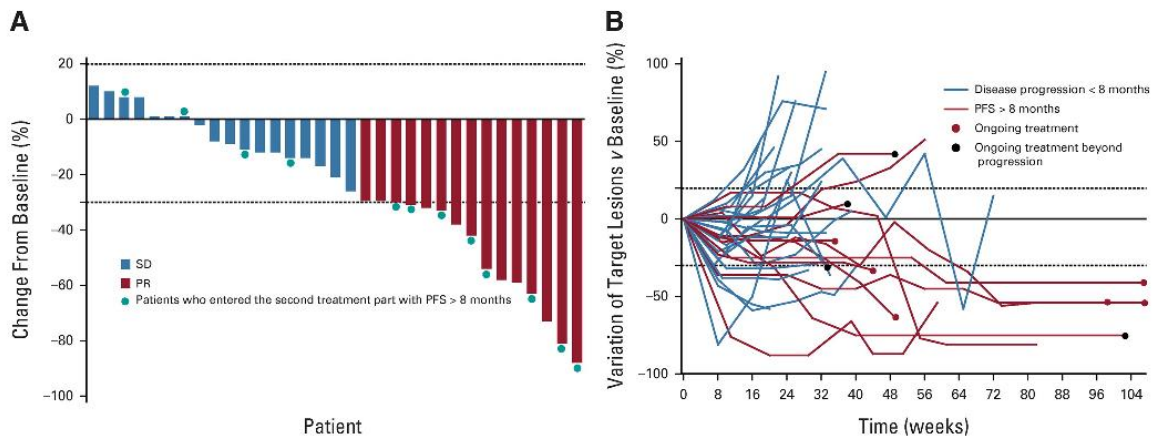


Fig.24 (A) grafico a cascata con la migliore risposta tumorale raggiunta da ogni paziente; (B) grafico a ragnò con la dinamica della risposta terapeutica [91].

Per quanto riguarda la sicurezza della terapia si è valutato la frequenza ed il grado degli eventi avversi osservati durante il primo e poi il secondo trattamento. In totale si è osservata una frequenza di eventi avversi (AE) del 53% ma solo per un 3% questi hanno raggiunto una severità ≥ 3 secondo le linee guida specifiche del protocollo per cui si può definire gestibile il quadro totale delle reazioni avverse.

Tra gli eventi avversi si sono osservati: EA immune-correlati (rash cutaneo, prurito, colite, artrite, polmonite interstiziale) e endocrinopatie legate al sistema immunitario (ipotiroidismo, ipertiroidismo, ipofisite, e insufficienza surrenale). Non sono stati osservati AE significativi di tipo cardiologico, neurologico o di altro tipo.

Valutazione del carico mutazionale del tumore

Per quattro pazienti con PFS individuale >8 mesi è stato inoltre eseguita una profilazione genomica con FoundationOne® CDx su biopsia tessutale prima del trattamento e dopo il trattamento. Questi pazienti, in cui si osserva un mantenimento dello stato di metilazione del gene MGMT confermato con IHC e pyrosequencing, mostrano un aumento significativo del carico mutazionale del tumour (Fig. 25).

Patient number	TMB archival tumour tissue Muts/Mb	TMB on-treatment tumour rebiopsy Muts/Mb
MAYA0022	1.8	11.0
MAYA0127	5.0	15.0

MAYA0160	4·0	47·9
MAYA0713	3·4	161·0

Fig. 25: TMB (tumour mutational burden) di 76uattro pazienti prima e dopo il trattamento. Abbreviazioni: Muts, mutations; Mb, Megabase[91].

4.2 Risultati dello studio PARERE

Lo studio PARERE è ad oggi in fase di arruolamento. Le analisi molecolari su biopsia liquida previste per lo screening avvengono nel laboratorio di Patologia Molecolare presso la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano. Ad oggi presso il nostro laboratorio sono pervenute biopsie liquide di 122 pazienti di cui 9 (7%) sono risultati non valutabili per inadeguatezza del campione (plasma o cfDNA) o per basso coverage nei geni di interesse.

Questi pazienti sono stati esclusi dallo studio.

Dei 113 pazienti analizzati 74 (61%) sono risultati elegibili dal punto di vista molecolare mentre i restanti 39 (32%) sono stati esclusi per mutazioni nei geni di interesse (Fig. 26).

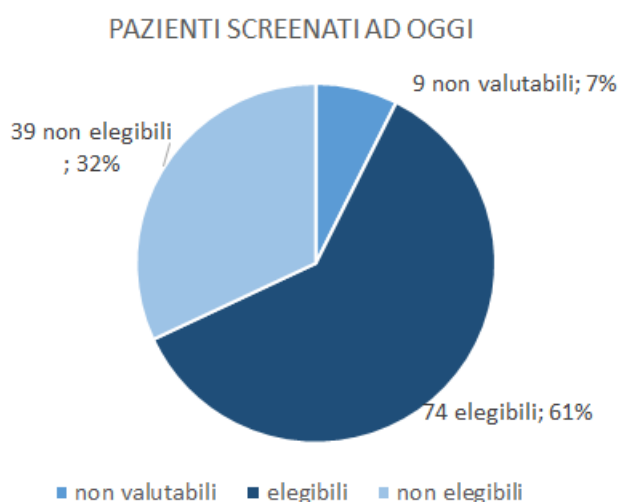


Fig 26: frequenza pazienti non valutabili, non elegibili ed elegibili in seguito ad analisi molecolare

L'esito dell'analisi molecolare eseguita sui 122 pazienti è descritta nella tabella seguente:

Tabella 9: risultati screening ad aprile 2022

paziente	LOD %	GENE	EXON	HGVSp	HGVSc	FREQUENZA
pz 1	0.4507 – 0.5608	TP53	5	p.R175H	c.524G>A	44%
pz 2	0.4727 – 0.5508	TP53	7	p.R248Q	c.743G>A	7%
		APC	15	p.I1307K	c.3920T>A	1%
		KRAS	2	p.G12A	c.35G>C	0,32%
pz 3	0.0590 – 0.0592	FBXW7	10	p.R479Q	c.1436G>A	0,23%
		AKT1	3	p.E17K	c.49G>A	0,23%

		TP53	5	p.V173A	c.518T>C	0,28
pz 4	0.2893 – 0.3589	PIK3CA	20	p.M1043V	c.3127°>G	0,20%
pz 5	0.1134 – 0.1339	APC	15	p.E1306*	c.3916G>T	24%
		KRAS	2	p.G12D	c.35G>A	2,40%
		NRAS	2	p.G13R	c.37G>C	0,96%
		ERBB2	22	p.R896H	c.2687G>A	0,20%
pz 6	0.0580 – 0.0584	TP53	7	p.R248Q	c.743G>A	0,81
pz 7	0.2578 – 0.2903	NRAS	3	p.Q61L	c.182°>T	5,60%
		APC	15	p.R876ter	c.2626C>T	69,00%
		KRAS	2	p.G12V	c.35G>T	2,28%
		MAP2K1	2	p.K57N	c.171G>T	1,50%
pz 8	0.1182 – 0.1430	KRAS	3	p.Q61H	c.183°>C	0,28%
		PIK3CA	9	p.E545K	c.1633G>A	0,11%
pz 9	0.0590 – 0.0592	TP53	5	p.R175H	c.524G>A	2,73%
pz 10	0.0590 – 0.0592	TP53	8	p.C275Y	c.824G>A	0,01
		FBXW7	11	p.S582L	c.1745C>T	0,01%
pz 11	0.3292 – 0.3911	TP53	8	p.R282W	c.844C>T	8%
pz 12	0.0590 – 0.0592	TP53	8	p.R282W	c.844C>T	0,49%
		APC	15	p.Q1228*	c.3682C>T	0,36%
pz 13	0.0590 – 0.0593	wt				
pz 14	0.2207 – 0.2419	ERBB2	20	p.V777L	c.2329G>T	19,00%
		KRAS	2	p.G12C	c.34G>T	0,47%
pz 15	0.0585 – 0.0590	KRAS	2	p.G13D	c.38G>A	0,26%
		KRAS	2	p.G12A	c.35G>C	0,28%
		TP53	7	p.C238Y	c.713G>A	1,71%
pz 16	0.0593 – 0.0593	TP53	8	p.R273C	c.817C>T	0,10%
		SMAD4	12	p.G508WfsTer19	c.1521_1522insT	0,07%
pz 17	0.3772 – 0.4437	TP53	6	p.Pro190LeufsTer57	c.569del	8,00%
pz 18	0.0581 – 0.0583	TP53	7	p.E258K	c.772G>A	2,63%
		MAP2K1	2	p.K57T	c.170°>C	0,47%
		KRAS	3	p.Q61H	c.183°>C	0,36%
pz 19	0.2327 – 0.2613	FBXW7	10	p.R349Q	c.1436G>A	1,13%
		APC	15	p.Q1294*	c.3880C>T	1,21
pz 20	0.0580 – 0.0584	wt				
pz 21	0.3294 – 0.3872	PIK3CA	9	p.E545K	c.1633G>A	1,23%
		APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delA AAGA	0,71%
		EGFR	12	p.R451C	c.1351C>T	0,56%
		BRAF	15	p.D594G	c.1781°>G	0,23%
		TP53	8	p.P278L	c.833C>T	0,29%
pz 22	0.0592 – 0.0593	APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delA AAGA	6,13%
pz 23						
pz 24	1.2608 – 1.5108	non valutabile				

pz 25	0.0591 – 0.0593	wt				
pz 26	0.0593 – 0.0863	TP53	5	p.P151S	c.451C>T	0,73%
		KRAS	3	p.G60V	c.179G>T	0,90%
pz 27	0.0987 – 0.1951	wt				
pz 28	0.0589 – 0.0591	wt				
pz 29	0.0593 – 0.0593	wt				
pz 30	0.0582 – 0.0584	PIK3CA	9	p.E545K	c.1633G>A	3%
		TP53	5	p.R175H	c.524G>A	0,34%
pz 31	0.4493 – 0.5036	TP53	6	p.R213*	c.637C>T	0,71%
pz 32	0.3488 – 0.3944	APC	15	p.R1450*	c.4348C>T	9,70%
		TP53	6	p.R213*	c.637C>T	10%
pz 33	2.0096 – 2.4789	non valutabile				
pz 34	0.0593 – 0.0806	APC	15	p.S1356*	c.4067C>G	0,08%
		APC	15	p.T1487A	c.4459°>G	0,06%
pz 35	0.0626 – 0.0838	TP53	5	p.R175H	c.524G>A	0,06%
		ERBB2	21	p.R840W	c.2518C>T	0,07%
pz 36	0.0572 – 0.0605	PIK3CA	9	p.E545K	c.1633G>A	4%
		TP53	5	p.R175H	c.524G>A	0,12%
pz 37	0.0576 – 0.0582	APC	15	p.S1356*	c.4067C>G	0,19%
		TP53	5	p.R175H	c.524G>A	0,46%
pz 38	0.0583 – 0.0587	APC	15	p.R805*	c.2413C>T	0,34%
		APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delA AAGA	0,13%
		TP53	7	p.M237I	c.711G>A	0,07%
		TP53	6	p.L194R	c.581T>G	0,42%
pz 39	0.0814 – 0.0919	KRAS	2	p.G12A	c.35G>C	1,97%
		TP53	8	p.R273C	c.817C>T	17%
		TP53	6	p.Y220C	c.659°>G	0,06%
		TP53	6	p.R213Q	c.638G>A	0,06%
		FBXW7	11	p.S585T	c.1754G>C	0,22%
pz 40	0.0591 – 0.0593	wt				
pz 41	0.0589 – 0.0592	KRAS	2	p.G12S	c.34G>A	0,29%
		TP53	6	p.V216M	c.646G>A	0,06%
		APC	15	p.A1485S	c.4453G>T	0,20%
pz 42	0.0590 – 0.0592	FBXW7	9	p.R465C	c.1393C>T	0,12%
		TP53	6	p.H214R	c.641°>G	0,23%
pz 43	0.0592 – 0.0593	NRAS	3	p.Q61R	c.182°>G	0,10%
		TP53	6	p.L194R	c.581T>G	0,06%
		TP53	5	p.R175H	c.524G>A	0,77%
pz 44	0.0582 – 0.0584	KRAS	2	p.G13C	c.37G>T	0,13%
pz 45	0.3889 – 0.4281	APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delA AAGA	0,66%
		TP53	8	p.A276LfsTer29	c.823_824delTG	1,20%
pz 46	0.0592 – 0.0593	TP53	8	p.P278S	c.832C>T	1,40%
		SMAD4	9	p.R361C	c.1081C>T	0,07%

		SMAD4	9	p.D355V	c.1064>T	0,06%
pz 47	0.0592 – 0.0593	GNAS	8	p.R201C	c.601C>T	0,15%
pz 48	0.0592 – 0.0593	KRAS	3	p.Q61H	c.183°>C	0,23%
pz 49	1.6319 – 1.8532	non valutabile				
pz 50	0.0590 – 0.0591	TP53	7	p.G245D	c.734G>A	0,10%
pz 51	0.0585 – 0.0590	wt				
pz 52	0.1266 – 0.2301	APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delA AAGA	7%
		FBXW7	10	p.R479Q	c.1436G>A	0,14%
		TP53	6	p.R196P	c.587G>C	17%
pz 53	0.1167 – 0.2288	TP53	7	p.G245S	c.733G>A	0,10%
pz 54	0.0588 – 0.0593	NRAS	3	p.Q61R	c.182°>G	0,09%
		TP53	8	p.R273C	c.817C>T	0,58%
		TP53	7	p.R248W	c.742C>T	0,77%
pz 55	0.0589 – 0.0592	TP53	7	p.C238Y	c.713G>A	0,09%
pz 56	0.0592 – 0.0593	BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	0,06%
		TP53	8	p.G266E	c.797G>A	18%
pz 57	0.3969 – 0.6193	wt				
pz 58	0.4628 – 0.5115	wt				
pz 59	0.4082 – 0.5069	KRAS	3	p.Q61H	c.183°>C	1,70%
		TP53	5	p.V173M	c.517G>A	14,90%
pz 60	0.0591 – 0.0592	KRAS	2	p.G13D	c.38G>A	0,17%
		TP53	8	p.R273H	c.818G>A	0,06%
pz 61	0.0592 – 0.0593	WT				
pz 62	0.1829 – 0.2237	BRAF	15	p.D594G	c.1781°>G	0,65%
pz 63	0.0591 – 0.0593	WT				
pz 64	0.0589 – 0.0591	APC	15	p.S1403TfsTer12	c.4208delG	0,15%
		KRAS	2	p.G12D	c.35G>A	0,11%
pz65		PIK3CA	9	p.E542K	c.1624G>A	0,38%
		TP53	6	p.L194R	c.581T>G	0,09%
		APC	15	p.S1400*	c.4199delC	0,44%
pz 66	2.9954 – 3.8192	non valutabile				
pz 67	0.0897 – 0.1216	KRAS	2	p.G12V	c.35G>T	28%
		NRAS	3	p.Q61K	c.181C>A	0,58%
		APC	15	p.S1315*	c.3944C>G	77%
pz 68		APC	15	p.l1557YfsTer2	c.4667_4668insA	3%
		TP53	8	p.D281PfsTer24	c.837_838delGA	6%
pz 69	1.8000 – 2.5022	non valutabile				
pz 70		WT				
pz 71	1.7532-1.9952	non valutabile				

pz 72	0.0699 – 0.0974	wt				
pz 73	0.0726 – 0.0928	TP53	6	p.R196*	c.586C>T	0,16%
pz 74	0.3953 – 0.4548	FBXW7	10	p.R479Q	c.1436G>A	2,60%
pz 75	1.6319 – 1.8532	non valutabile				
pz 76	0.1533 – 0.2905	TP53	7	p.C242Y	c.725G>A	51%
		APC	15	p.P1442LfsTer31	c.4325delC	17%
pz 77	2.0096 – 2.4789	non valutabile				
pz 78	0.3667 – 0.4154	FBXW7	10	p.R505C	c.1513C>T	1%
		TP53	8	p.R273H	c.818G>A	2,97%
		APC	15	p.S1355FfsTer19	c.4062_4063delT T	2,50%
pz 79	0.8820 – 1.1082	non valutabile				
pz 80	0.0885 – 0.0957	APC	15	p.E1379*	c.4135G>T	0,21%
		TP53	5	p.R175G	c.523C>G	0,2%
pz 81	1.0675 – 1.2886	non valutabile				
pz 82	0.0705 – 0.0874	PIK3CA	9	p.E545A	c.1634°>C	0,18%
		APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delA AAGA	31%
		KRAS	3	p.Q61H	c.183°>C	0,33%
		TP53	6	p.V216L	c.646G>T	83%
pz 83	0.1351 – 0.1527	PIK3CA	21	p.H1047R	c.3140°>G	0,18%
		FBXW7	11	p.S582L	c.1745C>T	0,12%
		TP53	6	p.R213*	c.637C>T	0,48%
pz 84	0.0592 – 0.0593	TP53	8	p.N268TfsTer77	c.801delG	0,30%
pz 85	0.0588 – 0.0592	PIK3CA	9	p.Q546R	c.1637°>G	
		APC	15	p.R1450*	c.4348C>T	
pz 86	2.0006 – 2.5689	non valutabile				
pz 87	0.1848 – 0.2022	KRAS	3	p.Q61H	c.183°>C	20%
		MAP2K1	2	p.K57T	c.170°>C	0,20%
		PIK3CA	9	p.E545A	c.1634°>C	0,24%
		APC	15	p.S811*	c.2432C>A	4,60%
		APC	15	p.Y1376CfsTer9	c.4127_4128delA T	8,07%
		TP53	7	p.L252_I254del	c.749_757delCCA TCCTCA	14,20%
pz 88	0.1659 – 0.1919	APC	15	p.E1353*	c.4057G>T	8,48%
		EGFR	12	p.G465E	c.1393G>A	1%
		KRAS	2	p.G12A	c.35G>C	5,46%
		TP53	7	p.R248Q	c.743G>A	25%
pz 89	0.0915 – 0.1153	APC	15	p.A1305KfsTer3	c.3913_3914delG CinsA	0,76

		APC	15	p.E1309DfsTer4	c.3927_3931delA AAGA	1,10%
		TP53	8	p.E285K	c.853G>A	2,53%
pz 90	0.0750 – 0.1311	TP53	8	p.R273C	c.817C>T	1,17%
pz 91	0.2025 – 0.4474	TP53	8	p.R273H	c.818G>A	2%
		TP53	8	p.F270V	c.808T>G	0,34%
pz 92	0.0780 - 0.1032	APC	15	p.E1464VfsTer8	c.4391_4394delAG AG	1,39%
		TP53	7	p.R248W	c.742C>T	0,85%
		FBXW7	10	p.D520N	c.1558G>A	0,64%
pz 93	0.0736 – 0.0922	BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	0,19%
		KRAS	2	p.G12D	c.35G>A	1,38%
		TP3	6	p.Y220C	c.659°>G	0,18%
		TP53	8	p.R267Q	c.800G>A	0,41%
		TP53	7	p.S241A	c.721T>G	13,47
pz 94	0.1169 – 0.1470	APC	15	p.Q1291*	c.3871C>T	46,00%
		BRAF	15	p.V600E	c.1799T>A	0,08%
		TP53	6	p.R213*	c.637C>T	39%
pz 95	0.0593 – 0.0593	PIK3CA	9	p.E542K	c.1624G>A	0,32%
		APC	15	p.Q1367*	c.4099C>T	0,08%
		KRAS	4	p.A146T	c.436G>A	0,11%
		TP53	5	p.C135Y	c.404G>A	0,10%
		SMAD4	9	p.Y353H	c.1057T>C	0,24%
pz 96	0.0590 – 0.0593	TP53	8	p.R273C	c.817C>T	0,82%
pz 97	0.0863 – 0.0938	GNAS	8	p.R201H	c.602G>A	0,09%
		APC	15	p.G1116VfsTer10	c.3347delG	0,22%
pz98	0.0852 – 0.1004	APC	15	p.R805*	c.2413C>T	0,68%
		TP53	7	p.R248W	c.742C>T	0,28%
		TP53	6	p.R213*	c.637C>T	0,17%
		TP53	5	p.K132E	c.394°>G	1,14%
		SMAD4	3	p.A118V	c.353C>T	0,06%
pz 99	0.0582 – 0.0590	APC	15	p.L1489SfsTer24	c.4466_4467delT A	4%
		TP53	5	p.V172F	c.514G>T	12%
pz 100	0.0595 – 0.0707	APC	15	p.R876*	c.2626C>T	0,17%
		APC	15	p.E1309*	c.3925G>T	0,13%
pz 101	0.0592 – 0.0593	KRAS	2	p.G12A	c.35G>C	0,13%
		TP53	5	p.C176Y	c.527G>A	0,31%
pz 102	0.0592 – 0.0593	APC	15	p.R876*	c.2626C>T	1,3%
		TP53	6	p.R213*	c.637C>T	5,6%
		TP53	5	p.R175H	c.524G>A	3,15%
		TP53	7	p.T253A	c.757°>G	0,7%
pz 103	0.0592 – 0.0593	PIK3CA	9	p.E545K	c.1633G>A	0,61%
		APC	15	p.E1309*	c.3925G>T	0,33%
pz 104	0.0571 – 0.0586	NRAS	3	p.Q61L	c.182°>T	0,79%
		NRAS	3	p.Q61K	c.181C>A	0,35%
		TP53	5	p.K132N	c.396G>T	2,28%
pz 105	0.5843 – 0.6941	KRAS	3	p.Q61H	c.183°>C	0,72%

		TP53	8	p.P278S	c.832C>T	38%
		APC	15	p.K1308*	c.3922°>T	14%
pz 106	0.0583 – 0.0697	APC	15	p.F1491LfsTer16	c.4473delT	0,89%
		TP53	7	p.C242F	c.725G>T	0,07%
		TP53	5	p.W146*	c.437G>A	0,38%
pz 107	0.0586 – 0.0591	TP53	6	p.Y220*	c.660T>G	0,33%
		KRAS	2	p.G12A	c.35G>C	0,05%
pz 108	0.6025 – 0.7680	TP53	6	p.Q192*	c.574C>T	46%
pz 109	0.0584 – 0.0590	wt				
pz 110	0.0589 – 0.0591	wt				
pz 111	0.0802 – 0.1003	wt				
pz 112	0.0865 – 0.1172	APC	15	p.Q1367*	c.4099C>T	0,18%
		TP53	7	p.R248W	c.742C>T	0,11%
pz 113	0.0591 – 0.0593	TP53	8	p.R273C	c.817C>T	0,13%
pz 114	0.0764 – 0.1159	KRAS	2	p.G12D	c.35G>A	0,18%
		TP53	6	p.R196*	c.586C>T	0,78%
pz 115	0.0579 – 0.0619	TP53	8	p.G266V	c.797G>T	0,35%
pz 116	0.0590 – 0.0592	ERBB2	8	p.V314I	c.940G>A	0,07%
		TP53	5	p.R175G	c.523C>G	0,5%
pz 117	0.1871 – 0.2098	ERBB2	20	p.V777L	c.2329G>T	0,47%
		TP53	5	p.R181C	c.541C>T	0,13%
pz 118	0.1437 – 0.1630	KRAS	2	p.G12D	c.35G>A	0,55%
		MAP2K1	2	p.K57T	c.170°>C	0,29%
		TP53	7	p.R248Q	c.743G>A	24%
		EGFR	12	p.G465R	c.1393G>A	0,15%
		APC	15	p.A1492CfsTer22	c.4473_4474insT	26%
		NRAS	3	p.Q61K	c.181C>A	0,07%
pz 119	0.0893 – 0.1247	APC	15	p.Q1303*	c.3907C>T	0,09%
		KRAS	2	p.G13D	c.38G>A	0,1%
		FBXW7	10	p.D480G	c.1439°>G	0,21%
pz 120	0.1644 – 0.1909	KRAS	2	p.G12D	c.35G>A	4%
pz121	0.3468 – 0.4134	TP53	8	p.R282W	c.844C>T	4%
pz 122	0.2705 – 0.2944	PIK3CA	9	p.E545K	c.1633G>A	11%
		KRAS	2	p.G13R	c.37G>C	34%

Lo studio ad oggi prevede 44 centri attivi e le figure di seguito mostra l'andamento dell'arruolamento dall'inizio dello screening, gennaio 2021 ad aprile 2022.

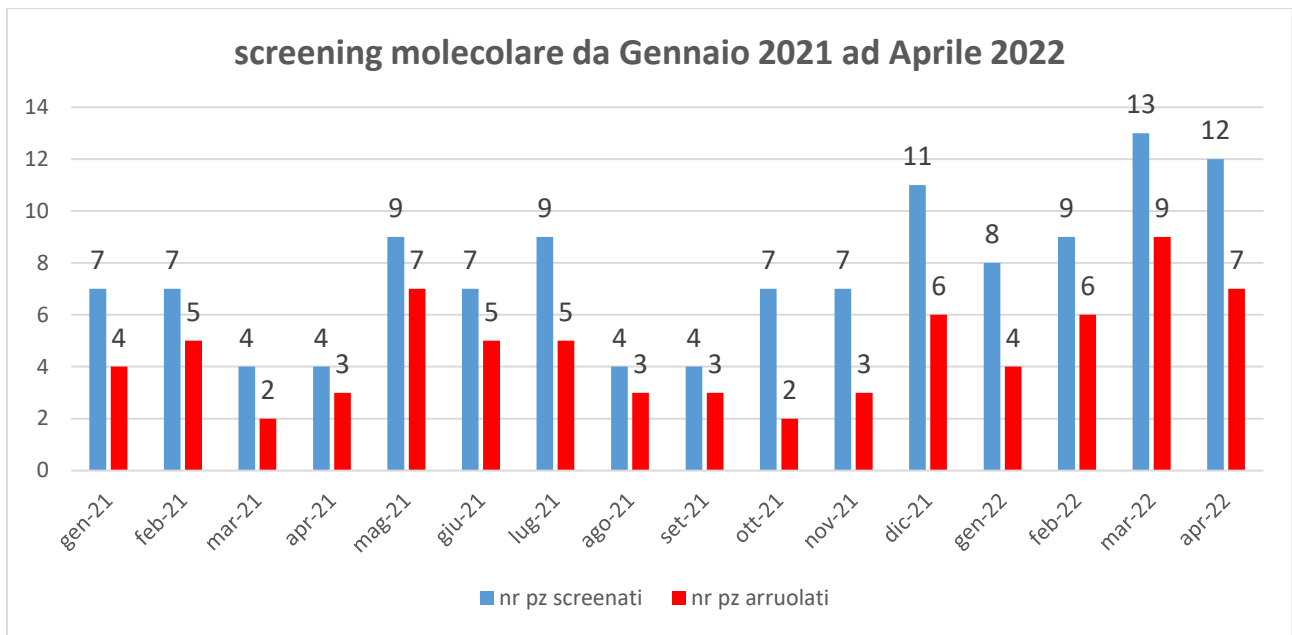


Fig 27: screening molecolare da Gennaio 2021 ad Aprile 2022

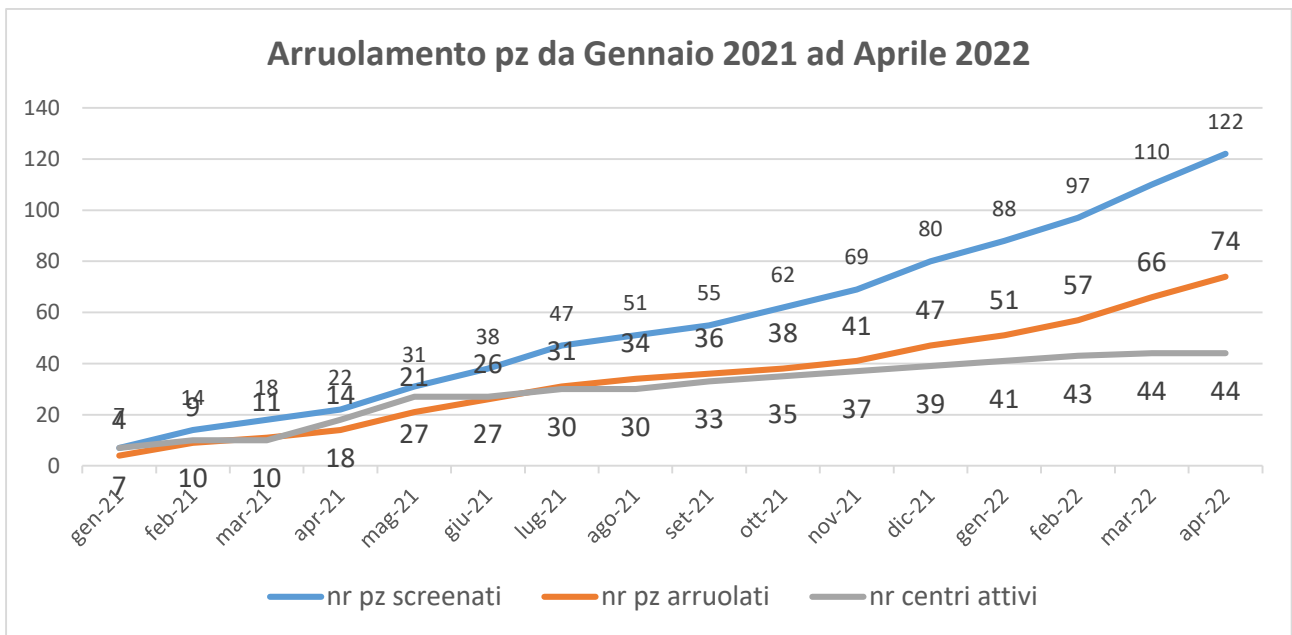


Fig 28: Arruolamento pz da Gennaio 2021 ad Aprile 2022

Tra le varianti rilevate dall'analisi molecolare quelle più frequenti coinvolgono i geni TP53 (83 mutazioni) e APC (45 mutazioni) (Fig. 29).

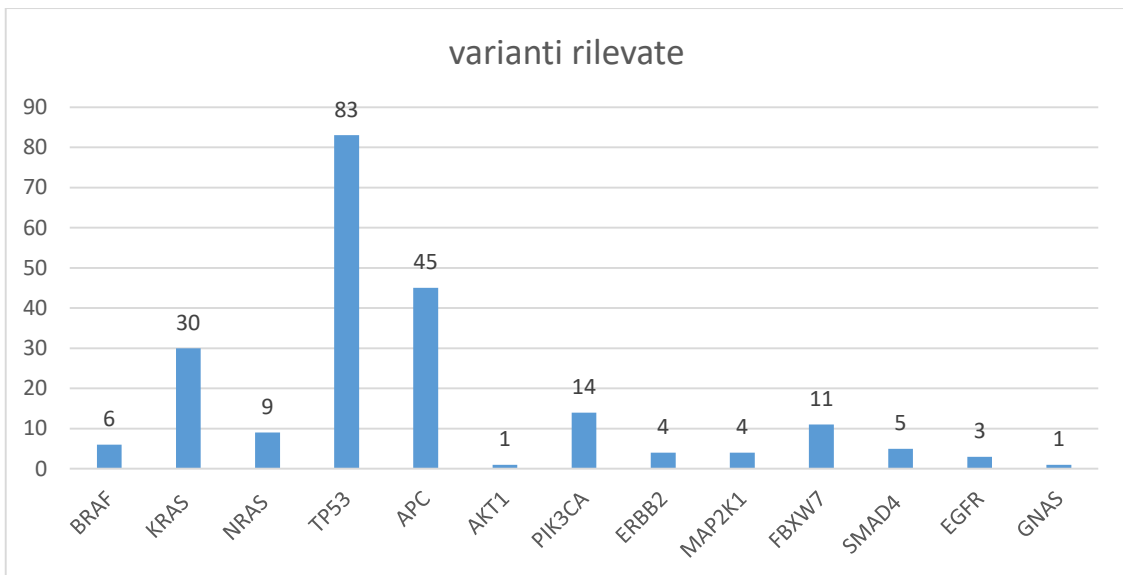


Fig 29: elenco e numero delle varianti rilevate

Tra le mutazioni riscontrate nei geni di interesse quelle più frequenti sono state quelle riscontrate nel codone 2 e 3 di KRAS (21 mutazioni e 7 mutazioni rispettivamente) e nel codone 3 di NRAS (8 mutazioni) (Fig. 30).

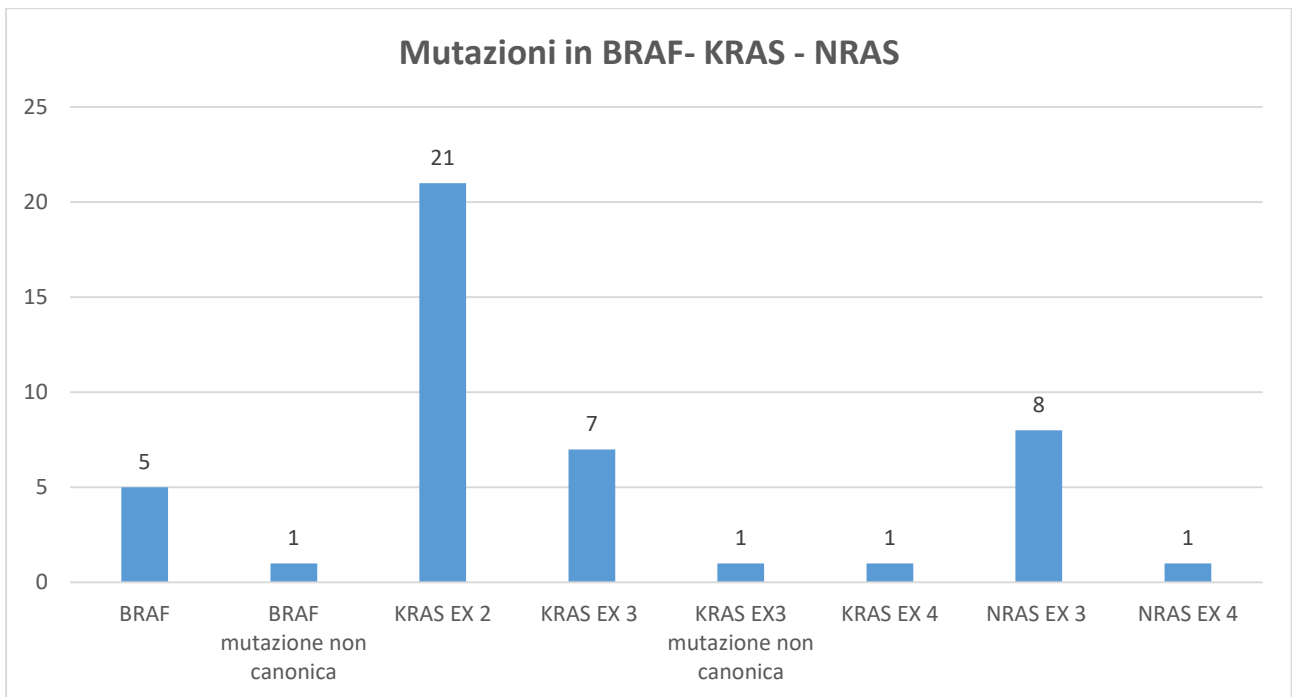


Fig.30: numero delle varianti rilevate nei geni di interesse

Oltre alle varianti canoniche sono state trovate 2 varianti non canoniche: una in BRAF (p.D594G) ed una nel codone 3 di KRAS (p.G60V). Al fine dell'arruolamento queste varianti non risultano precludere l'arruolamento del paziente.

Le varianti più comuni sono state rilevate nei geni TP53 e APC e tutte con un significato patogenico secondo Clinvar.

Altre varianti sono state trovate nei geni PIK3CA, FBXW7, ERBB2, SMAD4, MAP2K1, EGFR, AKT1 e GNAS.

Le varianti trovate nei geni PIK3CA, MAP2K1, AKT1 E GNAS interessano i comuni hotspot dei geni ed in Clinvar sono tutte riportate come patogeniche o verosimilmente patogeniche.

In FBXW7 sono state rilevate le seguenti varianti dal significato non noto: p.S582L, p.S585T, p.D520N e p.D480G. Secondo il predittore FATHMM queste varianti sono patogeniche con uno score medio di 0.99.

In ERBB2 oltre alla canonica variante p. V777L, sono state rilevate 2 varianti dal significato non noto: p.R896H e la p.V314I. Secondo il predittore FATHMM la variante p.R896H risulta patogenica con uno score di 0.76 mentre l'altra non è riportata.

In SMAD4 oltre alle varianti classificate come patogeniche o verosimilmente patogeniche, sono state trovate 2 varianti dal significato non noto e sono la variante p.D355V e la variante p.Y353H. Secondo il predittore FATHMM queste varianti sono patogeniche con uno score medio di 0.98.

In EGFR sono state trovate 2 varianti non canoniche dal significato sconosciuto, la variante p.R451C e la variante p.G465E. Entrambe le varianti si trovano nell'esone 12 e quindi nel dominio extracellulare della proteina.

Per quanto riguarda i dati clinici dello studio, essendo ad oggi ancora in fase di arruolamento nessun dato clinico è presente.

5. *Discussione*

5.1 Studio MAYA

L'introduzione degli inibitori del checkpoint ha fornito notevoli risultati in diversi tumori solidi, ma solo nei pazienti con tumori che mostrano un'instabilità microsatellitare (MSI-high)/ e deficienza del sistema del DNA mismatch repair (dMMR) beneficiano di queste molecole [91].

Questi pazienti rappresentano solo il 5% dei pazienti con cancro coloretale metastatico (mCRC) [103]. L'effetto favorevole dell'immunoterapia in questi pazienti sembra correlato al loro fenotipo ipermutato caratterizzato da un alto carico mutazionale come risultato di molteplici errori di replicazione del DNA. Infatti, ciò porta ad un aumento dei neoantigeni ed a un'abbondante infiltrazione di cellule immunitarie nel microambiente tumorale (TME) costituito da una grande quantità di linfociti infiltranti il tumore (TILs) effettori della risposta immunitaria antitumorale [103].

In questo gruppo di pazienti i risultati sono stati favorevoli a tal punto che sia ipilimumab a basse dosi (agente anti CTLA-4) più nivolumab (anti PD-1), sia nivolumab da solo hanno ottenuto l'approvazione della FDA [104-105]. Successivamente, il 29 giugno 2020, anche il pembrolizumab (anti PD-1) è stato approvato dalla FDA per il trattamento di prima linea dei pazienti con CRC non resecabile o metastatico dMMR.

Mentre nei pazienti con tumori dMMR gli inibitori del checkpoint permettono di ottenere una risposta duratura con un notevole miglioramento della sopravvivenza, i risultati attuali nei pazienti con tumori stabili ai microsatelliti (MSS o MSI-basso)/proficient DNA mismatch repair (pMMR), che rappresentano il 95% del totale dei pazienti con mCRC, sono deludenti.

Questi tumori mostrano, infatti, un basso carico mutazionale (TMB) e l'assenza di TME "immunocompetente", e sono intrinsecamente resistenti agli inibitori del checkpoint immunitario.

L'obiettivo di molteplici linee di ricerca attuali è quello di trovare nuove strategie per stimolare il ciclo immunitario a vari livelli, sia trasformando la TME in un fenotipo immunoreattivo con un efficace infiltrato immunitario, e/o aumentando il carico mutazionale e la generazione di neoantigeni, o influenzando l'attività dell'interferone- γ (IFN- γ) con l'inibizione dell'espressione dei ligandi immunosoppressivi. Questo consentirebbe, infatti, di sfruttare l'immunoterapia anche in pazienti con pMMR/MSS. A tal fine, gli agenti citotossici, le terapie target e/o la radioterapia potrebbero influenzare l'interazione tra le cellule tumorali, lo stroma infiltrante il tumore e il sistema immunitario dell'ospite.

In questo quadro si colloca lo studio MAYA che sfrutta la capacità della terapia con temozolomide di indurre nuove mutazioni somatiche e di indurre nel tumore uno stato dMMR-like[91].

Lo studio MAYA ha raggiunto il suo endpoint primario, fornendo la prova che l'ipermutazione indotta da TMZ può essere sfruttata per ottenere risposte durevoli alla combinazione di ipilimumab e nivolumab a basse dosi in pazienti con mCRC pMMR/MSS e MGMT silenziato. Questi risultati rappresentano la convalida clinica di prove biologiche ottenute in modelli e pazienti CRC [106] e in altri tumori sensibili alla TMZ come i carcinomi neuroendocrini [107].

Per quanto riguarda gli endpoint di efficacia, i risultati di PFS e OS sono risultati favorevoli se confrontati con quelli ottenuti dalle opzioni standard di linea successive disponibili ad oggi per i pazienti con mCRC non selezionati con indagini molecolari. Tuttavia questi risultati devono essere interpretati con cautela data la natura non randomizzata dello studio. Lo studio è stato progettato con una fase iniziale di monoterapia TMZ e una seconda fase con la combinazione CTLA-4/PD-1 aggiunta alla TMZ [91].

La strategia di trattamento caratterizzata da 2 distinte fasi è stata pensata per le seguenti considerazioni:

- 1) L'ipermutazione è un meccanismo di resistenza acquisita alla TMZ nei pazienti con beneficio clinico iniziale;
- 2) Anche se il silenziamento completo di MGMT è necessario per ottenere il controllo della malattia con TMZ, non sono stati identificati finora ulteriori fattori clinici o molecolari di base oltre allo stato di MGMT per predire l'attività della TMZ.

Solo uno dei quattro pazienti molecularmente selezionati che hanno iniziato il primo trattamento con TMZ ha ottenuto una SD/PR, evidenziando che la selezione dei pazienti guidata dal trattamento con TMZ è ancora cruciale.

Anche se la resistenza acquisita alla TMZ nei pazienti con mCRC silenziato MGMT di solito si verifica rapidamente entro 4-6 mesi, solo due cicli iniziali di TMZ potrebbero non essere sufficienti per indurre un aumento significativo del carico mutazionale del tumore. Pertanto, la continuazione del trattamento con TMZ durante la seconda fase di trattamento era necessaria.

In particolare, la resistenza acquisita alla TMZ può emergere per mezzo di due diversi meccanismi, cioè l'espansione delle cellule che esprimono MGMT contro l'ipermutazione secondaria.

Il primo evento potrebbe essere legato all'eterogeneità tumorale dell'espressione di MGMT, che potrebbe essere sfuggita alla valutazione della colorazione di MGMT su campioni tumorali, e che potrebbe condizionare la selezione di cloni tumorali che esprimono MGMT durante il primo

trattamento con TMZ. Sulla base di queste considerazioni, sebbene i tumori con bassa e/o focale espressione di MGMT siano stati esclusi dallo studio MAYA, gli studi futuri dovrebbero prevedere biopsie tumorali pre-arruolamento per confermare l'eleggibilità molecolare, specialmente nelle popolazioni di pazienti pretrattati.

Al contrario, l'aumento del carico mutazionale del tumore durante la TMZ può essere osservato preferenzialmente nel sottogruppo selezionato di tumori con assenza di espressione MGMT, potenzialmente accoppiato con un'alta percentuale di ipermetilazione MGMT.

Come precedentemente riportato, l'espressione MGMT al momento della resistenza potrebbe essere associata al limitato beneficio osservato in alcuni pazienti nella seconda fase del trattamento, mentre l'inizio dell'ipermutazione è l'evento chiave per ottenere risposte durature all'immunoterapia. Notevolmente, il plateau osservato nelle curve PFS e le risposte ritardate osservate dopo il time-point di 8 mesi in cinque pazienti suggeriscono l'efficacia dell'immunoterapia. L'associazione di un agente anti-CTLA4 al trattamento anti-PD1 nello studio MAYA potrebbe aver avuto un ruolo importante nel rafforzare le risposte immunitarie anti-tumorali.

Al contrario, i risultati negativi emergenti da studi di combinazione con TMZ e ICI in pazienti con GBM [108, 109], possono essere spiegati da diversi fattori oltre all'uso del solo anti-PD-1, come la mancata selezione delle recidive di GBM ipermutate, l'uso massiccio di steroidi in questa popolazione di pazienti e il microambiente immunosoppresso tipico di questi tumori.

Il profilo di tossicità della combinazione durante la seconda fase di trattamento è stato gestibile e coerente con quello della monoterapia con TMZ e ICIs, in linea con i dati della letteratura di TMZ più ICIs riportati in pazienti con GBM [108]. Solo 1 paziente ha interrotto la TMZ per tossicità ematologica mentre continuava l'immunoterapia e solo 1 paziente ha interrotto il trattamento dello studio per un evento avverso immuno correlati (irAE). In particolare, l'incidenza estremamente bassa di irAE di grado 3 o più è in linea con l'uso di ipilimumab a basso dosaggio aggiunto a nivolumab, come riportato in pazienti con MSI-alto mCRC [110].

La strategia dello studio MAYA merita di essere indagata da studi clinici randomizzati che dovrebbero scegliere attentamente il regime, il timing e la strategia di trattamento ottimali. E' evidente infatti l'effetto collo di bottiglia rilevante osservato nello studio a causa della selezione sia molecolare che guidata dal trattamento con TMZ. Di conseguenza, solo il 5% dei pazienti con mCRC può essere idoneo all'intera strategia dello studio MAYA, ma questi pazienti ottengono un beneficio a lungo termine molto promettente.

Nell'era della medicina di precisione, è ben riconosciuto che l'approccio "one-fits-all" non è più appropriato, ma che l'elevata eterogeneità dei tumori richiede un crescente grado di dissezione molecolare per fornire approcci personalizzati raffinati. In linea con questo presupposto, lo studio ARETHUSA in corso è stato progettato sulla base dello stesso rationale dello studio MAYA e può fornire ulteriori prove su questo argomento. In questo studio, i pazienti con mCRC pMMR/MSS e espressione MGMT bassa/assente ricevono un trattamento di inizio con la monoterapia TMZ fino alla PD, seguito da una ri-biopsia del tumore e da pembrolizumab a singolo agente in caso di dimostrazione di ipermutazione indotta da TMZ.

Dati i promettenti risultati dello studio MAYA, le analisi traslazionali in corso saranno cruciali per caratterizzare longitudinalmente l'evoluzione del paesaggio genomico e immunitario durante la strategia di trattamento. Inoltre, una comprensione più profonda dei meccanismi molecolari di risposta e resistenza al trattamento iniziale con TMZ gioca un ruolo cruciale in questa impostazione, per ridurre il tasso di fallimento del trattamento stesso. Oltre a questo, la selezione accurata dei pazienti con localizzazione del tumore primario sul lato destro e l'età più giovane tra quelli con controllo della malattia con TMZ richiede ulteriori ricerche.

Sarebbe utile, inoltre, l'analisi delle biopsie liquide ottenute durante il trattamento con TMZ per mezzo di saggi ultrasensibili [111] che potrebbe consentire l'identificazione precoce del sottogruppo di pazienti con resistenza acquisita guidata da ipermutazione e mutazioni nei geni MMR, selezionando così potenzialmente il sottogruppo di pazienti con beneficio duraturo dalla successiva combinazione immunoterapica.

Nel complesso, lo studio MAYA fornisce una piattaforma traslazionale con raccolta prospettica di campioni di tumore e di plasma, per fornire potenzialmente risposte alle domande biologiche ancora aperte riguardanti il cancro e l'evoluzione immunitaria sotto trattamento.

Inoltre i risultati dello studio MAYA aprono la strada a ulteriori indagini in pazienti con mCRC con pMMR/MSS e MGMT silenziato o con altri tumori sensibili alla TMZ o alla dacarbazina, anche nel quadro di studi agnostici.

Lo studio MAYA aveva diverse limitazioni. In primo luogo, lo studio non era randomizzato e aveva una piccola dimensione del campione, quindi i risultati dell'attività sono di natura preliminare. Da notare che la maggior parte dei pazienti aveva un ECOG PS (ECOG Performance Status) accettabile nonostante fossero pesantemente pretrattati, il che suggerisce che solo una popolazione selezionata è stata arruolata in questo studio.

5.1 Studio PARERE

Negli ultimi anni parecchi studi si sono focalizzati sulle possibili terapie per i pazienti con carcinoma del colon retto metastatico refrattari alla chemioterapia. In questi studi si è indagato sull'efficacia della reintroduzione degli anti-EGFR in linee avanzate di terapia in pazienti già esposti in linee precedenti a questi farmaci. Un'analisi retrospettiva ha dimostrato il beneficio clinico della reintroduzione di cetuximab in pazienti che dopo un iniziale beneficio hanno mostrato con resistenza acquisita a un precedente regime contenente cetuximab, seguito da almeno una linea di terapia successiva [112]. Infatti, la comparsa di mutazioni RAS in tumori inizialmente RAS wild-type è un meccanismo ben riconosciuto di resistenza acquisita agli anti-EGFR [113]. Una terapia basata sugli anti-EGFR sarebbe in grado di ridurre sostanzialmente la massa di cellule sensibili (wt), rendendo così i cloni resistenti (mutanti) progressivamente predominanti fino all'evidenza clinica della progressione della malattia. Durante un ulteriore trattamento non basato su anti-EGFR, i cloni sensibili verrebbero almeno parzialmente ripristinati, ponendo così le basi per la potenziale e segnalata attività del rechallenge anti-EGFR [90].

Recentemente, sono state introdotte ulteriori opzioni per i pazienti chemorefrattari in particolare, due nuovi agenti sono stati registrati dalle autorità regolatorie in questo contesto: regorafenib e trifluridina/tipiracil. Entrambi i farmaci, nell'ambito di studi clinici, confrontati con placebo in pazienti chemorefrattari con mCRC, hanno mostrato un beneficio statisticamente significativo in termini di OS e PFS.

Sulla base delle evidenze attualmente disponibili, nei pazienti mCRC RAS wt chemorefrattari e anti-EGFR naive la sequenza di trattamento ottimale è una terapia a base di anti-EGFR (panitumumab o cetuximab +/- irinotecan) seguita da regorafenib [1-3].

Uno studio randomizzato giapponese di fase II denominato REVERCE [97] ha confrontato una strategia standard composta da cetuximab +/- irinotecan seguita alla progressione da regorafenib rispetto alla sequenza inversa in pazienti mCRC chemorefrattari e anti-EGFR-naïve, RAS wt. Nonostante questo studio sia stato interrotto prematuramente senza perciò aver dato dei risultati definitivi ciò che si può concludere dai risultati ottenuti è che il regorafenib riesca ad aumentare la sensibilità del tumore agli agenti anti-EGFR. In effetti, il tasso di risposta durante la terapia con cetuximab è stato numericamente superiore quando è stato somministrato dopo regorafenib (28%) rispetto alla somministrazione prima di regorafenib (20%). L'OS mediana, era a favore della strategia sperimentale regorafenib seguita da una terapia a base di anti-EGFR mentre la PFS

durante il primo trattamento (PFS1) era paragonabile tra regorafenib e cetuximab mentre la PFS durante il secondo trattamento (PFS2) era notevolmente migliorata nella sequenza sperimentale.

L'individuazione dei meccanismi di resistenza acquisita agli anti-EGFR nel DNA tumorale circolante (ct-DNA) è una delle applicazioni più interessanti della biopsia liquida nella gestione dei pazienti con mCRC. In studi clinici retrospettivi, l'analisi del ct-DNA di campioni raccolti durante il trattamento con anti-EGFR ha dimostrato la progressiva comparsa di alterazioni genomiche multiple sia all'interno che all'esterno della via dell'EGFR, tra cui principalmente mutazioni RAS, ma anche mutazioni BRAF, PIK3CA e dell'ectodominio dell'EGFR.

La comparsa di mutazioni RAS al momento della progressione della malattia alla chemioterapia di prima linea più anti-EGFR è ormai nota e diversi studi hanno mostrato come al momento della sospensione degli anti-EGFR si nota una diminuzione della frequenza delle mutazioni RAS acquisite [90]. Questa osservazione rafforza ulteriormente il razionale molecolare del rechallenge anti-EGFR ossia della reintroduzione dell'anti EGFR dopo un periodo di sospensione.

Uno studio prospettico di fase II, il CRICKET [114], ha confermato che il rechallenge con cetuximab più irinotecan è un regime attivo nei pazienti con mCRC RAS e BRAF wt progrediti a un trattamento di prima linea basato su cetuximab e a un regime di seconda linea basato su bevacizumab, con un RR del 21%. Le mutazioni RAS sono state riscontrate nelle biopsie liquide raccolte alla baseline del rechallenge in circa il 50% dei pazienti valutabili e nessuna mutazione RAS è stata rilevata nei campioni dei pazienti che hanno ottenuto una risposta confermata. I pazienti con ct-DNA RAS wt hanno avuto una PFS significativamente più lunga rispetto a quelli con ctDNA mutato RAS (4,0 vs 1,9 mesi). Pertanto, le mutazioni RAS nel ct-DNA sono state confermate come predittori di nessun beneficio clinico dal rechallenge anti-EGFR.

In questo contesto si colloca lo studio PARERE, che è uno studio randomizzato di fase II di panitumumab anti-EGFR seguito alla progressione da regorafenib rispetto alla sequenza inversa in pazienti mCRC RAS e BRAF wt con le seguenti caratteristiche:

- a) precedente trattamento con fluoropirimidina, oxaliplatino, irinotecan e agenti anti-angiogenici (bevacizumab o aflibercept) o non considerati candidati;
- b) malattia stabile di almeno 6 mesi a un precedente trattamento di prima linea a base di anti-EGFR;
- c) ct-DNA RAS e BRAF wt al momento dello screening.

Lo scopo dello studio PARERE è quello di valutare prospetticamente il cf-DNA come biomarcatore predittivo dell'efficacia del rechallenge anti-EGFR e di valutare la strategia di regorafenib seguita

da panitumumab in una popolazione caucasica di pazienti chemio-refrattari candidati al re-challenge anti-EGFR.

Questo studio rappresenta il primo studio in cui solo l'analisi su cf DNA viene usata per lo screening molecolare necessario ad arruolare i pazienti che non mostrano mutazioni di resistenza in RAS ed in BRAF.

Studi recenti mostrano infatti come la rilevazione di mutazioni mediante l'analisi del ctDNA consente di avere un quadro mutazionale più completo rispetto all'analisi su tessuto. Ciò innanzitutto perché è in grado di catturare l'eterogeneità tumorale, infatti è ormai risaputo che il profilo genomico del tumore primario e delle metastasi non sono sempre concordanti a causa dell'intrinseca eterogeneità molecolare della malattia [90]. 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, essendo poco invasiva, è sicuramente uno strumento utile per il monitoraggio dell'evoluzione molecolare dei tumori coloretali in corso di trattamento.

Lo studio prevede l'arruolamento di pazienti wt cu cf-DNA negli hotspot di KRAS, NRAS e BRAF. Ad oggi sono stati screenati 122 pazienti e di questi 74% sono stati arruolati, con un failure rate del 7%. Tra le mutazioni che sono state riscontrate le più frequenti riguardano i geni TP53 riscontrate nel 68% dei pazienti, APC nel 38% dei pazienti e PIK3CA nell'11 % dei pazienti. Mutazioni in KRAS sono state riscontrate nel 23% dei pazienti, mutazioni in NRAS nel 6% dei pazienti ed in BRAF nel 3% dei pazienti.

A frequenza minore sono state riscontrate mutazioni nei geni FBXW7 (9%), SMAD4 (4%), ERBB2 (3%), MAP2K1 (3%), EGFR (2,5%), GNAS (1%) ed AKT (1%).

Tra le mutazioni nei geni oggetto di screening è stata rilevata una mutazione non canonica di BRAF, la mutazione BRAF p.D594G, che risulta patogena in clinvar ed è stata descritta la prima volta nell'adenocarcinoma intestinale nel 2004 [115], ed una mutazione non canonica in KRAS, la mutazione KRAS p.Gly60Val, che risulta patogena in clinvar ed è stata descritta per la prima volta nel carcinoma del colon retto nel 2011 [116].

Mutazioni nel gene FBXW7 sono state descritte come fattore prognostico negativo nei tumori m CRC. Esse sono presenti in circa il 7% [117] di CRC.

Tra le varianti in SMAD4 la variante p.Y353H non è riportata in pubmed mentre la variante p.D355V sembra essere associata allo stato metastatico del carcinoma del colon retto [118].

Interessanti sono anche le varianti trovate in EGFR. Queste si trovano nell'esone 12 della proteina e quindi nella regione extracellulare. In uno studio su modelli cellulari queste varianti sembrano

essere associate alla resistenza acquisita al cetuximab. In particolare la variante p.G465E si trova nella regione del recettore che sembra interagire con in cetuximab [119].

Il ritrovamento di mutazioni KRAS- NRAS o KRAS-BRAF nel cf-DNA dello stesso paziente, anche se sono mutazioni mutualmente esclusive, non sorprende. Infatti, ciò sottolinea il concetto di come il cf-DNA rappresenti uno specchio completo del tumore e quindi come riesca a mettere in risalto l'eterogeneità tumorale.

6. Conclusioni

6.1 Conclusioni studio MAYA

E' ormai evidente l'efficacia dell'immunoterapia in tumori solidi con uno stato di instabilità alta dei microsatelliti e dMMR, ma i pazienti con queste caratteristiche rappresentano solo il 5% del totale. Le poche strategie di trattamento dei pazienti con mCRC refrattari alla chemioterapia evidenziano la necessita di individuare nuove strategie soprattutto nel restante 95% dei pazienti. Da ciò la nascita recente di studi volti a valutare l'effetto dell'immunoterapia in pazienti con MSS e pMMR ed indagare diverse strategie per immuno-sensibilizzare questa porzione cospicua di pazienti.

Lo studio MAYA ha fornito a tal proposito utili risultati che aprono le porte alla progettazione di studi randomizzati. Lo studio ha fornito, infatti, una forte evidenza clinica del ruolo della TMZ come strategia di priming per l'immuno-sensibilizzazione di MSS e mCRC "freddi" selezionati per il silenziamento di MGMT. Sono necessarie ulteriori indagini per ottimizzare la selezione molecolare e clinica dei pazienti eleggibili per questo approccio terapeutico con l'obiettivo di massimizzare il suo tasso di successo.

6.2 Conclusioni studio PARERE

Sempre più studi stanno mostrando il ruolo positivo della biopsia liquida come strumento utile al monitoraggio della dinamicità evolutiva molecolare dei tumori coloretali in corso dei trattamenti; studi precedenti hanno dimostrato come una strategia di rechallenge con anti-EGFR può essere attiva in pazienti con mCRC wild-type RAS e BRAF con resistenza acquisita alla terapia di prima linea. Inoltre, altri studi evidenziano l'efficacia in termini di OS del regorafenib, il quale sembra anche aumentare la sensibilità del tumore agli agenti anti-EGFR. Da qui i presupposti dello studio PARERE.

La valutazione dello stato mutazionale di RAS su ctDNA si rivela fondamentale nella selezione dei pazienti candidati.

Ad oggi lo studio PARERE risulta ancora in fase di arruolamento per cui per quanto riguarda il raggiungimento degli end point dello studio non si può ci sono ancora dati sull'andamento della terapia.

Per quanto riguarda l'arruolamento sono stati arruolati 74 pazienti su 122 (61%) in linea con le attese.

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. Sung H, Ferlay J, Siegel L R , Laversanne M, Soerjomataram I , Jemal A , Bray F **Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries**. CA Cancer J Clin., 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
2. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Niksic M, Bonaventure A, Valkov M, Johnson C J, Esteve J, Ogunbiyi O J, Azevedo ESG, Chen WQ, Eser S, Engholm G, Stiller CA, Monnereau A, Woods RR, Visser O, Lim GH, Aitken J, Weir HK, Coleman MP. **Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries**. Lancet 2018 Mar 17;391(10125):1023-1075. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
3. Schreuders EH, Ruco A., Rabeneck L, Schoen RE, Sung JJ, Young GP, Kuipers EJ **Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes** Gut 2015 Oct;64(10):1637-49. doi: 10.1136/gutjnl-2014-309086
4. Brown LJ, Roeger SL, Reed RL. **Patient perspectives on colorectal cancer screening and the role of general practice**. BMC Fam Pract 2019 Jul 29;20(1):109. doi: 10.1186/s12875-019-0997-5
5. Xu P, Xi Y, Zhu J, Zhang M, Luka Z, Stolz DB, Cai X, Xie Y, Xu M, Ren S, Huang Z, Yang D, York JD, Ma X, Xie W **Intestinal sulfation is essential to protect against colitis and colonic carcinogenesis**. Gastroenterology, 161 (2021), pp 271-286
6. Fitzmaurice C, Allen C, et al. **Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study** JAMA Oncol. 2019 Dec 1;5(12):1749-1768. doi: 10.1001
7. Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, et al. **Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study** Cancer 2012 Jul 15;118(14):3636-44. doi: 10.1002
8. Doubeni CA, Major JM, Laiyemo AO, Schootman M, Zauber AG, Hollenbeck AR, Sinha R, Jeroan Allison J. **Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence** J Natl Cancer Inst 2012 Sep 19;104(18):1353-62. doi: 10.1093
9. I numeri del cancro in Italia 2021 AIOM 2020
10. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. **Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors** Prz Gastroenterol 2019;14(2):89-103. doi: 10.5114
11. De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V , Duraturo F , Izzo P , Delrio P. **Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review)** Oncol Rep 2015 Sep;34(3):1087-96. doi: 10.3892 Oncol Rep 2015;34:1087-96
12. SEER*Explorer: An interactive website for SEER cancer statistics [Internet] Surveillance Research Program, National Cancer Institute; Available from <https://seercancer.gov/explorer/> Accessed November 01 2018
13. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zauber AG, Anderson RN, Jemal A, Schymura MJ, Lansdorp-Vogelaar I, Seeff LC, van Ballegooijen M, Goede S, Ries LAG **Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates** Cancer 2010 Feb 1;116(3):544-73. doi: 10.1002 /cnr.24760
14. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW **Hereditary and familial colon cancer** Gastroenterology 2010;138:2044-2058 doi: 10.1053/jgastro201001054
15. Lucci-Cordisco E, Risio M, Venesio T, Genuardi M. **The growing complexity of the intestinal polyposis syndromes**. Am J Med Genet A 2013;161A:2777-2787 doi: 10.1002/ajmga36253
16. Giardiello F M, Allen J I, Axilbund J E, Boland C R, Burke C A, Burt R W, Rex D K **Guidelines on genetic evaluation and management of lynch syndrome: A consensus statement by the US multi-society task force on colorectal cancer**. Am J Gastroenterol. 2014 Aug;109(8):1159-79. doi: 10.1038/ajg.2014.186
17. Valle L **Genetic predisposition to colorectal cancer: Where we stand and future perspectives**. World J Gastroenterol, 2014 Aug 7;20(29):9828-49. doi: 10.3748/wjg.v20.i29.9828

18. Bonadona V, Bonaiti B, Olschwang S, et al. **Cancer risks associated with germline mutations in *MLH1*, *MSH2*, and *MSH6* genes in Lynch syndrome.** JAMA 2011 Jun 8;305(22):2304-10. doi: 10.1001/jama.2011.743 JAMA 2011;305:2304–10
19. Galiatsatos P, Foulkes WD Familial adenomatous polyposis Am J Gastroenterol 2006 Feb;101(2):385-98. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00375 .x.
20. Aihara H, Kumar N, Thompson CC **Adenomatous Polyposis : Rationale and Update** Eur J Gastroenterol Hepatol 2014 Mar;26(3):255-62. doi:10.1097/MEG.000000000000010.
21. 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>
22. Lubbe SJ, Di Bernardo MC, Chandler IP, Houlston RS. **Clinical implications of the colorectal cancer risk associated with *MUTYH* mutation** J Clin Oncol 2009 Aug 20;27(24):3975-80. doi: 10.1200/JCO.2008.21.6853
23. Robsahm TE, Aagnes B, Hjartaker A, Langseth H, Bray FI, Larsen IK. **Body mass index, physical activity, and colorectal cancer by anatomical subsites: a systematic review and meta-analysis of cohort studies** Eur J Cancer Prev 2013 Nov;22(6):492-505. doi: 10.1097/CEJ.0b013e328360f434.
24. Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. **Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies** PLoS One 2011;6(6):e20456. doi: 10.1371/journal.pone.0020456.
25. Kim E, Coelho D, Blachier F **Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer** Nutr Res 2013 Dec;33(12):983-94. doi: 10.1016/j.nutres.2013.07.018.
26. Song M, Garrett WS, Chan AT **Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention** Gastroenterology 2015 May;148(6):1244-60. e16. doi: 10.1053/j.gastro.2014.12.035.
27. 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 **Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis** Br J Cancer. 2015 Feb 3;112(3):580-93. doi: 10.1038/bjc.2014.579.
28. 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. **Cigarette smoking and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes.** J Natl Cancer Inst. 2010 Jul 21;102(14):1012-22. doi: 10.1093/jnci/djq201.
29. Ordonez-Mena JM, Walter V, Schottker B, Jenab M, O'Doherty MG, Kee F, Bueno-de-Mesquita B, Peeters PHM, Stricker BH, Ruiter R, Hofman A, Söderberg S, Jousilahti P, Kuulasmaa K, Freedman ND, Wilsgaard T, Wolk A, Nilsson LM, Tjønneland A, Quirós JR, van Duijnhoven F J B, Siersema P D, Boffetta P, Trichopoulou A, Brenner H. **Impact of prediagnostic smoking and smoking cessation on colorectal cancer prognosis: a meta-analysis of individual patient data from cohorts within the CHANCES consortium.** Ann Oncol 2018 Feb 1;29(2):472-483. doi:10.1093/annonc/mdx761
30. Fearon ER, Vogelstein B. **A genetic model for colorectal tumorigenesis** Cell 1990 Jun 1; 61:759–767 doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-I
31. Grady WM. **Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer** Biochem Soc Trans 2005 Aug;33 :684–688 doi: 10.1042/BST0330684
32. Grady WM, Markowitz SD. **Genetic and Epigenetic Alterations in Colon Cancer.** Ann Rev Genom Hum Genet 2002; 3:101 doi: 10.1146/annurevgenom.3022502103043
33. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. **Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements.** Int J Mol Sci 2020 Dec 24;22(1):130 doi: 10.3390/ijms22010130
34. Pino MS, Chung DC. **The chromosomal instability pathway in colon cancer.** Gastroenterology 2010;138: 2059–2072 doi: 10.1053/jgastro.2009.12065

35. Markowitz SD, Bertagnolli MM. **Molecular Basis of Colorectal Cancer**. N Engl J Med 2009; 361:2449–2460 doi: 101056/NEJMra0804588
36. Tsang AH, Cheng KH, Wong AS, Ng SS, Ma BB, Chan CM, Tsui NB, Chan LW, Yung BY, Wong SC. **Current and future molecular diagnostics in colorectal cancer and colorectal adenoma**. World J Gastroenterol 2014; 20:3847–3857 doi: 103748/wjgv20i143847
37. Pino MS, Chung DC. **The chromosomal instability pathway in colon cancer** Gastroenterology 2010; 138:2059–2072 doi: 101053/jgastro200912065
38. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B. **Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas** Science 1989;244:217–221 doi: 101126/science2649981
39. Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, Willson JK, Markowitz S, Hamilton SR, Kern SE, Kinzler KW, Vogelstein B. **Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers** Nat Genet 1996 Jul;13:343–346 doi: 101038/ng0796-343
40. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JKV, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu V. **High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers** Science 2004; 304:554 doi: 101126/science1096502
41. Diep CB, Kleivi K, Ribeiro FR, Teixeira MR, Lindgjaerde OC, Lothe RA. **The order of genetic events associated with colorectal cancer progression inferred from meta-analysis of copy number changes**. Genes Chromosom Cancer 2006; 45:31–41 doi: 101002/gcc20261
42. Jasmine F, Rahaman R, Dodsworth C, Roy S, Paul R, Raza M, Paul-Brutus R, Kamal M, Ahsan H, Kibriya MG. **A genome-wide study of cytogenetic changes in colorectal cancer using SNP microarrays: Opportunities for future personalized treatment** PLoS ONE 2012;7(2):e31968 doi: 101371/journalpone0031968
43. Baudis M. **Genomic imbalances in 5918 malignant epithelial tumors: An explorative meta-analysis of chromosomal CGH data**. BMC Cancer 2007 Dec 18; 7:226 doi: 101186/1471-2407-7-226
44. Li VSW, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Albert JR Heck AJR; Maurice MM, Mahmoudi T, Clevers H. Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1. Cell 2012 Jun 8;149(6):1245-56. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.002.
45. Clevers H. **Wnt/beta-catenin signaling in development and disease**. Cell 2006; 127: 469-480
46. Soreide K, Janssen EA, Soiland H, Korner H, Baak JP. **Microsatellite instability in colorectal cancer**. British Journal of Surgery, 2006 Apr; 93:395-406 doi: 101002/bjs5328.
47. Adams RL. **DNA methylation-The effect of minor bases on DNA-protein interactions**. Biochem J 1990 Jan 15;265(2):309-20. doi: 10.1042/bj2650309.
48. Kim B H, Kim JM, Kang GH, Chang HJ, Kang DW, Kim JH, Bae JM, Seo AN, Park HS, Kang YK, Lee KH, Cho MY, Do IG, Lee HS, Chang HK, Park DY, Kang HJ, Sohn JH, Chang MS, Jung ES, Jin SY, YuE, Han HS, Kim YW. **Standardized pathology report for colorectal cancer, 2nd Edition** J Pathol Transl Med. 2020 Jan;54(1):1-19. doi: 10.4132/jptm.2019.09.28. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 54:1-19 doi: 104132/jptm20190928
49. Mainenti PP, Romano M, Imbriaco M, Camera L, Pace L, D'Antonio D, Bucci L, Galloro G, Salvatore M. **Added value of CT colonography after a positive conventional colonoscopy: impact on treatment strategy** Abdom Imaging Jan-Feb 2005;30(1):42-7. doi: 10.1007/s00261-004-0246-8.
50. Morrin MM, Kruskal J B, Farrell R J, Goldberg S N, McGee J B, Raptopoulos V. **Endoluminal CT colonography after an incomplete endoscopic colonoscopy** AJR Am J Roentgenol 1999 Apr;172(4):913-8. doi: 10.2214/ajr.172.4.10587120.
51. Brown G, Radcliffe AG, Newcombe RG, Dallimore NS, Bourne MW, Williams GT. **Preoperative assessment of prognostic factors in rectal cancer using high-resolution magnetic resonance imaging** Br J Surg 2003 Mar;90(3):355-64. doi: 10.1002/bjs.4034.
52. Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM) (2021,Ottobre) Linee guida Tumori del colon Edizione 2021

53. Guyot F, Faivre J, Manfredi S, Meny B, Bonithon-Kopp C, Bouvier A M. **Time trends in the treatment and survival of recurrences from colorectal cancer.** Ann Oncol 2005 May;16(5):756-61. doi: 10.1093/annonc/mdi151
54. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N. **Colorectal cancer.** The Lancet 2010, 375:1030-1047 doi: 10.1016/S0140-6736(10)60353-4
55. Benson AB 3rd, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, Krzyzanowska MK, Maroun J, McAllister P, Van Cutsem E, Brouwers M, Charette M, Haller DG. **American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer** J Clin Oncol 2004 Aug 15;22(16):3408-19. doi: 10.1200/JCO.2004.05.063.
56. Sobrero A. **Should adjuvant chemotherapy become standard treatment for patients with stage II colon cancer? For the proposal** Lancet Oncol 2006 Jun;7(6):515-6. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70727-6.
57. van Laarhoven HW, Henselmans I, de Haes JH. **To treat or not to treat: who should decide?** Oncologist 2014 Apr;19(4):433-6. doi: 10.1634/theoncologist.2013-0258
58. Andre T, Quinaux E, Louvet C, Colin P, Gamelin E, Bouche O, Achille E, Piedbois P, Tubiana-Mathieu N, Boutan-Laroze A, Flesch M, Lledo G, Raoul Y, Debrix I, Buyse M, de Gramont A. **Phase III study comparing a semimonthly with a monthly regimen of fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for stage II and III colon cancer patients: final results of GERCOR C961.** J Clin Oncol 2007 Aug 20;25(24):3732-8. doi: 10.1200/JCO.2007.12.2234.
59. Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, Jones J, Wieand S, Wickerham DL, Bear HD, Atkins JN, Dimitrov NV, Glass AG, Fisher ER, Fisher B. **Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04.** J Clin Oncol 1999 Nov;17(11):3553-9. doi: 10.1200/JCO.1999.17.11.3553.
60. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, et al. **Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer.** N Engl J Med. 2005 Jun 30;352(26):2696-704. doi: 10.1056/NEJMoa043116.
61. Ruzzo A, Graziano F, Galli F, et al. **Genetic markers for toxicity of adjuvant oxaliplatin and fluoropyrimidines in the phase III TOSCA trial in high-risk colon cancer patients.** Sci Rep 2014 Nov 5; 4:6828. doi: 10.1038/srep06828.
62. Cortejoso L, Lopez-Fernandez LA. **Pharmacogenetic markers of toxicity for chemotherapy in colorectal cancer patients.** Pharmacogenomics 2012;13(10):1173-91. doi: 10.2217/pgs.12.95.
63. 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. **The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers.** Nature 2012 Jun 28;486(7404):537-40. doi: 10.1038/nature11219
64. Aprile G, Macerelli M, Giuliani F. **Regorafenib for gastrointestinal malignancies: from preclinical data to clinical results of a novel multi-target inhibitor.** BioDrugs 2013 Jun;27(3):213-24. doi: 10.1007/s40259-013-0014-9.
65. 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, Taberero J, Aderka D, Barroso S, Bodoky G, Douillard JY, El Ghazaly H, Gallardo J, Garin A, Glynne-Jones R, Jordan K, Meshcheryakov A, Papamichail D, Pfeiffer P, Souglakos I, Turhal S, Cervantes A. **ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer a personalized approach to clinical decision making.** Ann Oncol 2012 Oct;23(10):2479-2516. doi: 10.1093/annonc/mds236.
66. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Robert H, Mass R, Perrou B, Nelson B, Novotny WF. **Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial.** J Clin Oncol 2005 Jun 1;23(16):3697-705. doi: 10.1200/JCO.2005.05.112.
67. Cunningham D, Lang I, Marcuello E, Lorusso V, Ocvirk J, Shin D B, Jonker D, Osborne S, Andre N, Waterkamp D, Saunders MP. **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.** Lancet Oncol 2013 Oct;14(11):1077-1085. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70154-2

68. 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. **Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer.** *N Engl J Med* 2004 Jul 22;351(4):337-45. doi: 10.1056/NEJMoa033025.
69. Douillard J Y, Oliner K S, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocákova I, Ruff P, Błasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon J L, Rother M, Williams R, Rong A, Wiezorek J, Sidhu R, Patterson S D. **Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer.** *The New England Journal of Medicine*, 2013 Sep 12;369(11):1023-1034 doi: 101056/NEJMoa1305275
70. Bardelli A, Siena S. **Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer.** *Journal of Clinical Oncology*, 2010 Mar 1;28(7):1254-61. doi: 101200/JCO2009246116
71. Lowy DR, Willumsen BM. **Function and regulation of ras** *Annual Review of Biochemistry*, 1993;62:851-91 doi: 101146/annurevbi62070193004223
72. Kopetz S, Desai J, Chan E, Hecht JR, O'Dwyer P J, Maru D, Morris V, Janku F, Dasari A, Chung W, Issa JP, Gibbs P, James B, Powis G, Nolop K B, Bhattacharya S, Saltz L. **Phase II pilot study of vemurafenib in patients with metastatic BRAF-mutated colorectal cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 2015 Dec 1;33(34):4032-8. doi: 101200/JCO2015632497
73. Pietrantonio F, Petrelli F, Coiu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, Cabiddu M, Iacovelli R, Bossi I, Lonati V, Ghilardi M, de Braud F, Barni S. **Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis.** *European Journal of Cancer*, 2015 Mar;51(5):587-94. doi: 101016/jejca201501054
74. 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. **Encorafenib, binimetinib, and cetuximab in BRAF V600E-mutated colorectal cancer.** *The New England Journal of Medicine*, 2019 Oct 24;381(17):1632-1643 doi: 101056/NEJMoa1908075
75. Popat S, Hubner R, Houlston RS. **Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis.** *Journal of Clinical Oncology*, 2005 Jan 20;23(3):609-18. doi: 101200/JCO200501086
76. Overman M, Lonardi S, Wong K, Lenz H, Gelsomino F, Aglietta M, Morse M, Van Cutsem E, McDermott R, Hill A, Sawyer M B, Hendlisz A, Neyns B, Svrcek M, Moss R A, Ledezine J M, Cao Z A, Kamble S, Kopetz S, André T. **Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer.** *Journal of Clinical Oncology*, 2018 Mar 10;36(8):773-779. doi: 101200/JCO2017769901
77. Andre T, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C JA, Smith DM, Garcia-Carbonero R, Benavides M, Gibbs P, De La Fouchardiere C, Rivera F, Elez E, Bendell JC, Le DT, Yoshino T, Yang P, Farooqui M ZH, Marinello P, Diaz LA. **Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high/mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer: the phase 3 KEYNOTE-177 study.** *Journal of Clinical Oncology*, 2020; 38(18_suppl): LBA4 doi: 101200/JCO20203818_supplLBA4
78. 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 AM, Stadler ZK, Hyman DM, Benayed R, Ladanyi M, Hechtman JF. **Colorectal carcinomas containing hypermethylated MLH1 promoter and wild-type BRAF/KRAS are enriched for targetable kinase fusions.** *Cancer Research*, 2019 Mar 15;79(6):1047-1053. doi: 101158/0008-5472.CAN-18-3126
79. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. **Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia.** *Cancer Res* 1999 Feb 15;59(4):793-7
80. Heyn H, Esteller M. **DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges.** *Nat Rev Genet* 2012 Oct;13(10):679-92. doi: 10.1038/nrg3270

81. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, et al. **Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis.** *Cancer Res* 2000 May 1;60(9):2368-71.
82. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Sotti G, Frezza G, Amista P, Morandi L, Spagnolli F, Ermani M. **Recurrence pattern after temozolomide concomitant with and adjuvant to radiotherapy in newly diagnosed patients with glioblastoma: correlation with MGMT promoter methylation status.** *J Clin Oncol.* 2009 Mar 10;27(8):1275-9. doi: 10.1200/JCO.2008.19.4969.
83. Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, et al. **CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas.** *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 1;10(15):4933-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0392.
84. Malek M, Kielkowska A, Chessa T, Anderson KE, Barneda D, Pir P, Nakanishi H, Eguchi S, Koizumi A, Sasaki J, Juvin V, Kiselev VY, Niewczasz 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. **PTEN regulates PI(3,4)P₂ signaling downstream of Class I PI3K.** *Mol Cell.* 2017 Nov 2;68(3):566-580.e10. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.024
85. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, Kopetz SE, Lieu C, Lindor N M, Minsky B D, Monzon F A, Sargent D J, Singh V M, Willis J, Clark J, Colasacco C, Rumble RB, Temple-Smolkin R, Ventura CB, Nowak JA. **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,* 2017 May 1;35(13):1453-1486. doi: 10.1200/JCO2016719807
86. Luthra R, Chen H, Roy-Chowdhuri S, Singh RR. **Next generation sequencing in clinical molecular diagnostics of cancer: advantages and challenges.** *Cancers (Basel),* 2015 Oct 14;7(4):2023-36. doi: 10.3390/cancers7040874.
87. Li M, Dong G, Zhang W, Ren X, Jiang H, Yang C, Zhao X, Zhu Q, Li M, Chen H, Yu K, Cui Y, Song L. **Combining MGMT promoter pyrosequencing and protein expression to optimize prognosis stratification in glioblastoma.** *Cancer Sci* 2021 Sep;112(9):3699-3710. doi: 10.1111/cas.15024
88. Estival A, Sanz C, Ramirez JL, Velarde JM, Domenech M, Carrato C, de las Peñas R, Gil-Gil M, Sepúlveda J, Armengol R, Cardiel I, Berrocal A, Luque R, Herrero A, Balana C. **Pyrosequencing versus methylation-specific PCR for assessment of MGMT methylation in tumor and blood samples of glioblastoma patients.** *Sci Rep* 2019 Jul 31;9(1):11125. doi: 10.1038/s41598-019-47642-2
89. Normanno N, Cervantes A, Ciardiello F, De Luca A, Pinto C. **The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: current applications and future scenarios.** *Cancer Treatment Reviews,* 2018 Nov;70:1-8. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.07.007
90. 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 RB, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Siena S, Sartore-Bianchi A, Bardelli A. **Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients.** *Nature Medicine,* 2015 Jul;21(7):827. doi: 10.1038/nm3870
91. Morano F, Raimondi A, Pagani F, Lonardi S, Lisa Salvatore, Cremolini C, Murgioni S, Randon G, Palermo F, Antonuzzo L, Pella N, Racca P, Prisciandaro M, Nigam M, Corti F, Bergamo F, Zaniboni A, Ratti M, Palazzo M, Celeste Cagnazzo C, Calegari MA, Marmorino F, Capone I, Conca E, Busico A, Bricchi S, Tamborini E, Perrone F, Di Maio M, Milione M, Di Bartolomeo M, de Braud F, Pietrantonio F. **Temozolomide Followed by Combination With Low-Dose Ipilimumab and Nivolumab in Patients With Microsatellite-Stable, O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase-Silenced Metastatic Colorectal Cancer: The MAYA Trial** *J Clin Oncol* 2022 May 10;40(14):1562-1573 doi: 10.1200/JCO2102583
92. Amatu, A, Sartore-Bianchi A, Moutinho C, Belotti A, Bencardino K, Chirico G, Cassingena A, Rusconi F, Esposito A, Nichelatti M, Esteller M, Siena S. **Promoter CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme MGMT predicts clinical response to dacarbazine in a phase II study for metastatic colorectal cancer.** *Clin Cancer Res,* 2013 19(8): p 2265-72 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3518.
93. Calegari MA, Inno A, Monterisi S, Orlandi A, Santini D, Basso M, Cassano A, Martini M, Cenci T, De Pascalis I, Camarda F, Barbaro B, Larocca LM, Gori S, Tonini G, Barone C. **A phase 2 study of temozolomide**

- in pretreated metastatic colorectal cancer with MGMT promoter methylation* Br J Cancer, 2017 May 9; **116**(10): p 1279-1286. doi: 10.1038/bjc.2017.109.
94. Cahill, DP, et al. **Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment.** Clin Cancer Res, 2007 13(7): p 2038-45. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2149.
 95. Hunter, C, et al, **A hypermutation phenotype and somatic MSH6 mutations in recurrent human malignant gliomas after alkylator chemotherapy** Cancer Res 2006 Apr 15;66(8):3987-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0127.
 96. Moretto R, Rossini D, Capone I, Boccaccino A, Perrone F, Tamborini E, Masi G, Antoniotti C, Mormorino F, Conca V, Borelli B, Martignetti A, Pecora I, Simionato F, Cupini S, Ambrosini M, Manca P, Pietrantonio F, Falcone A, Cremolini C. **Rationale and Study Design of the PARERE Trial: Randomized phase II Study of Panitumumab Re-Treatment Followed by Regorafenib Versus the Reverse Sequence in RAS and BRAF Wild-Type Chemo-Refractory Metastatic Colorectal Cancer Patients** Clin Colorectal Cancer 2021 Dec;20(4):314-317 doi: 101016/jclcc202107001
 97. Shitara K, Yamanaka T, Denda T, et al. **REVERCE: a randomized phase II study of regorafenib followed by cetuximab versus the reverse sequence for previously treated metastatic colorectal cancer patients.** Ann Oncol 2019;30(2):259-265 doi:101093/annonc/mdy526
 98. Johannessen LE, Brandal P, Myklebust TA, Heim S, Micci F, Panagopoulos I. **Gene Promoter Methylation Status - Assessment of Two Pyrosequencing Kits and Three Methylation-specific PCR Methods for their Predictive Capacity in Glioblastomas** Cancer Genomics Proteomics, 2018 **15**(6): p 437-446. doi: 10.21873/cgp.20102.
 99. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan, D, Leroy, K, Seruca R, Iacopetta B, Hamelin R. **Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR** .Gastroenterology, 2002 123(6): p 1804-11. doi: 10.1053/gast.2002.37070.
 100. Pietrantonio F, Perrone F, de Braud F, Castano A, Maggi C, Bossi I, Gevorgyan A, Biondani P, Pacifici M, Busico A, Gariboldi M, Festinese F, Tamborini E, Di Bartolomeo M. **Activity of temozolomide in patients with advanced chemorefractory colorectal cancer and MGMT promoter methylation.** Ann Oncol. 2014 Feb;25(2):404-8. doi: 10.1093/annonc/mdt547.
 101. Pietrantonio F, de Braud F, Milione M, et al. **Dose-dense temozolomide in patients with MGMT-silenced chemorefractory colorectal cancer.** Target Oncol. 2016 Jun;11(3):337-43. doi: 10.1007/s11523-015-0397-2.
 102. Sartore-Bianchi A, Pietrantonio F, Amatu A, et al. **Digital PCR assessment of MGMT promoter methylation coupled with reduced protein expression optimises prediction of response to alkylating agents in metastatic colorectal cancer patients.** Eur J Cancer 2017 Jan; 71:43-50. doi: 10.1016/j.ejca.2016.10.032.
 103. Marmorino F, Boccaccino A, Germani MM, Falcone A, Cremolini C. **Immune Checkpoint Inhibitors in pMMR Metastatic Colorectal Cancer: A Tough Challenge,** Cancers 2020, 12(8), 2317. doi: 10.3390/cancers12082317.
 104. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz H-J, Gelsomino F, Aglietta M, Morse MA, Van Cutsem E, McDermott R, Hill A, et al. **Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair—Deficient/microsatellite instability—High metastatic colorectal cancer.** JCO 2018 Mar 10;36(8):773-779. doi: 10.1200/JCO.2017.76.9901.
 105. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M, Morse M, Van Cutsem E, McDermott RS, Hill AG, et al. **Nivolumab (NIVO) + low-dose ipilimumab (IPI) in previously treated patients (pts) with microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient (MSI-H/dMMR) metastatic colorectal cancer (mCRC): Long-term follow-up** JCO 2019, 37, 635. Doi: 10.1200/JCO.2019.37.4_suppl.63.
 106. Morano F, Corallo S, Niger M, Barault L, Milione M, Berenato R, Moretto R, Randon G, Antista M, Belfiore A, Raimondi A, Nichetti F, Martinetti A, Battaglia L, Perrone F, Pruneri G, Falcone A, Di Bartolomeo M, de Braud F, Di Nicolantonio F, Cremolini C, Pietrantonio F. **Temozolomide and irinotecan (TEMIRI regimen) as salvage treatment of irinotecan-sensitive advanced colorectal cancer patients bearing MGMT methylation** Ann Oncol 2018 Aug 1;29(8):1800-1806. doi: 10.1093/annonc/mdy197.

107. Klemptner, SJ, et al. **Exploiting Temozolomide-Induced Hypermutation With Pembrolizumab in a Refractory High-Grade Neuroendocrine Neoplasm: A Proof-of-Concept Case.** JCO Precision Oncology, 2020(4): 614-619. doi: 10.1200/PO.20.00034.
108. Jacques, FH, Nicholas G, Lorimer IAJ, et al. **Avelumab in newly diagnosed glioblastoma.** Neurooncol Adv 2021 Aug 25;3(1):vdab118. doi: 10.1093/oaajnl/vdab118.
109. Reardon, DA, et al. **Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial.** JAMA Oncol 2020 Jul 1;6(7):1003-1010. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.1024.
110. Lenz, H, et al, **Nivolumab plus low-dose ipilimumab as first-line therapy in microsatellite instability-high/DNA mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer: Clinical update.** DOI: 101200/JCO2020384_suppl11 Journal of Clinical Oncology 38, no 4_suppl (February 01, 2020) 11-11
111. Khan, KH, Cunningham D, Werner B, Vlachogiannis G. et al. **Longitudinal Liquid Biopsy and Mathematical Modeling of Clonal Evolution Forecast Time to Treatment Failure in the PROSPECT-C Phase II Colorectal Cancer Clinical Trial.** Cancer Discov 2018 Oct;8(10):1270-1285. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0891.
112. Santini D, Vincenzi B, Addeo R et al. **Cetuximab rechallenge in metastatic colorectal cancer patients: how to come away from acquired resistance?** Ann Oncol 2012 Sep;23(9):2313-2318. doi: 10.1093/annonc/mdr623.
113. Arena S, Bellosillo B, Siravegna G et al. **Emergence of Multiple EGFR Extracellular Mutations during Cetuximab Treatment in Colorectal Cancer.** Clin Cancer Res 2015 May 1;21(9):2157-66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2821.
114. Cremolini C, Rossini D, Dell'Aquila E et al. **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 Oncol 2019 Mar 1;5(3):343-350. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.5080.
115. Fransén K, Klintonäs M, Österström A, Dimberg J, Monstein HJ, Söderkvist P. **Mutation analysis of the BRAF , ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas** Carcinogenesis 2004 Apr;25(4):527-33. doi: 10.1093/carcin/bgh049.
116. Okayama N, Nishioka M, Hazama S, Sakai K, Suehiro Y, Maekawa M, Sakamoto JI, Iwamoto S, Kato T, Mishima H **The Importance of Evaluation of DNA Amplifiability in KRAS Mutation Testing with Dideoxy Sequencing using Formalin-fixed and Paraffin-embedded Colorectal Cancer Tissues.** Jpn J Clin Oncol 2011 Feb;41(2):165-71.doi: 10.1093/jjco/hyq173.
117. Korphaisarn K, Morris VK, Overman MJ, Fogelman DR, Kee BK, Singh RKP, Manuel S, Shureiqi I, Wolff RA, Eng C, Menter D, Hamilton SR, Kopetz S, and Dasari A. **FBXW7 missense mutation: a novel negative prognostic factor in metastatic colorectal adenocarcinoma.** Oncotarget. 2017 Jun 13;8(24): 39268-39279.doi: 10.18632/oncotarget.16848.
118. Siraj S , Masoodi T, Siraj AK, Azam S, Qadri Z, Ahmed SO, AlBalawy WN, Al-Obaisi KA, Parvathareddy SK, AlManea HM, AlHussaini HF, Abduljabbar A, Alhomoud S, Al-Dayel FH, Alkuraya FS, Al-Kuraya KS.**Clonal Evolution and Timing of Metastatic Colorectal Cancer.** Cancers (Basel) 2020 Oct 12;12(10):2938 doi: 103390/cancers12102938
119. Arena S, Bellosillo B, Siravegna G, Martínez A, Cañadas I, Ferruz N, Misale S, Russo M, González I, Iglesias M, Gavilan E, Corti G, Hobor S, Crisafulli G, Salido M, Sánchez J, Dalmases A, Bellmunt J, De Fabritiis G, Rovira A, Di Nicolantonio F, Joan Albanell J, Bardelli A, Montagut C. **Emergence of Multiple EGFR Extracellular Mutations during Cetuximab Treatment in Colorectal Cancer.** Clin Cancer Res 2015 May 1;21(9):2157-66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2821.