



Università di Pisa

Laurea Magistrale in Biologia Applicata alla Biomedicina
Curriculum Fisiopatologico

Tesi di Laurea Magistrale

Monitoraggio dinamico delle mutazioni nel DNA tumorale circolante di
pazienti affetti da neoplasia polmonare in terapia con target therapy

Candidata

Relatore

Eleonora Rofi

Chiar.mo Prof. Romano Danesi

Anno Accademico 2014/2015

INDICE

RIASSUNTO	Pag.1
INTRODUZIONE	Pag.4
EZIOPATOGENESI	Pag.7
- Fattori esogeni	Pag.7
- Fattori endogeni	Pag.9
PATOGENESI	Pag.11
CLASSIFICAZIONE ISTOPATOLOGICA	Pag.15
L'ETEROGENEITÀ GENOMICA DEL TUMORE POLMONARE	Pag.18
LE TECNICHE DI RILEVAZIONE DELLE ALTERAZIONI GENETICHE NEI TUMORI	Pag.20
- La biopsia	Pag.20
- Il DNA tumorale circolante	Pag.22
<i>Il rilascio del DNA tumorale circolante</i>	Pag.23
<i>Quantificazione del DNA tumorale circolante</i>	Pag.23
<i>Siero o plasma per l'isolamento del DNA tumorale circolante?</i>	Pag.25
<i>Vantaggi nell'analisi del DNA tumorale circolante</i>	Pag.26
<i>Limiti del DNA tumorale circolante</i>	Pag.27

<i>Applicazioni cliniche del DNA tumorale circolante</i>	Pag.28
LE MUTAZIONI GENETICHE NELL'NSCLC	Pag.31
- Fattori di trascrizione	Pag.32
<i>MYC</i>	Pag.32
- Recettori tirosin chinasi	Pag.33
<i>MET</i>	Pag.33
<i>RET</i>	Pag.34
<i>ROS1</i>	Pag.34
<i>HER2 (ERBB2)</i>	Pag.35
<i>EGFR (ERBB1)</i>	Pag.36
<i>ALK</i>	Pag.36
- Soppressori tumorali	Pag.38
<i>RB</i>	Pag.38
<i>p53</i>	Pag.39
<i>P16^{INK4A}</i>	Pag.40
<i>LKB1</i>	Pag.40
<i>PTEN</i>	Pag.41
- Meccanismi di trasduzione del segnale	Pag.42
<i>KRAS</i>	Pag.42
<i>BRAF</i>	Pag.42
<i>PIK3CA</i>	Pag.43

EGFR: RECETTORE TIROSINA CHINASI PER IL FATTORE DI CRESCITA DELL'EPIDERMIDE	Pag.44
KRAS: PICCOLA GTPasi MONOMERICA	Pag.49
LE MUTAZIONI DI EGFR SENSIBILI ALLA TERAPIA MIRATA	Pag.53
LE MUTAZIONI DI KRAS COME ULTERIORE MECCANISMO DI RESISTENZA ALLA TERAPIA MIRATA	Pag.56
TRATTAMENTI DI "NUOVA GENERAZIONE "	Pag.57
SCOPO DELLA TESI	Pag.66
MATERIALI E METODI	Pag.67
Pazienti	Pag.67
Raccolta e conservazione dei campioni	Pag.67
Trattamento dei campioni	Pag.68
Estrazione del DNA tumorale circolante	Pag.68
Analisi del DNA tumorale circolante	Pag.71
Droplet generator	Pag.72
Droplet reader	Pag.75
RISULTATI	Pag.78
Studio retrospettivo: validazione del metodo	Pag.78

Studio prospettico: monitoraggio dinamico delle mutazioni nel ctDNA	Pag.83
DISCUSSIONE	Pag.98
CONCLUSIONI	Pag.104
BIBLIOGRAFIA	Pag.110

RIASSUNTO

Tumori caratterizzati dalla stessa istologia possono avere diversa prognosi e diversa risposta al trattamento, a dimostrazione del fatto che sono malattie eterogenee e multifattoriali. Tramite selezione clonale il tumore favorisce la proliferazione delle cellule recanti le alterazioni genetiche utili la sua crescita e sviluppo, inducendo invece apoptosi in coloro che non le hanno.

Attualmente, nella pratica clinica la valutazione delle alterazioni molecolari suscettibili di terapia target e le resistenze ai trattamenti farmacologici avviene tramite biopsia. Tuttavia, tale tecnica presenta degli svantaggi, in quanto non sempre è praticabile, è invasiva, può causare l'accidentale migrazione di cellule tumorali dal sito primario in circolo, la conservazione del campione può degradare il DNA da analizzare, ma soprattutto non è in grado di cogliere l'eterogeneità del tumore.

A tal riguardo, un metodo alternativo alle ripetute biopsie è rappresentato dalla rilevazione del DNA tumorale circolante (ctDNA) che può essere isolato nel siero o nel plasma dei pazienti affetti da neoplasia ed i cui livelli risultano essere più alti rispetto a quelli rilevati nei soggetti sani. Il ctDNA verrebbe rilasciato in seguito a fenomeno di necrosi, apoptosi e secrezione e viene distinto dalla controparte normale per la presenza di mutazioni e alterazioni genetiche tipiche delle cellule cancerose o pre-cancerose e che non sono evidenziabili nel DNA derivante da cellule sane. Pertanto, l'analisi del ctDNA rappresenta ciò che viene definita "biopsia liquida", ossia una metodica utile per la caratterizzazione molecolare delle cellule cancerose e per l'identificazione di aberrazioni molecolari specifiche della neoplasia, con il

vantaggio, rispetto ad una biopsia classica, di una ridotta invasività. Inoltre, la biopsia liquida può risultare utile nella definizione di meccanismi di resistenza a farmaci biologici per specifici target molecolari, permettendo, durante il trattamento, il monitoraggio dell'insorgenza di cloni selezionati dalla pressione selettiva del farmaco.

Attualmente, il carcinoma polmonare rappresenta nel mondo la prima causa di morte per cancro. Numerosi studi di biologia cellulare e molecolare hanno permesso di stabilire che il processo di cancerogenesi polmonare è multifasico ed evolve in seguito all'accumulo di lesioni genetiche somatiche multiple (10-20 diverse mutazioni) e sequenziali. Dal punto di vista istologico, circa l'85% dei casi di carcinoma polmonare è del tipo non a piccole cellule (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC). La valutazione delle mutazioni "attivanti" che interessano il gene codificante per il recettore del fattore di crescita epiteliale (EGFR) e la traslocazione del gene che codifica per la chinasi del linfoma anaplastico (ALK), ha permesso di stratificare un sottogruppo di pazienti affetti da NSCLC, caratterizzati da un comportamento biologico peculiare della patologia e per i quali sono disponibili farmaci a target therapy in grado di bloccare la specifica alterazione individuata. In particolare, tali pazienti sono candidati a ricevere un trattamento con farmaci inibitori tirosin chinasi (TKIs), quali erlotinib, gefitinib e afatinib quando EGFR+ e crizotinib quando ALK+. Tuttavia, è stato osservato che nell'arco di 10-12 mesi, la neoplasia è in grado di sviluppare resistenza al trattamento farmacologico. Tale evento sarebbe da ascrivere all'insorgenza, sotto la pressione selettiva dei TKIs, di cloni caratterizzati da

aberrazioni genomiche che conferiscono alle cellule neoplastiche la capacità di proliferare e sopravvivere nonostante la presenza del farmaco.

Sulla base di queste evidenze, scopo del presente studio è di analizzare l'andamento nel tempo delle alterazioni molecolari attivanti e della comparsa di mutazioni secondarie responsabili di resistenza in pazienti con neoplasia polmonare in trattamento con target therapy, al fine di ottimizzare il trattamento antineoplastico. A tal riguardo, l'analisi del ctDNA isolato dal plasma di pazienti affetti da NSCLC verrà condotta con sistema droplet digital PCR™ QX100™ (ddPCR), che permetterà un'analisi estremamente sensibile e precisa degli acidi nucleici, consentendo la rilevazione di alleli mutati che differiscono per un singolo nucleotide e l'analisi di espressione genica.

INTRODUZIONE

Il tumore del polmone rappresenta la principale causa di morte per patologia neoplastica nel mondo. In Italia, il cancro del polmone rappresenta la terza neoplasia più diffusa dopo quella del colon-retto e della mammella, seguita da quella della prostata¹. Il previsto invecchiamento della popolazione italiana e il conseguente aumento della prevalenza di soggetti in fasce di età più avanzata e più a rischio di sviluppare neoplasie comporterà un aumento di nuove diagnosi di tumori del polmone¹.

Nel periodo compreso tra il 1970 e il 2015, l'incidenza e la mortalità per il tumore del polmone stimate nel nostro Paese mostrano un andamento nettamente differenziato per genere (FIGURA 1)².

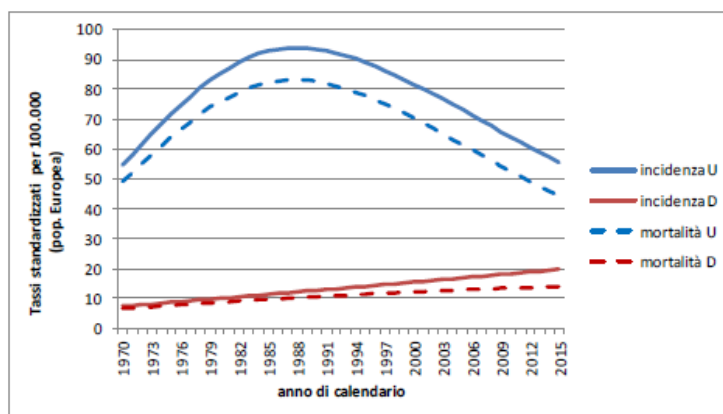


Figura 1. Stime di incidenza e mortalità per tumore al polmone in Italia nella popolazione maschile e femminile. Dati Standardizzati per 100000 persone/anno. (*I tumori in Italia*, <http://www.tumori.net>)

Negli uomini si evidenzia, infatti, una forte riduzione sia dell'incidenza (da 83 a 45 per 100.000 persone/anno) sia della mortalità (da 94 a 56 per 100.000 persone/anno) (FIGURA 2A). Nelle donne, invece, questi dati sono in costante aumento, con un incremento annuale del 2% per l'incidenza e dell'1% per la mortalità (FIGURA 2B)². Queste tendenze illustrano chiaramente gli andamenti correlati al principale fattore di rischio, cioè il fumo di sigaretta, con una forte riduzione del numero di fumatori e un netto incremento del numero di fumatrici². Il picco di incidenza di questa patologia si osserva tra la 6^a e la 7^a decade di vita e oltre 1/3 dei casi è diagnosticato in soggetti di età superiore a 70 anni (FIGURA 2A e 2B), dato compatibile con i lunghi tempi di latenza (20 anni) tra esposizione al fattore di rischio (fumo di sigaretta) e insorgenza del tumore e con il fatto che il rischio di ammalarsi aumenta con la durata dell'abitudine al fumo. Raro è invece il riscontro nei bambini e negli adolescenti con un'incidenza dell'1% al di sotto dei 30 anni².

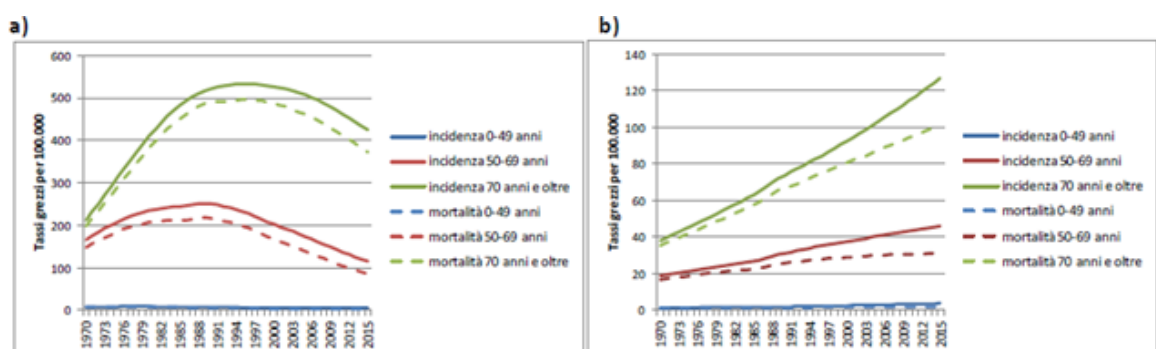


Figura 2. Stime di incidenza e mortalità per tumore al polmone in Italia per classe di età negli uomini (a) e nelle donne (b). Tassi grezzi per 100000 persone/anno. (*I tumori in Italia*, <http://www.tumori.net>)

Attualmente, la prognosi per i soggetti affetti da tumore polmonare risulta sfavorevole, con un tasso di sopravvivenza a cinque anni che non eccede il 15%. Questa scarsa probabilità di sopravvivenza è in parte attribuibile ai metodi relativamente inefficaci per la diagnosi precoce della malattia e in parte alla carenza di trattamenti adeguati per la gestione terapeutica della patologia nel suo stadio avanzato³.

EZIOPATOGENESI

Per quanto riguarda l'eziopatogenesi del carcinoma polmonare, sono stati identificati fattori esogeni ed endogeni, che si ritiene siano i responsabili delle alterazioni a carico del DNA cellulare e, quindi, della rapida ed incontrollata proliferazione della cellula mutata, con conseguente sviluppo della neoplasia⁴.

Fattori esogeni

Il **fumo di tabacco** costituisce la causa predominante, essendo responsabile dell'85-90% dei nuovi casi di carcinoma polmonare. La relazione causale tra fumo e comparsa di neoplasia bronchiale si esprime con un ben definito rapporto dose-effetto, dove il rischio di sviluppare il tumore aumenta progressivamente con il numero di sigarette fumate al giorno, il contenuto di catrame delle sigarette fumate e la durata dell'abitudine al fumo. Numerosi studi sperimentali e clinici, inoltre, sono concordi nell'affermare l'esistenza di una stretta correlazione tra fumo di sigaretta ed insorgenza di neoplasie polmonari^{5,6}. Ancora oggi, infatti, la cessazione dell'abitudine tabagica è considerata il più importante obiettivo da raggiungere per ciò che riguarda la prevenzione primaria del carcinoma polmonare, anche se per annullare il rischio oncologico sono necessari 10-15 anni di sospensione del fumo di sigaretta⁷. E' stato inoltre osservato che anche l'esposizione passiva al fumo di sigaretta si associa ad un incremento del rischio di sviluppare un carcinoma polmonare⁴.

Per quanto riguarda l'**esposizione professionale** ad agenti cancerogeni, si stima mediamente che le neoplasie polmonari di origine lavorativa costituiscano il 10-15% del totale⁴. In particolare, l'esposizione occupazionale chiama in causa un'ampia serie di composti (sperimentalmente cancerogeni), alcuni ritenuti direttamente responsabili di azione cancerogena sull'apparato respiratorio (ad es., asbesto e radon), altri potenzialmente oncogeni specie se combinati con altri fattori (cromo, arsenico, nichel, ecc.). L'**asbesto** è un minerale estremamente diffuso in natura ed è un noto carcinogeno correlato ad un aumentato rischio di carcinoma polmonare, specialmente nei soggetti fumatori: numerosi studi in letteratura hanno, infatti, documentato la correlazione tra esposizione all'asbesto e neoplasia polmonare ed hanno evidenziato come questa sia connessa in parte alla durata dell'esposizione⁴.

Il **gas radon** è un altro composto frequentemente correlato al carcinoma polmonare: l'esposizione del gas radioattivo prodotto del suo decadimento, in casa, nei luoghi di lavoro, nelle scuole, sembra indurre un danno cellulare che aumenta il rischio di trasformazione maligna⁴.

E' stato inoltre osservato che anche alcuni **metalli**, possiedono un potere potenzialmente cancerogeno, quali l'arsenico nei minatori, nei fonditori e negli addetti alla produzione ed utilizzo dei pesticidi; il nichel usato nella produzione di acciaio inossidabile e di altre leghe metalliche; e il cromo utilizzato nei processi di cromatura e di platinatura, nella concia delle pelli e nella produzioni di vernici⁴.

Circa l'1-2% delle neoplasie polmonari sono ascrivibili all'**inquinamento atmosferico** ambientale, con la liberazione di 3.4-benzopirene (noto cancerogeno) e metalli (nichel, cromo)⁴. Nonostante non sia facile chiarire il rapporto tra inquinamento atmosferico e tumore polmonare, per la difficoltà di calcolare in maniera precisa l'esposizione a questi composti e, quindi, di effettuare studi epidemiologici corretti, l'incidenza e la mortalità per tale patologia risultano essere direttamente proporzionali al tasso di urbanizzazione ed industrializzazione⁷.

Una **dieta** equilibrata sembra, invece, svolgere un ruolo protettivo, riducendo il rischio di sviluppare neoplasie polmonari ed altri tipi di cancro. In particolare, la frutta e le verdure, fonti di sostanze ad azione antiossidante (vitamine A, E e C, acido folico, selenio), consentono l'eliminazione dei radicali liberi presenti nell'organismo, riducendo un danno cellulare irreversibile. Viceversa, cibi quali insaccati e fritti sono stati associati ad un aumentato rischio di carcinoma polmonare⁸.

Fattori endogeni

Negli ultimi anni diversi studi hanno messo in evidenza anche il ruolo della predisposizione genetica ed in particolare dei polimorfismi genici, quali fattori endogeni potenzialmente implicati nell'insorgenza di cancro polmonare, così come quelli legati a pregresse patologie polmonari¹.

I **fattori genetici** sono individuo-specifici. Infatti, potenzialmente solo alcuni soggetti svilupperanno una neoplasia polmonare a parità di esposizione ad alcuni fattori esogeni, come il fumo di tabacco e i cancerogeni professionali sopra citati.

Inoltre, una storia familiare di cancro al polmone aumenta il rischio di sviluppare questa malattia, in particolare nei non fumatori⁴. Gli enzimi associati al sistema del citocromo P450 e la glutatione-S-transferasi (GSTs) sono tra gli enzimi metabolici maggiormente rappresentativi per le sostanze cancerogene del tabacco, in quanto i loro polimorfismi sono stati ampiamente investigati e associati ad un aumentato rischio di carcinoma polmonare⁹.

Alcune **patologie polmonari non maligne**, pregresse o coesistenti, quali la fibrosi polmonare interstiziale diffusa e la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), possono concorrere nel determinare una maggiore predisposizione allo sviluppo di un tumore polmonare. Per quanto riguarda la fibrosi polmonare interstiziale diffusa, la più alta attività proliferativa delle aree di metaplasia e iperplasia focale, associata alle aree di fibrosi, è stata correlata ad un aumento del rischio di sviluppo del tumore del polmone. Per quanto riguarda la BPCO, invece, la causa dell'incremento del rischio si associa alla presenza di stress ossidativo cronico che colpisce le pareti delle vie aeree in corso di tale patologia⁴.

PATOGENESI

Lo sviluppo clinico del cancro al polmone richiede alcuni anni, durante i quali si verificano gli eventi patogeni propri del processo di cancerogenesi. La patogenesi del cancro del polmone risulta particolarmente complessa e si realizza in quattro stadi successivi:

1. Iniziazione, durante la quale il genoma della cellula, in seguito all'esposizione ad agenti cancerogeni, acquisisce determinate mutazioni, che spesso non corrispondono a cambiamenti fenotipicamente evidenti.
2. Promozione, nel corso della quale le cellule trasformate, se esposte a determinati stimoli (es. proliferazione), rilevano i caratteri acquisiti durante la fase di iniziazione.
3. Conversione, con la cellula mutata che migra nel torrente circolatorio ematico e linfatico allontanandosi dal tessuto di origine.
4. Progressione, quando la cellula mutata si stabilisce in tessuti ed organi lontani da quello di origine (processo metastatico), proliferando al loro interno e modificandone in maniera irreversibile le strutture.

Generalmente, i geni coinvolti, quando mutati, nel processo di cancerogenesi sono implicati nella regolazione della crescita cellulare e vengono classificati in: proto-oncogeni, implicati nella proliferazione, nella differenziazione e nella sopravvivenza cellulare; onco-soppressori, che intervengono per rallentare la divisione cellulare; geni regolatori dell'apoptosi. I proto-oncogeni si comportano da

geni "dominanti" in quanto è sufficiente la mutazione di un solo allele perché il prodotto alterato esplichi eccessivamente la sua funzione (modificazione qualitativa). Inoltre, in caso di amplificazione genica, la modificazione della funzione è di tipo quantitativo, in quanto legata all'eccessiva codificazione di un prodotto strutturalmente immutato in confronto al normale. Invece, gli onco-soppressori si comportano da geni "recessivi" e contribuiscono alla cancerogenesi solo quando la perdita di funzione si presenta in condizione di omozigosi, ossia con coinvolgimento delle due copie del gene. Pertanto, i soggetti che fin dalla nascita presentano una mutazione in uno dei due alleli di un gene onco-soppressore hanno una probabilità più alta di sviluppare un tumore rispetto alla popolazione generale)¹⁰.

I geni che regolano l'apoptosi possono comportarsi sia come i proto-oncogeni sia come gli onco-soppressori. In tale classificazione, è necessario includere anche una quarta categoria di geni, ossia quelli coinvolti nella regolazione del processo di riparazione del DNA. Essi influenzano in maniera indiretta la proliferazione e la morte delle cellule, in quanto determinano la capacità dell'organismo di riparare i danni non letali a carico di altri geni, tra cui i proto-oncogeni, gli onco-soppressori e i geni che regolano l'apoptosi¹⁰.

I meccanismi alla base della sintesi di prodotti genici alterati possono essere diversi, ma i più comuni sono le mutazioni geniche (sostituzione, delezione e inserzione) e le mutazioni di struttura dei cromosomi (traslocazione, delezione, inserzione e duplicazione)¹⁰. Gli oncogeni dominanti spesso presi in causa nei tumori dei polmoni sono *C-Myc* (codificante per un fattore di trascrizione che regola

l'espressione di vari geni implicati nella regolazione del ciclo cellulare), *KRAS* (codificante per una GTPasi implicata nel reclutamento e nell'attivazione di una serie di proteine coinvolte nella propagazione del segnale per la proliferazione o il differenziamento cellulare, trasmesso da recettori per i fattori di crescita), *EGFR* e *HER-2/neu* (codificanti per recettori di membrana della famiglia dei fattori di crescita per l'epidermide – EGF family), *ALK* (codificante per un recettore appartenente alla famiglia dei recettori chinasi insulino-simili), *IRK* (implicato nell'attivazione di meccanismi differenti implicati nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare)¹¹. Tra gli onco-soppressori, invece, più solitamente deleti o inattivati ci sono *p53* (codificante per un fattore di trascrizione implicato nell'espressione di geni che regolano il ciclo cellulare e riparano i danni al DNA), *RB* (codificante per una proteina che nel suo stato attivo inibisce la crescita delle cellule), *p16^{INK4a}* (codificante per una proteina inibente la replicazione cellulare)¹¹.

Tra le alterazioni genetiche sopra elencate, le mutazioni di p53 sono comuni ai tumori polmonari a piccole cellule e ai tumori polmonari non a piccole cellule; mentre RB e p16^{INK4a}, in modo mutualmente esclusivo, sono rispettivamente e specificamente inattivi nei tumori polmonari a piccole cellule e nei tumori polmonari non a piccole cellule. Le alterazioni in C-Myc risultano essere più frequenti nei tumori polmonari a piccole cellule, mentre i tumori non a piccole cellule sono associati alle mutazioni in *KRAS*, *EGFR* e *ALK*. È ormai noto che *KRAS*, *EGFR* e *ALK* siano mutati in maniera mutualmente esclusiva nei tumori polmonari non a piccole cellule (TABELLA I)⁹.

Tabella I. Alterazioni geniche specifiche del NSCLC e del SCLC (Modificata da: Herbst, Heymach, Lippman. Lung cancer. N Engl J Med. 2008)

Specifiche alterazioni genetiche nel NSCLC e nel SCLC			
Alterazioni	NSCLC		SCLC
	Carcinoma spino cellulare	Adenocarcinoma	
Precursore			
Lesione	Conosciuta (displasia)	Probabile (iperplasia adenomatosa atipica)	Possibile (neuroendocrina)
Cambiamento genetico	Mutazione <i>p53</i>	Mutazione <i>KRAS</i> (iperplasia adenomatosa atipica nei fumatori), mutazioni EGFR (nei non fumatori)	Over-espressione di <i>c-MET</i>
Cancro			
Mutazione <i>KRAS</i>	Molto rara	10-30%†	Molto rara
Mutazione <i>BRAF</i>	3%	2%	Molto rara
<i>EGFR</i>			
Mutazione dominio chinamico	Molto rara	10-40%	Molto rara
Amplificazione	30%	15%	Molto rara
Mutazione variante III	5%	Molto rara	Molto rara
<i>HER2</i>			
Mutazione dominio chinamico	Molto rara	4%	Molto rara
Amplificazione	2%	6%	Non conosciuta
<i>Fusione ALK</i>	Molto rara	7%	Non conosciuta
<i>MET</i>			
Mutazione	12%	14%	13%
Amplificazione	21%	20%	Non conosciuta
<i>Amplificazione TTF-1</i>	15%	15%	Molto rara
<i>Mutazione p53</i>	60-70%	50-70%	75%
<i>Mutazione LKB1</i>	19%	34%	Molto rara
<i>PIK3CA</i>			
Mutazione	2%	2%	Molto rara
Amplificazione	33%	6%	4%

CLASSIFICAZIONE ISTOPATOLOGICA

I tumori del polmone vengono classificati da un punto di vista istopatologico secondo i criteri proposti dalla World Health Organization (WHO) (TABELLA II).

Tabella II: Classificazione dei tumori polmonari secondo la World Health Organization (WHO)

Histologic Type and Subtypes	ICDO Code	Histologic Type and Subtypes	ICDO Code
Epithelial tumors		Papillomas	
Adenocarcinoma	8140/3	Squamous cell papilloma	8052/0
Lepidic adenocarcinoma ^a	8250/3 ^a	Exophytic	8052/0
Acinar adenocarcinoma	8551/3 ^a	Inverted	8053/0
Papillary adenocarcinoma	8260/3	Glandular papilloma	8260/0
Micropapillary adenocarcinoma ^a	8265/3	Mixed squamous and glandular papilloma	8560/0
Solid adenocarcinoma	8230/3	Adenomas	
Invasive mucinous adenocarcinoma ^a	8253/3 ^a	Sclerosing pneumocytoma ^a	8832/0
Mixed invasive mucinous and nonmucinous adenocarcinoma	8254/3 ^a	Alveolar adenoma	8251/0
Colloid adenocarcinoma	8480/3	Papillary adenoma	8260/0
Fetal adenocarcinoma	8333/3	Mucinous cystadenoma	8470/0
Enteric adenocarcinoma ^a	8144/3	Mucous gland adenoma	8480/0
Minimally invasive adenocarcinoma ^a		Mesenchymal tumors	
Nonmucinous	8256/3 ^a	Pulmonary hamartoma	8992/0 ^b
Mucinous	8257/3 ^a	Chondroma	9220/0
Preinvasive lesions		PEComatous tumor ^a	
Atypical adenomatous hyperplasia	8250/0 ^a	Lymphangioliomyomatosis	9174/1
Adenocarcinoma in situ ^a		PEComa, benign ^a	8714/0
Nonmucinous	8250/2 ^a	Clear cell tumor	8005/0
Mucinous	8253/2 ^a	PEComa, malignant ^a	8714/3
Squamous cell carcinoma	8070/3	Congenital peribronchial myofibroblastic tumor	8827/1
Keratizing squamous cell carcinoma ^a	8071/3	Diffuse pulmonary lymphangiomatosis	
Nonkeratinizing squamous cell carcinoma ^a	8072/3	Inflammatory myofibroblastic tumor	8825/1
Basaloid squamous cell carcinoma ^a	8083/3	Epithelioid hemangioendothelioma	9133/3
Preinvasive lesion		Pleuropulmonary blastoma	8973/3
Squamous cell carcinoma in situ	8070/2	Synovial sarcoma	9040/3
Neuroendocrine tumors		Pulmonary artery intimal sarcoma	9137/3
Small cell carcinoma	8041/3	Pulmonary myxoid sarcoma with <i>EWSR1-CREB1</i> translocation ^a	8842/3 ^a
Combined small cell carcinoma	8045/3	Myoepithelial tumor ^a	
Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3	Myoepithelioma	8982/0
Combined large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3	Myoepithelial carcinoma	8982/3
Carcinoid tumors		Lymphohistiocytic tumors	
Typical carcinoid tumor	8240/3	Extranodal marginal zone lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	9699/3
Atypical carcinoid tumor	8249/3	Diffuse large cell lymphoma	9680/3
Preinvasive lesion		Lymphomatoid granulomatosis	9766/1
Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia	8040/0 ^b	Intravascular large B cell lymphoma ^a	9712/3
Large cell carcinoma	8012/3	Pulmonary Langerhans cell histiocytosis	9751/1
Adenosquamous carcinoma	8560/3	Erdheim-Chester disease	9750/1
Sarcomatous carcinomas		Tumors of ectopic origin	
Pleomorphic carcinoma	8022/3	Germ cell tumors	
Spindle cell carcinoma	8032/3	Teratoma, mature	9080/0
Giant cell carcinoma	8051/3	Teratoma, immature	9080/1
Carcinosarcoma	8980/3	Intrapulmonary thymoma	8580/3
Pulmonary blastoma	8972/3	Melanoma	8270/3
Other and Unclassified carcinomas		Meningioma, NOS	9530/0
Lymphoepithelioma-like carcinoma	8082/3	Metastatic tumors	
NUT carcinoma ^a	8023/3 ^a		
Salivary gland-type tumors			
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3		
Adenoid cystic carcinoma	8200/3		
Epithelial-myoepithelial carcinoma	8562/3		
Pleomorphic adenoma	8940/0		

(Continued)

^aThe morphology codes are from the ICDO.¹ Behavior is coded 0 for benign tumors, 1 for unspecified, borderline or uncertain behavior, 2 for carcinoma in situ and grade III unspecified neoplasia, and 3 for malignant tumors.

^bThe classification is modified from the previous WHO classification² taking into account changes in our understanding of these lesions.

^cThis table is reproduced from the 2015 WHO Classification by Travis et al.¹

^dThese new codes were approved by the International Agency on Cancer Research/WHO Committee for ICDO.

^eNew terms changed or entities added since 2004 WHO Classification.¹

ICNEC, large cell neuroendocrine carcinoma, WHO, World Health Organization, ICDO International Classification of Diseases for Oncology.

Tale classificazione viene aggiornata periodicamente da un Comitato di Esperti internazionali che vede coinvolti, insieme ai patologi, specialisti afferenti alle varie discipline dedicate allo studio e alla cura del cancro del polmone.

Attualmente, le neoplasie polmonari vengono classificate in benigne e maligne. I tumori maligni vengono ulteriormente suddivisi in due gruppi principali, che insieme rappresentano oltre il 95% di tutte le neoplasie: a) i **carcinomi a piccole cellule** o microcitomi (small-cell lung cancer-**SCLC**) che rappresentano circa il 10-15%; b) i **carcinomi non a piccole cellule** o non-microcitomi (non-small-cell lung cancer-**NSCLC**) che sono circa l'80%¹². Tale classificazione semplificata ha notevole importanza clinica ai fini della stadiazione della patologia, della formulazione della prognosi e della scelta della strategia terapeutica più adeguata. Rispetto ai carcinomi a piccole cellule, che appaiono relativamente omogenei dal punto di vista morfobiologico, i carcinomi non a piccole cellule sono più eterogenei. Per questo motivo vengono suddivisi ulteriormente in tre sottotipi istologici¹²:

1. Il **carcinoma spinocellulare** (detto anche squamocellulare o a cellule squamose) rappresenta il 25-30% di tutte le neoplasie maligne del polmone, è più frequente nei soggetti di sesso maschile ed è l'istotipo maggiormente correlato al fumo di sigaretta. Insorge prevalentemente come neoformazione endoluminale e stenosante nei bronchi centrali di grosso calibro dando precocemente atelettasia distale, bronchiectasie e polmoniti ostruttive, presenti nella maggior parte dei pazienti come prima manifestazione clinica; ha quindi per lo più uno sviluppo centrale, ilare o parailare e meno

frequentemente origina al centro del parenchima polmonare andando spesso incontro a necrosi centrale. Tende a metastatizzare tardivamente rispetto agli altri istotipi. È il tumore polmonare che presenta una prognosi più favorevole¹³.

2. L'**adenocarcinoma** rappresenta circa il 35-40% dei casi e la sua incidenza è aumentata significativamente negli ultimi due decenni parallelamente alla diminuzione dell'incidenza del carcinoma spinocellulare ed è ora la forma più comune di cancro polmonare nelle donne e nei soggetti non tabagisti. La lesione è, in genere, periferica e cioè a livello dei bronchi di calibro minore. L'adenocarcinoma cresce più lentamente rispetto al carcinoma spino cellulare, ma ha una tendenza più spiccata a dare metastasi a distanza¹³.
3. Il **carcinoma indifferenziato a grandi cellule** si presenta con minore frequenza (10-15%). È associato al fumo di sigaretta nel 50-55% dei casi, quindi in modo meno significativo rispetto al carcinoma a piccole cellule e al carcinoma spinocellulare. Può insorgere in diverse porzioni del parenchima polmonare, localizzandosi sia in sede centrale sia in sede periferica. E' un tumore a crescita rapida con tendenza all'infiltrazione a livello ilare e alla precoce metastatizzazione a distanza¹³.

Nel restante 5% dei casi il tumore non prende origine dall'epitelio, ma da tessuti diversi quali ad esempio i tessuti nervoso ed endocrino (in questo caso si parla di

carcinoide polmonare di origine neuroendocrina) o linfatico (in questo caso si tratta di linfoma polmonare)¹³.

L'ETEROGENEITÀ GENOMICA DEL TUMORE POLMONARE

Il modello di evoluzione clonale dello sviluppo del tumore è stato per la prima volta proposto da Peter Nowell (1976) ed è stato elaborato come un processo governato dalle stesse leggi dell'evoluzione darwiniana: cellule pre-tumorali geneticamente instabili accumulano alterazioni nel proprio genoma, che fanno nascere tante sotto-popolazioni di cellule con un patrimonio genetico diverso tra di loro e dalle cellule normali da cui si sono originate¹⁴. Se le mutazioni avvengono in geni che regolano processi cruciali come il destino cellulare, la sopravvivenza della cellula o l'integrità del genoma allora nascono nuove varianti che mostrano un vantaggio rispetto alle cellule normali. Ad esempio, i nuovi cloni possono dividersi più velocemente rispetto alle cellule normali oppure essere in grado di vivere anche in condizioni critiche, come la scarsità di ossigeno. Le sottopopolazioni di cloni pre-tumorali continuano a mutare e a essere selezionate dal microambiente, in un processo adattativo, dove va avanti il clone (o i cloni) di cellule che si adeguano meglio alle condizioni ambientali¹⁴. (FIGURA 3)

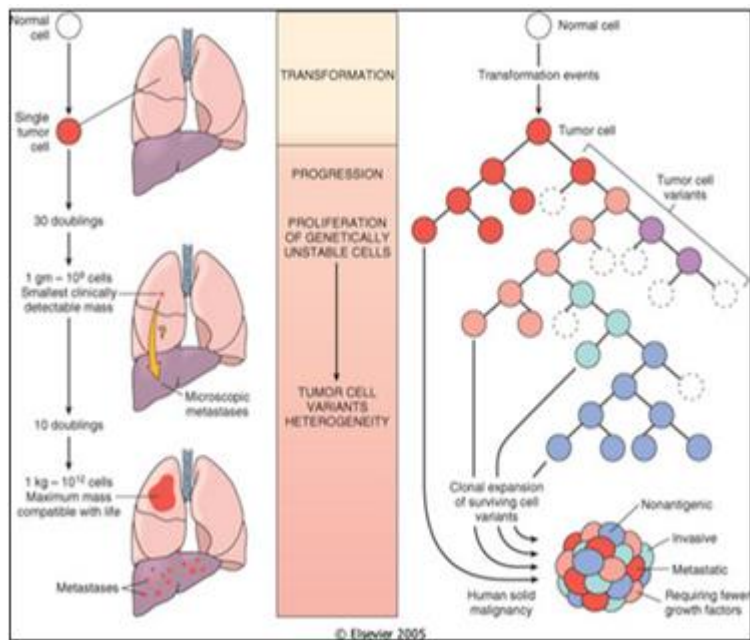


Figura 3. Schema rappresentativo le fasi della cancerogenesi e dell'eterogeneità tumorale che caratterizzano il tumore del polmone (da: *Robbins e Cotran, Le Basi Patologiche delle Malattie*)

Il lungo periodo che generalmente intercorre tra la nascita dei primi cloni di cellule tumorali e la manifestazione evidente della malattia, riflette il tempo necessario perché le cellule tumorali trovino, seguendo un processo totalmente casuale, le combinazioni che si adattano meglio al microambiente del tessuto nel quale si trovano. L'interazione tra le cellule tumorali e l'ambiente è reciproca, con l'innesco di un processo progressivo e dinamico, dove le cellule tumorali influenzano il microambiente e dove quest'ultimo opera una selezione dei cloni più adatti alla sopravvivenza¹⁴.

Questo modello di evoluzione clonale di cancerogenesi potrebbe contribuire alla presenza della cosiddetta eterogeneità genetica tumorale, definita come:

- **Eterogeneità intra-tumorale:** cellule dello stesso tumore possiedono mutazioni diverse. Tutte le volte che una cellula tumorale si divide, acquista nuove alterazioni, che la rendono diversa da quella che l'ha generata.
- **Eterogeneità inter-tumorale:** la diversità tra lo stesso tipo di tumore in pazienti diversi. Anche nella pratica clinica è ormai consolidato come due pazienti con lo stesso istotipo tumorale possono avere un decorso clinico anche molto differente¹⁵.

Numerosi studi di biologia cellulare e molecolare hanno permesso di stabilire che il processo di cancerogenesi polmonare è multifasico ed evolve in seguito all'accumulo di lesioni genetiche somatiche multiple e sequenziali. Il concetto di eterogeneità tumorale si applica al carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), istotipo più comune e protagonista di questo studio.

LE TECNICHE DI RILEVAZIONE DELLE ALTERAZIONI GENETICHE NEI TUMORI

La biopsia

Attualmente, nella pratica clinica la valutazione delle alterazioni molecolari suscettibili di terapia target e le resistenze ai trattamenti farmacologici avviene tramite biopsia. La *biopsia* è un esame medico che consiste nel prelievo di una porzione o di un frammento di tessuto da un organismo vivente. Il tessuto prelevato viene poi analizzato al microscopio o con tecniche di microbiologia o di biologia molecolare, al fine di escludere o confermare un sospetto di malattia. Il prelievo di tessuto può avvenire per via percutanea, per via endoscopica (mediante prelievo con

un ago) o mediante escissione nel contesto di un intervento operatorio. Inoltre per consentire l'allestimento di preparati osservabili al microscopio, il tessuto viene prima fissato in formalina e quindi incluso in paraffina. Il tessuto così ottenuto può essere tagliato in fettine dello spessore di 2-4 micron e montato su un vetrino porta-oggetti. Il medico specialista in anatomia patologica valuta il vetrino al microscopio e formula la diagnosi.

Sebbene il tessuto tumorale sia ad oggi il "gold standard" per l'analisi molecolare, esistono delle limitazioni in termini di acquisizione e utilità.

Gli svantaggi della biopsia:

→ è un metodo invasivo;

→ talvolta certe lesioni sono clinicamente inaccessibili

→ la tecnica può causare l'accidentale migrazione di cellule tumorali dal sito primario, permettendo a queste di diffondere in altre aree del corpo. Infatti, il tumore deve essere perforato dalle quattro alle sei volte per ottenere un sufficiente ammontare di tessuto per la diagnosi; ciò può causare la rottura del tumore e il diffondersi delle cellule tumorali lungo il tracciato dell'ago, nel sistema linfatico o in quello sanguigno.

Oltre alle problematiche relative all'acquisizione tissutale, anche la conservazione e l'eterogeneità tumorale rappresentano elementi a sfavore nell'uso del tessuto tumorale per l'analisi molecolare.

→ conservazione: la formalina in cui viene immerso il tessuto può degradare il DNA a tal punto da renderlo inutilizzabile per analizzare la presenza di mutazioni, in questo caso risulta impossibile fare una diagnosi;

→ eterogeneità: l'incapacità di cogliere l'eterogeneità tumorale è senza dubbio il limite maggiore della biopsia. Aree diverse dello stesso tumore possono mostrare profili genetici diversi, come anche le varie metastasi all'interno di uno stesso paziente. Quindi prelevare una sezione di tessuto da un tumore isolato non consente di valutarne l'eterogeneità, per farlo occorrerebbero biopsie multiple e ripetute nel tempo¹⁶.

Al fine di superare le limitazioni della biopsia, sono state studiate delle tecniche meno invasive, capaci di identificare l'eterogeneità tumorale e i cambiamenti molecolari a cui vanno incontro le cellule neoplastiche in seguito a trattamento farmacologico¹⁷.

La facile accessibilità del DNA tumorale circolante presente nel siero e nel plasma potrebbe costituire una valida alternativa alle ripetute biopsie e potrebbe rappresentare un importante aiuto per monitorare i cambiamenti molecolari del tumore in corso di trattamento¹⁸.

Il DNA tumorale circolante

La presenza di acidi nucleici liberi nel sangue umano fu descritta per la prima volta nel 1948 da Mandel e Metais. Nonostante il carattere innovativo di questo lavoro, gli venne dato poco valore fino al 1966, quando Tan *et al.* dimostrarono la presenza di DNA circolante nel siero e nel plasma dei pazienti affetti da lupus

eritematoso sistemico. Parecchi anni più tardi, nel 1977, Leon *et al.* segnalavano la presenza di elevati livelli di DNA circolante nel siero di pazienti affetti da tumore del pancreas¹⁸. Con gli studi svolti in seguito si è potuto affermare che gli acidi nucleici circolanti (CNA) sono presenti in piccole quantità nel sangue di individui sani ed aumentano nei pazienti affetti da una serie di disturbi clinici come tumore, ictus, traumi, infarto del miocardico, malattie autoimmuni e complicazioni associate a gravidanza¹⁹.

Il DNA tumorale circolante (ctDNA) fa parte degli acidi nucleici ritrovati nel sangue periferico di pazienti affetti da tumore e può essere isolato dal siero e dal plasma, sotto-forma di piccoli frammenti di dimensioni minori di 1000 bp²⁰. L'origine del DNA tumorale circolante venne definitivamente compresa quando nel 1989, Stroun *et al.* rilevarono, nel DNA isolato dal plasma, mutazioni in comune a quelle del DNA delle cellule tumorali degli stessi pazienti²¹. Come ulteriore conferma, in studi effettuati su pazienti con tumore del colon-retto, venne evidenziata la presenza delle stesse mutazioni a carico del gene *KRAS* sia nel DNA tumorale circolante che nel DNA delle cellule del tumore²².

Il rilascio del DNA tumorale circolante

Nonostante il ctDNA sia al centro dell'interesse della comunità oncologica molecolare, il meccanismo con cui viene rilasciato dalla cellula originaria deve essere ancora delucidato¹⁹. Nel 2001, uno studio di Jahr *et al.* ipotizzò che il ctDNA derivasse dalla combinazione di processi apoptotici e necrotici.

L'idea venne approfondita in studi successivi, i quali dimostrarono che i frammenti di DNA presenti nella circolazione originavano dalla fagocitosi da parte di macrofagi di cellule neoplastiche necrotiche ma anche di cellule apoptotiche. Le prime rilasciavano frammenti di DNA tumorale di lunghezza diversa, mentre le seconde frammenti di DNA wild-type di lunghezza regolare. Nei tumori invasivi le cellule necrotiche aumentano a causa dell'ipossia, ciò implica un conseguente aumento di DNA tumorale in circolo²³.

Comunque sia l'apoptosi sembra dare un maggior contributo al DNA totale in circolo, come suggerito dal fatto che la maggior parte dei frammenti di ctDNA ha una lunghezza di circa 180-200 bp, caratteristica del processo apoptotico. Il rilascio passivo del ctDNA nella circolazione sanguigna è inoltre influenzato dall'estensione, dall'ubicazione e dalla vascolarizzazione del tumore, andando così a far variare i livelli di ctDNA osservati. Una porzione di DNA frammentato deriva direttamente dal tumore, anche se il contributo varia tra lo 0,01% e più del 90%¹⁷.

Quantificazione del DNA tumorale circolante

La concentrazione degli acidi nucleici che circolano liberi nei fluidi biologici è solitamente bassa e può variare tra i vari individui. Già da tempo, tramite dosaggio radioimmunologico (tecnica di laboratorio utilizzata per dosare qualsiasi composto immunogenico disponibile in forma pura e marcabile radioattivamente), è stato dimostrato che la concentrazione di DNA circolante in pazienti affetti da tumore aumenta fino a 4 volte rispetto a quella dei controlli sani (Board et al. 2008). Per il

DNA tumorale circolante la concentrazione varia all'interno di un range da 1-100 ng/ml di campione umano²⁰. Inoltre, una quantità ancora maggiore di DNA è stata trovata nel plasma o nel siero dei pazienti con metastasi rispetto a quelli con una malattia localizzata²². Leon *et al.* hanno dimostrato anche che i livelli di DNA nel plasma dei pazienti affetti da tumore, era effettivamente diminuito dopo la chemioterapia, così come in quelli sottoposti a radioterapia²³. La diminuzione dei livelli di DNA circolante è stata notata durante il *follow-up* dei pazienti che rispondevano al trattamento e che hanno mostrato una significativa sopravvivenza libera da ricaduta.¹⁸ Il *follow-up* ha inoltre evidenziato una stretta correlazione tra la persistenza di alti livelli di DNA tumorale circolante nel plasma o nel siero e la resistenza della malattia al trattamento²².

Siero o plasma per l'isolamento del DNA tumorale circolante?

Il *plasma sanguigno* è la componente liquida del sangue, privata della porzione corpuscolata, cioè dei globuli rossi, globuli bianchi e piastrine (mediante centrifugazione). Si presenta sotto-forma di un liquido giallastro ed è composto per la maggior parte da acqua e per la restante parte da proteine, sostanze inorganiche come il sodio, il potassio, il cloruro, il carbonato e il bicarbonato di calcio; zuccheri, ormoni, enzimi, lipidi, amminoacidi e prodotti di scarto come l'urea e la creatinina. Il *siero*, invece, è la frazione liquida del sangue che si ottiene dopo la coagulazione, e corrisponde al plasma privato del fibrinogeno, la proteina che provoca la coagulazione del sangue, ovvero la sedimentazione degli elementi corpuscolati e la

formazione del coagulo. Il siero è ottenuto tramite centrifugazione del plasma post-coagulazione. Durante la coagulazione la lisi e la distruzione delle cellule permettono al DNA germinale di essere rilasciato. Il DNA tumorale circolante può essere isolato sia dal plasma sia dal siero. Si è concluso però dopo diversi studi che il siero non è adatto a monitorare la concentrazione di DNA tumorale circolante, a causa del grande sfondo di DNA non tumorale presente al suo interno rispetto al plasma, dovuto alla lisi dei globuli bianchi del sangue durante il processo di coagulazione¹⁸.

Vantaggi nell'analisi del DNA tumorale circolante

Il DNA tumorale circolante può fornire le stesse informazioni genetiche ottenibili dalla biopsia tissutale. Esso contiene difetti genetici identici a quelli del tumore stesso, che possono essere mutazioni puntiformi (EGFR e KRAS), riarrangiamenti (EML4-ALK), amplificazioni (HER2 e MET) e aneuploidia. La diretta accessibilità al flusso sanguigno ha numerosi vantaggi:

- fonte di DNA fresco, libero da ogni sorta di conservante che potrebbe influenzare il risultato dell'analisi;
- tecnica non invasiva, poiché consiste in un prelievo di sangue;
- evita i pericoli e gli eventuali effetti avversi che possono essere indotti dalla biopsia;

- facilita il monitoraggio dei cambiamenti molecolari che intercorrono lungo il corso della malattia, grazie alla semplicità con cui è possibile ottenere i campioni (prelievi);

consente di cogliere l'eterogeneità della malattia, in quanto i frammenti di DNA tumorale circolante derivano dai vari siti tumorali all'interno del corpo del paziente¹⁷.

Limiti del DNA tumorale circolante

A causa della piccola quantità e della natura molto frammentata del DNA tumorale circolante nel plasma, non è semplice e di facile esecuzione un isolamento rapido, efficiente ed affidabile del ctDNA. I prodotti commerciali per l'isolamento degli acidi nucleici dai fluidi corporei sono stati sviluppati fino ad ora focalizzandosi su DNA a medio ed alto peso molecolare²⁴.

In letteratura sono stati messi a confronto vari metodi di estrazione del DNA:

- QIAamp DNA Mini Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
- AgencourtGenfind Blood and Serum GenomicDNA IsolationKit (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, MA, USA)
- QIAamp Virus Spin Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
- Invitrogen ChargeSwitch gDNA 1 mL Serum Kit (Invitrogen, Paisley, UK)
- HighPure PCR Template Preparation kit (Roche)
- NucleoSpin Plasma XS method (Macherey-Nagel)

Questi possono dare risultati variabili per rendimento, qualità e contaminazione del DNA tumorale circolante (Board et al. 2008). La base per il successo nella rilevazione del DNA tumorale circolante è la selezione di un metodo di isolamento che garantisce l'estrazione di una quantità sufficiente di ctDNA di qualità²³. Tuttavia, il confronto dei numerosi dati disponibili è spesso difficile da fare a causa della mancanza di procedure e metodologie di analisi standardizzate, che variano nella raccolta del plasma o del siero, per il metodo di purificazione, per il target genetico analizzato. È evidente che qualsiasi futura applicazione del plasma o del siero, per l'analisi del DNA tumorale circolante per scopi diagnostici, dipenderà dalla possibilità di avere risultati affidabili e riproducibili, che richiedono l'ottimizzazione e l'equivalenza delle procedure utilizzate¹⁸.

Applicazioni cliniche del DNA tumorale circolante

L'analisi molecolare del DNA tumorale circolante ha permesso di superare l'ostacolo delle biopsie invasive per poter:

- verificare la *presenza di alterazioni genetiche ed epigenetiche* tumore-specifiche che possono portare allo *sviluppo di resistenza verso determinati farmaci* che ci possono *guidare nell'utilizzo di terapie personalizzate (Target Therapy)* convenienti sia in termini di salute che in termini di costi economici²⁵;
- identificare precocemente *la ripresa della malattia e la presenza di metastasi tumorali* nel *follow-up* dei pazienti (che di solito utilizza marcatori tumorali sierici non troppo specifici e sensibili; tomografia computerizzata (CT);

tomografia ad emissione di positroni (PET), o risonanza magnetica). La chiave per poter effettuare un *follow-up* a lungo termine dei pazienti sottoposti a terapia antitumorale è proprio l'utilizzo di metodi che hanno la minima invasività. L'individuazione precoce di un biomarcatore della possibile progressione tumorale può essere necessaria per un intervento rapido al fine di ridurre il rischio di espansione della malattia, portando ad una maggiore sopravvivenza dei pazienti²³.

Il ctDNA presente nel plasma e nel siero dei pazienti può dunque essere utilizzato come biomarcatore su cui costruire dei tests diagnostici e prognostici meno invasivi che non hanno difficoltà logistiche per il campionamento (Board et al. 2008). Tecniche meno invasive sono interessanti anche per lo screening, per l'identificazione di potenziali bersagli terapeutici e per il *follow-up* dei pazienti, per seguire dunque il decorso della malattia dopo la chirurgia o le terapie, monitorando la risposta al trattamento²⁶. Studi precedenti hanno evidenziato che alterazioni nel DNA circolante plasmatico sono state trovate dai 5 ai 14 mesi prima della diagnosi clinica in quattro pazienti affetti da pancreatite che hanno poi sviluppato tumore, mostrando che il DNA tumorale circolante può essere un evento precoce nell'oncogenesi. DNA tumorale circolante non è stato invece trovato nel plasma di 3 pazienti con pancreatite cronica che non hanno sviluppato il tumore²². Non è rarissimo inoltre trovare mutazioni nel DNA plasmatico di pazienti che non presentano tale alterazione a livello del DNA delle cellule tumorali, o che addirittura non hanno nessun tipo di tumore; questo è stato interpretato come una potenziale tecnica per

rilevare sub-cloni del tumore che hanno guadagnato mutazioni secondarie durante la progressione, o prime mutazioni in pazienti a rischio¹⁸.

LE MUTAZIONI GENETICHE NELL'NSCLC

Negli ultimi anni è stato possibile caratterizzare il profilo molecolare dell'NSCLC attraverso l'avanzamento scientifico e tecnologico delle piattaforme di analisi genomiche ad alto rendimento ("*high-throughput*"), come i metodi di sequenziamento di nuova generazione (*Next-Generation Sequencing*, NGS), che hanno consentito il passaggio dall'analisi di un singolo gene prima, e di una intera famiglia genica poi, di arrivare all'analisi dell'intero genoma, esoma, trascrittoma ed epigenoma tumorale²⁷.

La caratterizzazione del genoma dell'NSCLC ne ha evidenziato l'eterogeneità. Le principali anomalie genetiche osservate nell'NSCLC sono mutazioni puntiformi (sostituzione di un singolo nucleotide), piccole delezioni o inserzioni, così come la formazione di geni di fusione, conseguenza della traslocazione di frammenti genici localizzati sullo stesso cromosoma o su cromosomi diversi²⁸. I principali geni le cui mutazioni driver svolgono un ruolo cruciale nella genesi e nello sviluppo dell'NSCLC sono descritti in FIGURA 4 e qui di seguito descritti.

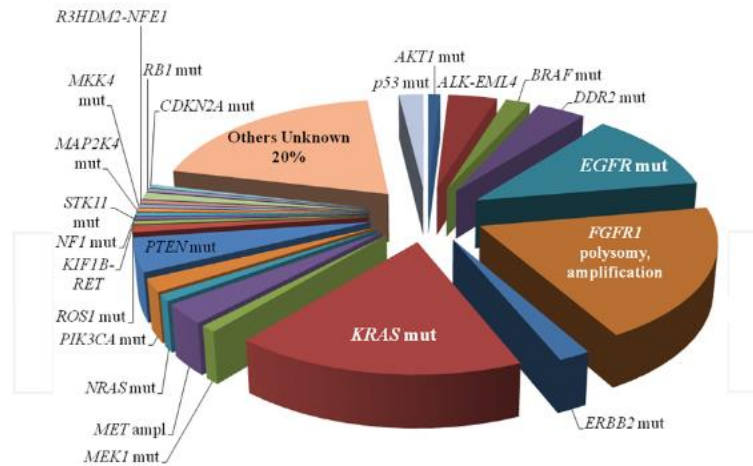


Figura 4. Mutazioni geniche coinvolte nell'insorgenza e nello sviluppo dell'NSCLC (da: Krawczyk, Kucharczyk, Wojas-Krawczyk. Screening of Gene Mutations in Lung Cancer for Qualification to Molecularly Targeted Therapies. 2012)

Fattori di trascrizione

MYC

Il proto-oncogene *MYC* è espresso in tutte le cellule eucariotiche e appartiene ai geni della risposta immediata, che vengono rapidamente indotti quando le cellule nel loro stato di quiescenza ricevono un segnale di divisione. Dopo un incremento iniziale transitorio, l'espressione dell'mRNA di *MYC* tende a diminuire fino a ritornare al livello basale. Il prodotto di *MYC* è un fattore di trascrizione che viene traslocato nel nucleo sotto forma di dimero con la proteina MAX. Questo eterodimero lega sequenze di DNA nei geni bersaglio ed è un potente attivatore della trascrizione. Alcuni dei suoi geni bersaglio sono associati alla proliferazione cellulare, all'acetilazione degli istoni, alla riduzione dell'adesività cellulare, all'aumento della mobilità cellulare e della sintesi proteica. Inoltre, si ritiene che *MYC* sia implicato

anche nel processo di apoptosi²⁹. Contrariamente all'espressione regolata di MYC durante la normale proliferazione cellulare, nelle cellule tumorali si ritrova una iperespressione persistente della proteina corrispondente. Questo può portare alla duratura trascrizione dei geni bersaglio critici, con conseguente trasformazione neoplastica²⁹.

Il gene correlato *c-myc* risulta amplificato in circa il 10% dei tumori NSCLC²⁹.

Recettori tirosin chinasi

MET

Il proto-oncogene *MET* codifica per un recettore transmembrana tirosina chinasi, che lega il fattore di crescita degli epatociti (HGF), suo naturale ligando. L'interazione recettore-ligando induce il cambiamento conformazionale nel recettore MET, con la conseguente facilitazione della sua fosforilazione e l'attivazione di pathways di segnali multipli coinvolti nella proliferazione, sopravvivenza, motilità ed invasione cellulare³⁰.

Nel contesto tumorale, il sistema MET-HGF risulta un mediatore coinvolto in effetti pleiotropici multipli come la crescita tumorale, la sopravvivenza, la motilità e la migrazione delle cellule cancerose, così come i processi di angiogenesi e di metastasi tumorali. Le mutazioni nel gene *MET* sono rare, mentre una grande quantità di copie (amplificazione gene *MET*) sono state rilevate in circa l'1-11% di casi NSCLC, spesso in associazione con l'iperespressione della proteina MET ed una prognosi sfavorevole²⁷. L'amplificazione del gene *MET* può verificarsi in concomitanza alla

mutazione pT790M o ad altre mutazioni oppure singolarmente, ed è responsabile della resistenza ai TKIs (farmaci inibitori delle tirosina chinasi), in quanto il recettore attiva il segnale intracellulare indipendentemente dall'attivazione di EGFR³¹.

RET

Il proto-oncogene *RET* codifica per un recettore tirosin-chinasico che lega il fattore neurotrofico di derivazione gliale e proteine simili, con la conseguente attivazione di un sistema intracellulare che promuove la sopravvivenza cellulare durante lo sviluppo neurale. Recentemente, è stata scoperta la presenza dell'oncogene di fusione *RET-KIF5B*, in particolare nei soggetti giovani non tabagisti e in assenza di una storia familiare di tumore del polmone³⁰. Il fatto che non siano presenti mutazioni a carico del gene *RET* nei pazienti RET-positivi, suggerisce l'ipotesi che l'oncogene di fusione *RET* potrebbe essere fra le componenti in grado di modulare processo di cancerogenesi polmonare²⁷.

ROS1

Il gene *ROS1* codifica per un recettore tirosin-chinasico appartenente alla famiglia dei recettori insulinici. Approssimativamente, in circa il 2% degli NSCLC sono stati identificati riarrangiamenti cromosomici fra il gene *ROS1* ed i geni CD74, SLC34A2/NaPi2b e FIG, con la formazione di prodotti di fusione che portano ad una protratta attivazione del recettore tirosin-chinasico, che sembra essere fra le alterazioni driver caratterizzanti il processo di genesi e sviluppo del tumore del

polmone. I pazienti che presentano riarrangiamenti a carico del gene *ROS1* sono giovani e spesso non fumatori, caratteristiche cliniche simili ai pazienti NSCLC-ALK-positivi³⁰.

HER2 (ERBB2)

Il proto-oncogene *HER2* codifica per un recettore tirosina chinasi, definito recettore 2 per il fattore di crescita epidermico umano, appartenente alla famiglia ERBB che include altri tre membri: EGFR (HER1/ERBB1), HER3 (ERBB3) e HER4 (ERBB4). *HER2* è una proteina coinvolta nelle vie di trasduzione del segnale che portano alla crescita e al differenziamento cellulare. In particolare, in un piccolo gruppo di NSCLCs sono state descritte mutazioni attivanti all'interno del dominio tirosin-chinasico del gene *HER2*, con una frequenza compresa fra il 2 ed il 4%. Le mutazioni più comunemente caratterizzate sono inserzioni in-frame a livello dell'esone 20, ma sono state identificate anche mutazioni puntiformi a carico del dominio tirosin-chinasico. In generale, tali alterazioni determinano l'attivazione costituzionale del recettore *HER2*. Per tale motivo, la sua deregolazione risulta avere un ruolo significativo nello sviluppo e nella progressione del tumore. Le caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da NSCLC con mutazioni in *HER2* sono simili a quelle dei pazienti che presentano mutazioni a carico del gene EGFR, essendo comuni nelle donne non fumatrici³².

EGFR (ERBB1)

Il gene *EGFR* codifica per il recettore di crescita epidermico, un recettore tirosin-chinasico transmembrana, che svolge un ruolo importante nel regolare la crescita, la proliferazione e la differenziazione cellulare in seguito al legame con i suoi ligandi, inclusi il recettore di crescita epidermico (EGF) ed il fattore di crescita trasformante α (TGF- α). Il recettore EGFR e le proteine implicate nella via di trasduzione del segnale innescata a valle, se mutati, possono essere caratterizzati da un persistente stato di attivazione, anche in assenza del legame con il fattore di crescita; ciò fa sì che vengano inviati continui segnali mitotici alla cellula. Si stabilisce così una serie di cambiamenti biochimici che possono favorire la proliferazione cellulare, aumentando la probabilità di formazione del tumore, la sua capacità di invadere i tessuti e dare metastasi, la sua capacità angiogenica. Diversi studi hanno ormai stabilito che le mutazioni che portano a sovra-espressione o a iper-attività di EGFR si verificano negli esoni 18-21 del gene *EGFR*, che codificano per una porzione del dominio tirosin-chinasico. Nel tumore NSCLC, tali mutazioni sono presenti in circa il 10% della popolazione Caucasica e in circa il 40% della popolazione Asiatica, con una frequenza più elevata nelle donne non fumatrici ed una diagnosi di adenocarcinoma¹¹.

ALK

Un altro proto-oncogene che codifica per un recettore tirosina chinasi transmembrana è il gene *ALK*, definito chinasi del linfoma anaplastico.

Fisiologicamente, contribuisce allo sviluppo del sistema nervoso embrionale e la sua espressione decresce dopo la nascita, dove risulta debolmente presente nelle cellule nervose ed endoteliali. A livello cellulare, *ALK* regola le vie del segnale canoniche che sono condivise con altri recettori tirosina chinasi, sostenendo processi quali la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. I riarrangiamenti a carico del gene *ALK* sono un altro esempio scoperto recentemente di alterazioni driver in alcuni tipi di tumore. Negli NSCLCs, il signalling di ALK è attivato in seguito alla fusione oncogenica fra il gene *ALK* e vari geni partner, dando così origine a proteine di fusione. In particolare, il riarrangiamento EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like4)-*ALK* gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo di circa il 3-7% di pazienti NSCLC. La fusione EML4-ALK risulta da un'inversione a livello del braccio corto del cromosoma 2, che fonde porzioni differenti del gene EML4 con una porzione del gene *ALK*. Infatti, sono state caratterizzate almeno 9 differenti varianti di fusione EML4-ALK negli NSCLC. Tale riarrangiamento genera una chinasi chimerica costitutivamente attiva. La traslocazione di ALK si presenta più comunemente in un sottoinsieme di pazienti non fumatori, di giovane età e con una diagnosi di adenocarcinoma³⁰.

Soppressori tumorali

RB

Il gene *RB* è un onco-soppressore che codifica per una fosfoproteina nucleare coinvolta in eventi trascrizionali che assumono un ruolo fondamentale nella regolazione del ciclo cellulare. La proteina RB inibisce la proliferazione cellulare. In una cellula quiescente, RB lega un'altra proteina, E2F, che ha attività di fattore di trascrizione. Legandola, le impedisce di entrare nel nucleo a trascrivere una serie di geni necessari alla divisione cellulare. Quando la cellula deve dividersi viene attivato un sistema di proteine, le chinasi ciclina-dipendenti (*cyclin-dependent kinases*, CDK), in grado di fosforilare la proteina RB, che viene così inattivata e non riesce più a legare E2F. E2F è quindi libera di traslocare nel nucleo e dare inizio alla trascrizione di geni che permettono alla cellula di dividersi e proliferare. Alla fine di ogni ciclo replicativo RB viene defosforilata da una fosfatasi, riprende quindi a legare E2F e la cellula torna nelle condizioni di riposo. In caso di mutazioni che rendono RB inattiva, o in caso di malfunzionamento dei meccanismi che regolano la sua funzione, come per esempio una maggiore capacità fosforilante della CDK, la cellula perde questo tipo di controllo sulla proliferazione. Ciò può portare ad una crescita incontrollata e conseguentemente all'innescamento dello sviluppo neoplastico²⁹.

La perdita dell'espressione della proteina RB, in seguito all'accumulo di mutazioni acquisite somaticamente, è stato visto essere un evento relativamente comune negli NSCLC, associato ad una riduzione della sopravvivenza. Inoltre, è stato descritto come la perdita dell'espressione della proteina RB in associazione alla

iperespressione della proteina p53 comporti una ulteriore riduzione della sopravvivenza, rispetto alla singola perdita di RB o alla singola iperespressione di p53³³.

P53

Il gene *p53* è un onco-soppressore che codifica per una proteina definita il "guardiano del genoma umano", in quanto in grado di prevenire la propagazione di cellule geneticamente danneggiate. La proteina p53, infatti, è fisiologicamente presente in tutti i tipi di cellule, in grado di riconoscere la presenza di eventuali rotture della doppia elica di DNA, di legarsi ad essa e, in tal caso, di provvedere ad instaurare meccanismi di riparazione. Per fare ciò, determina il blocco transitorio della proliferazione cellulare al fine di evitare che una cellula danneggiata si possa replicare in modo incontrollato. Se la riparazione non è avvenuta efficientemente o il danno al DNA è troppo esteso, p53 può indurre la morte per apoptosi della cellula stessa. La perdita omozigote della funzione di p53 può avvenire in ogni tipo di cancro, dove nella maggior parte dei casi le mutazioni interessano entrambi gli alleli del gene *p53* e sono acquisite nelle cellule somatiche²⁹.

Approssimativamente, circa il 40-60% degli NSCLC ed il 70% degli SCLC presentano mutazioni a carico del gene *p53*, indipendentemente dal loro stato di mutazione nei geni EGFR e KRAS. Le mutazioni che colpiscono il gene *p53* nei tumori polmonari sono prevalentemente associate ai codoni 157, 245, 248 e 273. Tali mutazioni sono

generalmente trasversioni G→T e G→A, rispettivamente con una frequenza maggiore nei fumatori e nei non fumatori³⁴.

P16^{NK4A}

Il gene onco-soppressore *CDKN2A* codifica per due proteine: la proteina p14arf e la proteina *p16^{NK4A}*. In condizioni fisiologiche, la proteina *p16^{NK4A}* inibisce la formazione del complesso attivo ciclina D1-CDK4, che a sua volta inibisce l'attività antiproliferativa della proteina RB e permette la progressione dalla fase G₁ alla fase S del ciclo cellulare. Pertanto, alterazioni molecolari a carico della proteina *p16^{NK4A}* si traducono con la perdita della capacità di bloccare l'attività della ciclina D1-CDK4 e di prevenire la fosforilazione della proteina RB durante il ciclo cellulare. Negli NSCLCs, la proteina *p16^{NK4A}* è frequentemente inattivata (17-58%), in particolare in seguito a delezioni omozigoti e mutazioni puntiformi che colpiscono il gene, così come l'ipermetilazione delle isole CpG in assenza di mutazioni³⁴.

LKB1

Il gene *LKB1* (definito anche *STK11*) codifica per una serina treonina chinasi, in grado di fosforilare una grande varietà di targets citoplasmatici. Questo gene è considerato un onco-soppressore in quanto la sua delezione è stata osservata in molti tipi di cancro. La proteina LKB1 è implicata in diversi meccanismi, tra cui l'inibizione di mTOR, la regolazione della proliferazione e del ciclo cellulare, e perfino la regolazione del processo metastatico³⁴. È stato scoperto che mutazioni

eterogenee, tra cui mutazioni puntiformi e delezioni, che colpiscono il gene *LKB1* sono un evento piuttosto comune negli NSCLCs. Inoltre, queste mutazioni sono presenti in soggetti tabagisti, spesso co-esistono con mutazioni attivanti nel gene *KRAS* e sono mutuamente esclusive con le mutazioni che colpiscono il gene *EGFR*²⁷.

PTEN

Il gene onco-soppressore *PTEN* codifica per una fosfatasi che regola in maniera negativa il pathway *PI3K*, determinando la defosforilazione del fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato (*PIP3*), il quale media l'attivazione della proteina citosolica *AKT*. Come risultato, si ha l'inibizione della via *PI3K/AKT/mTOR* e, quindi, l'arresto del ciclo cellulare in fase *G₁* e apoptosi. Inoltre, *PTEN* partecipa al controllo della migrazione cellulare, dell'adesività con le cellule vicine e dell'angiogenesi. Quando *PTEN* è deletato, mutato, o inattivo, le cellule sono libere di procedere nel ciclo cellulare, prendendo la via della trasformazione maligna. Le mutazioni di *PTEN* sono state caratterizzate soltanto in soggetti non fumatori e sono spesso significativamente più frequenti nel carcinoma spinocellulare e non nell'adenocarcinoma. Questi risultati indicano che tali alterazioni sono relativamente comuni negli NSCLCs³⁴.

Meccanismi di trasduzione del segnale

KRAS

Il proto-oncogene *KRAS* codifica per una proteina legante la guanina trifosfato (GTP) che gioca un ruolo centrale come mediatore di una via di trasduzione del segnale a valle di recettori di crescita e per tale motivo la sua presenza è cruciale per la proliferazione, la sopravvivenza e la differenziazione cellulare²⁹. Questa via, se alterata, porta ad una serie di cambiamenti biochimici che possono favorire la proliferazione cellulare, aumentando quindi la probabilità di formazione del tumore, la sua capacità di invadere i tessuti e dare metastasi, nonché la sua capacità angiogenica²⁹.

Mutazioni in *KRAS* non sono comuni nel carcinoma spinocellulare, ma possono essere presenti in circa il 15-25% degli adenocarcinomi. Nella maggior parte dei casi, queste mutazioni sono state trovate nei tumori EGFR-wild type; pertanto, le mutazioni EGFR e KRAS sono mutuamente esclusive³⁸.

BRAF

Il proto-oncogene *BRAF* codifica per una serina/treonina chinasi implicata in un pathway di trasduzione del segnale che influenza la divisione e la differenziazione cellulare²⁹.

Mutazioni del gene *BRAF* sono responsabili dello sviluppo di numerosi tipi di cancro, tra cui l'NSCLC. La mutazione più comune è rappresentata dalla sostituzione di un residuo di acido glutammico con uno di valina in posizione 600 dell'esone 15 (V600E).

A dispetto di questa mutazione comune alla maggior parte dei tumori BRAF positivi, negli NSCLCs sono state caratterizzate le alterazioni D594G e L596R nel dominio chinamico e G465V e G468A nel dominio di attivazione. Inoltre, nessun paziente affetto da NSCLC BRAF positivo presenta contemporaneamente mutazioni in EGFR o KRAS o la traslocazione di ALK.

PIK3CA

Il gene *PIK3CA* codifica per la proteina p100 α , una delle subunità catalitiche delle fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3Ks), una famiglia di chinasi coinvolte in molti processi cellulari, tra cui la crescita delle cellule, la loro proliferazione, differenziazione, motilità e sopravvivenza. PI3K converte PIP2 in PIP3 a livello del foglietto interno della membrana plasmatica. PIP3 recluta ed attiva importanti proteine di segnale, come AKT che fosforila disattivando vari bersagli proteici cellulari che producono come effetto finale netto l'induzione della crescita cellulare e la resistenza all'apoptosi. Mutazioni somatiche nel gene *PIK3CA* sono state scoperte in circa l'1-3% di tutti gli istotipi NSCLCs, anche se con maggiore frequenza nel carcinoma spinocellulare²⁷. Spesso, queste mutazioni tendono a co-esistere con alterazioni oncogeniche, in particolare EGFR, KRAS o ALK³⁰.

EGFR: RECETTORE TIROSINA CHINASI PER IL FATTORE DI CRESCITA DELL'EPIDERMIDE

L'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) appartiene alla famiglia dei recettori tirosina chinasi HER (o ErbB), che comprende quattro recettori correlati fra loro, ErbB1, ErbB2, ErbB3 e ErbB4. Questi recettori sono dotati di attività tirosina chinastica, ossia sono in grado di fosforilare direttamente tirosine specifiche su se stessi e su una piccola serie di proteine di segnalazione extracellulare, dando origine a cascate di segnali destinati al nucleo; in tal modo intervengono sui profili di espressione genica, con effetti duraturi sul metabolismo, la crescita, il differenziamento e la morte cellulare²⁹.

Il gene *erbB-1* si trova sul braccio corto del cromosoma 7 in posizione 12 (7p12) (FIGURA 5) ed è costituito da 28 esoni che codificano per una glicoproteina transmembrana di 170 kDA costitutivamente espressa sulla superficie delle cellule epiteliali, definita EGFR. In particolare, gli esoni 2-16 codificano per il dominio extracellulare, l'esone 17 codifica per il dominio transmembrana, gli esoni 18-24 codificano per il dominio tirosin chinastico e gli esoni 25-28 codificano per il dominio regolatore.

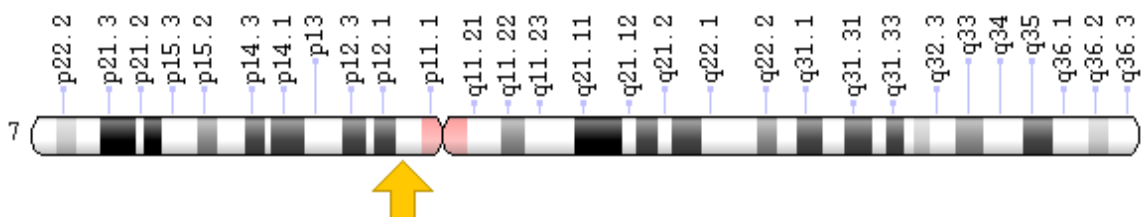


Figura 5. Rappresentazione schematica del gene EGFR

L'EGFR è un recettore fluttuante nel doppio strato lipidico della membrana cellulare, costituito da tre regioni: la porzione extracellulare amino-terminale glicosilata si trova a contatto con il liquido interstiziale ed espone il dominio che presiede al riconoscimento del ligando ed all'interazione con essa; la porzione intermembrana, lipofila, contrae rapporti col doppio strato lipidico della membrana; la porzione intracitoplasmatica carbossi-terminale contrae rapporti diretti o indiretti con le proteine della membrana plasmatica o del citosol ed è fornita di attività tirosin chinastica intrinseca. Il dominio extracellulare aminoterminale è, a sua volta, suddiviso in quattro subdomini, definiti L1, S1 (o CR1), L2 e S2 (o CR2) (o semplicemente, rispettivamente, domini I, II, III e IV). Di questi domini, S1 e S2 sono regioni omologhe ricche in residui di cisteina, mentre L1 e L2 formano i siti di interazione per il ligando. Il sito catalitico, in posizione C-terminale, è costituito da tre regioni: 1) legante ATP; 2) attività fosfotransferasica; 3) contenente una proteinchinasi attivata dalla fosforilazione.

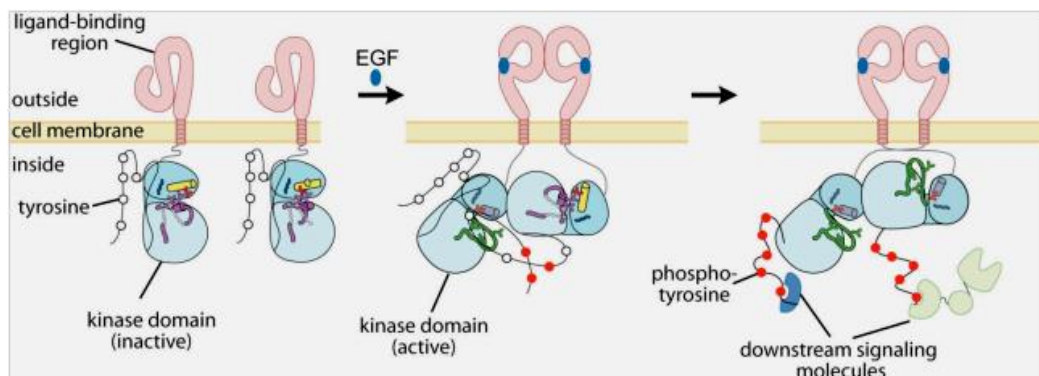


Figura 6. Rappresentazione schematica della struttura di EGFR e relativo meccanismo di attivazione

Il recettore si attiva in seguito all'interazione con numerosi fattori di crescita, tra cui l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), e fattori EGF-like come il TGF- α (*Transforming Growth Factor- α*), l'HB-EGF (*Heparin-binding growth factor*) e l'epiregulina. In assenza del ligando, il recettore monomero risiede in uno stato inattivo all'interno della membrana cellulare, distribuito in modo uniforme. L'attacco di uno dei suddetti ligandi causa l'attivazione transitoria del recettore, che omodimerizza con un altro recettore EGFR od eterodimerizza con altre proteine della famiglia dei recettori per il fattore di crescita epiteliale (FIGURA 6).

La omo/eterodimerizzazione si realizza grazie all'interazione tra il dominio S1 di un monomero EGFR e quello di un secondo monomero EGFR (o di un altro monomero della famiglia ErbB), in un complesso 2:2 recettore:ligando. Ogni dominio S1 proietta un "loop di dimerizzazione", espresso sottoforma di motivo strutturale beta-hairpin, nella porzione extracellulare: si ritiene che siano proprio le interazioni omofile tra i due loops S1 a guidare il processo di dimerizzazione³⁵. Tale processo porta così all'avvicinamento dei domini con attività chinasi presenti nelle due catene citoplasmatiche recettoriali, che possono attivarsi e fosforilarsi reciprocamente a livello dei numerosi residui di tirosina presenti sia all'interno che all'esterno del dominio catalitico, tramite un meccanismo definito transautofosforilazione. La fosforilazione delle tirosine dentro il dominio chinasi aumenta l'attività chinasi dell'enzima; mentre, la fosforilazione delle tirosine fuori dal dominio chinasi ha l'importante funzione di creare dei "siti di ancoraggio" per proteine-ponte intracellulari. Queste proteine adattatrici sono spesso fosforilate direttamente dalla

tirosina chinasi recettoriale (si parla di fosforilazione del substrato) e servono da piattaforma per l'assemblaggio di altre componenti delle cascate intracellulari del segnale. In questo modo il recettore attivato si circonda di proteine che immettono il messaggio esterno nel sistema di segnalazione intracellulare su molteplici livelli. Una grande varietà di proteine di segnalazione intracellulare può legarsi alle fosfotirosine sul recettore tirosina chinasi attivato, per aiutare a trasmettere il segnale in avanti. Queste proteine hanno tuttavia in comune domini di legame alla fosfotirosina altamente conservati, tra cui i *domini SH2* (domini omologhi a Src di tipo 2), una sequenza di circa 100 aminoacidi contenente, nella porzione centrale, un aminoacido basico in grado di interagire con la carica negativa del fosfato.

L'attivazione di EGFR è in grado di innescare due principali vie molecolari, implicate nella regolazione di importanti processi cellulari:

1. **sistema MAP-chinasi** (*Mitogen Activated Protein Kinases*, MAPK), direttamente coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare. L'attivazione di questo sistema consente l'ingresso della cellula nel ciclo cellulare con conseguente proliferazione. Infatti, in seguito all'attivazione dell'EGFR, viene reclutata la proteina RAS, la quale si lega ai residui di tirosina fosforilati della porzione intracitoplasmatica del recettore con conseguente attivazione della chinasi RAF. A cascata, si ha poi la fosforilazione e l'attivazione di ulteriori molecole effettrici, quali MEK ed ERK, che, a loro volta, interagiscono con specifici fattori trascrizionali inducendo così l'espressione di proteine nucleari (come le cicline D1 e D2) che mediano l'ingresso delle cellule nel ciclo cellulare

2. *sistema PI3K/AKT*, è invece responsabile dei segnali di sopravvivenza attraverso l'inibizione del meccanismo di morte cellulare programmata (apoptosi). Infatti, l'attivazione dell'EGFR porta il recettore a reclutare ed attivare la PI3K (fosfoinositide 3-chinasi), la quale a sua volta fosforila il PI(4,5)P₂ (fosfoinositide 4,5-bifosfato) a PI(3,4,5)P₃ (fosfoinositide 3,4,5-trifosfato). Entrambi i fosfoinositidi servono da siti di attracco per due serina/treonina chinasi contenenti domini PH (domini di omologia alla pleckstrina)- AKT (detta anche proteina chinasi B o PKB) e PDK1 (proteina chinasi 1 dipendente da fosfoinositidi)- che sono portate vicino alla membrana plasmatica. La fosforilazione e l'attivazione di AKT dipendono da PDK1, ma anche da una terza serina/treonina chinasi chiamata mTOR. AKT attivata si dissocia così dalla membrana plasmatica e fosforila diverse proteine bersaglio, tra cui la proteina Bad, che, nel suo stato non fosforilato, promuove la morte cellulare mediante apoptosi. (FIGURA 7)

Una volta attivata, la trasduzione del segnale permane finché è presente l'interazione fra recettore e ligando e cessa con l'inattivazione del recettore, che può avvenire in maniera transitoria, per defosforilazione da parte di specifiche tiroxina-fosfatasi, oppure in maniera definitiva con l'internalizzazione mediante endocitosi del complesso recettore-ligando nei lisosomi e successiva degradazione³⁶.

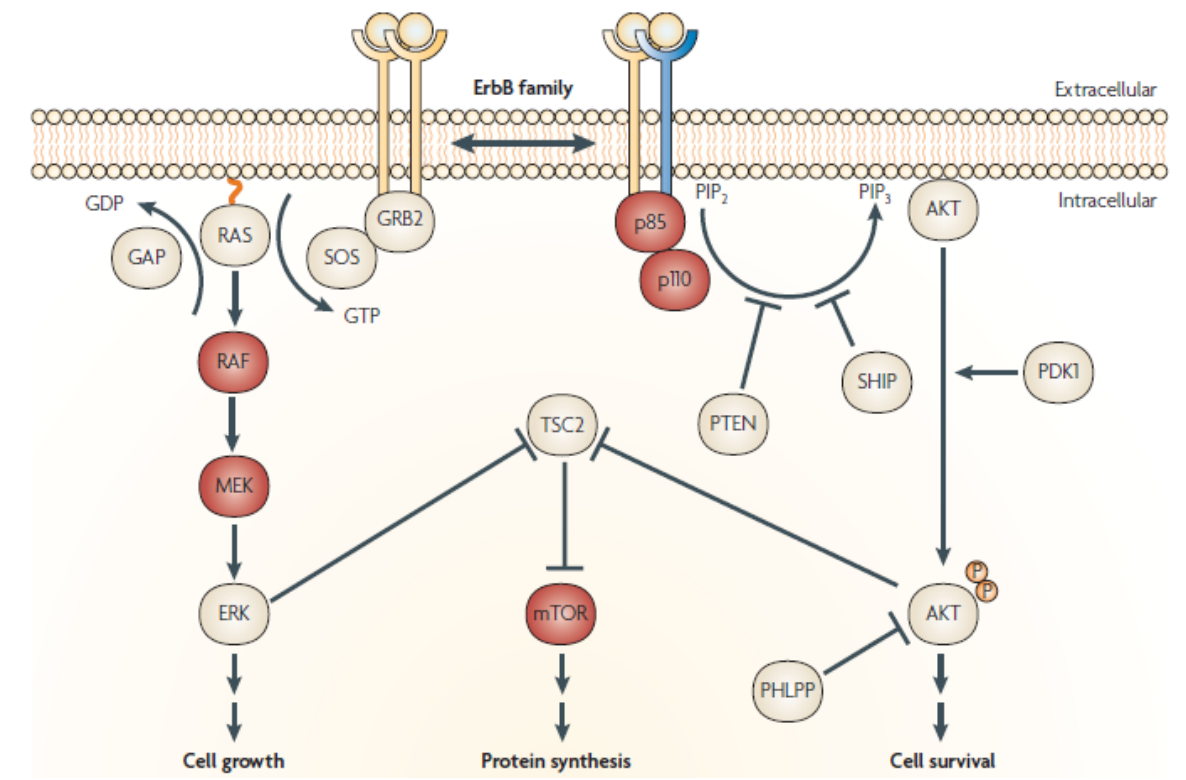


Figura 7. Rappresentazione schematica delle vie di trasduzione del segnale del recettore EGFR (da: Sharma et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Nat Rev Cancer. 2007)

KRAS: PICCOLA GTPasi MONOMERICA

La proteina KRAS (Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) appartiene alla superfamiglia RAS, che consiste di diverse famiglie di GTPasi monomeriche (RAS, RHO, ARF, RAB, RAN). Un singolo membro della famiglia Ras o Rho, interagendo con diverse proteine di segnalazione intracellulare, può diffondere il segnale in maniera coordinata lungo diverse vie di segnalazione a valle, funzionando pertanto come un centro di smistamento del segnale, cruciale per la proliferazione, la sopravvivenza e la differenziazione cellulare.

In particolare, nell’Uomo sono state identificate tre principali proteine Ras: H-Ras (Harvey-Ras), N-Ras (Neuroblastoma-Ras) e K-Ras (Kristen-RAS).

Nel genoma umano sono presenti due copie del gene KRAS, definite KRAS1 e KRAS2. La copia genica KRAS2 rappresenta la copia principale; infatti KRAS1 è un pseudogene che deriva da un processo di splicing alternativo di KRAS2. Rispettivamente, lo pseudo gene KRAS1 e il gene KRAS2 sono mappati sui cromosomi 6 e 12. In particolare, il gene KRAS2 si trova sul braccio corto del cromosoma 12 in posizione 12 (12p12) ed è costituito da 6 esoni. In seguito al processo di splicing alternativo a livello dell’esone 4, sono prodotte due forme di mRNA, con conseguente formazione di due differenti proteine definite KRAS4A e KRAS4B. L’esone 6 codifica per la regione carbossi-terminale della proteina KRAS4B (non presente, invece, in KRAS4A). KRAS4B è la forma proteica predominante; per questo motivo viene semplicemente definita KRAS. (FIGURA 8)

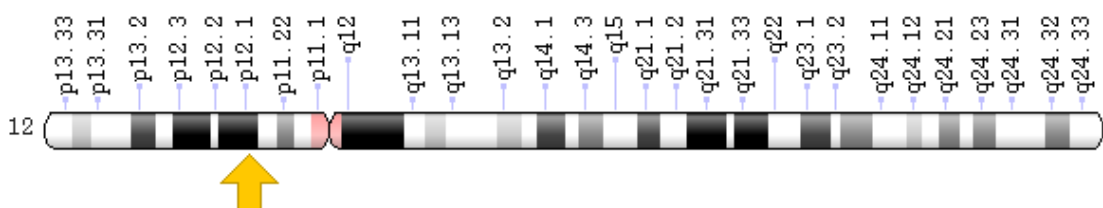


Figura 8. Rappresentazione schematica del gene KRAS

La proteina KRAS prodotta è costituita da 188 aminoacidi, con un peso molecolare di 21.6 kDA, e contiene 4 domini. Il primo dominio è costituito da 85 aminoacidi ed include la porzione amino-terminale. Il secondo dominio contiene 80 aminoacidi, ed insieme al primo dominio, costituisce una regione fondamentale per

la funzione di signalling assolta dalla proteina stessa. Congiuntamente, questi due domini formano il dominio-G, ossia la tasca di legame per il nucleotide guanilico (GTP/GDP). La regione compresa fra l'aminoacido 32 ed il 40 è essenziale per l'interazione tra gli effettori intracellulari e le proteine GAPs (discusse in seguito). Nella porzione carbossi-terminale, è presente una regione ipervariabile, che sembra guidare le modificazioni post-traslazionali e consentire l'ancoraggio della proteina stessa alla membrana plasmatica³⁷ (FIGURA 9).

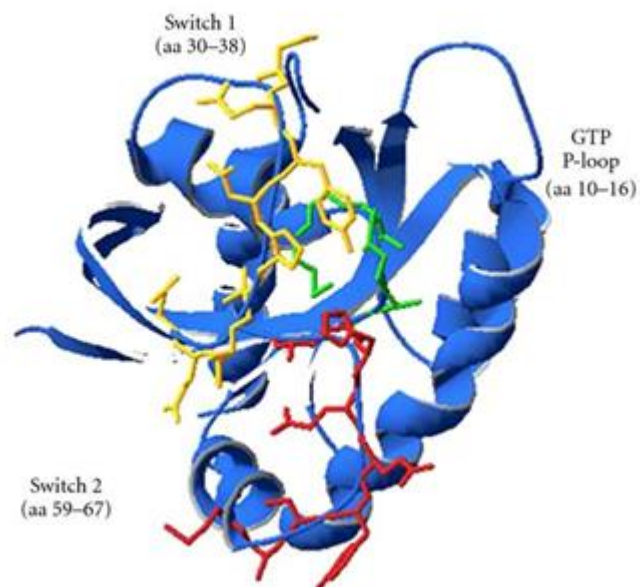


Figura 9. Struttura della proteina KRAS (da: Jančik, et al. Clinical relevance of KRAS in human cancers. J Biomed Biotechnol, 2010).

KRAS funziona come un interruttore molecolare, alternando fra due stati conformazionali distinti, inattivo quando è legato GDP e attivo quando è legato GTP. Lo switch dalla forma inattiva alla forma attiva è regolato da due classi di proteine di segnalazione: i *fattori di scambio del nucleotide guanilico specifici per RAS* (**RAS-GEFs** o **SOS**) – stimolano la dissociazione di GDP e, quindi, l'assunzione di GTP dal

citosol, attivando la proteina – e le *proteine che attivano le GTPasi specifiche per RAS* (**RAS-GAPs**) – aumentano la velocità di idrolisi del GTP legato da parte di KRAS, inattivandola.

Così, l'attivazione di un recettore tirosina chinasi (ad es. EGFR), mediante il legame del proprio ligando (ad es. EGF), attiva la proteina RAS-GEF SOS, attraverso la proteina adattatrice **Grb-2**, che può così stimolare la proteina KRAS a sostituire il GDP legato col GTP.

La piccola GTPasi, una volta attivata, ha solitamente breve vita. Difatti, le RAS-GAPs inducono velocemente l'inattivazione di KRAS, idrolizzando il GTP a GDP.

Pertanto, tali eventi di segnalazione a breve vita devono essere convertiti in segnali di durata maggiore, in modo tale da poter essere trasmessi a valle del nucleo e consentire la proliferazione o la differenziazione cellulare. Uno dei meccanismi chiave utilizzato proprio a questo scopo è il sistema di proteine definito *modulo della proteina chinasi attivata da mitogeni* (sistema MAPK). Questo sistema è formato da 3 componenti principali, tutte proteina chinasi. La prima ad essere reclutata da KRAS è la proteina RAF (o MAP chinasi chinasi chinasi, MAPKKK), che a sua volta fosforila ed attiva MEK (o MAP chinasi chinasi, MAPKK). La chinasi finale della serie, attivata da MEK, si chiama ERK (o MAP chinasi, MAPK), che a sua volta fosforila varie proteine a valle, comprese altre proteine chinasi, oltre che proteine che regolano geni nel nucleo coinvolti nell'indurre la proliferazione, la sopravvivenza o il differenziamento cellulare (FIGURA 10)³⁶.

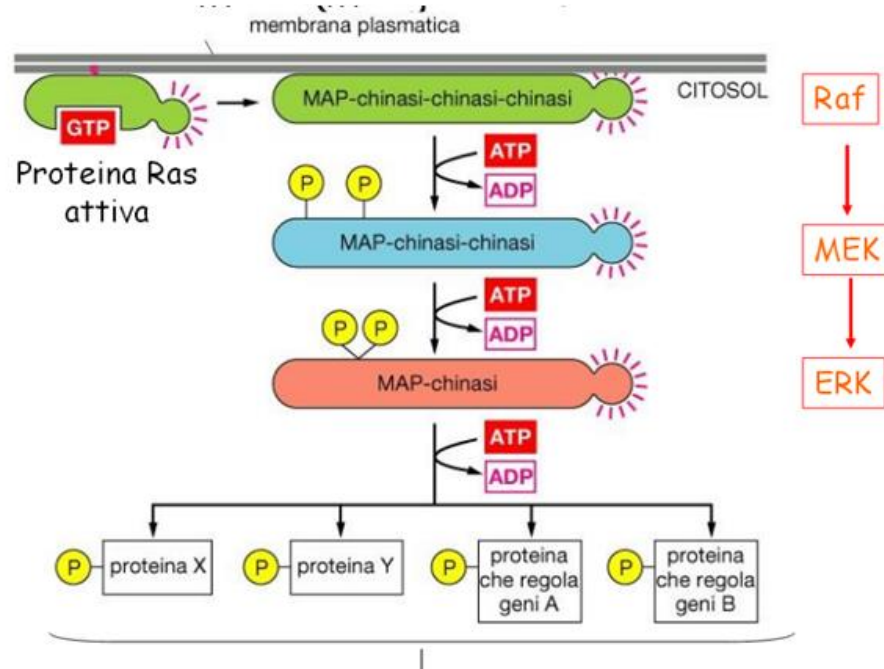


Figura 10. Segnali intracellulari collegati a KRAS (modificata da: Alberts, Biologia molecolare della cellula)

LE MUTAZIONI DI EGFR SENSIBILI ALLA TERAPIA MIRATA

Le mutazioni a carico del gene *EGFR* in pazienti affetti da NSCLCs sono state caratterizzate nel 2004 e ad oggi rappresentano l'esempio maggiormente studiato di alterazioni oncogeniche, con una prognosi più favorevole rispetto ai tumori *EGFR-wild type*³⁸.

Tra le principali mutazioni identificate nel gene *EGFR*, ci sono quelle localizzate a carico di quattro esoni (18-21), che codificano una porzione del dominio tirosin-chinasico (l'intero dominio chinasi è codificato dagli esoni 18-24), e sono raggruppate attorno alla tasca di legame per l'ATP³⁹ (FIGURA 11).

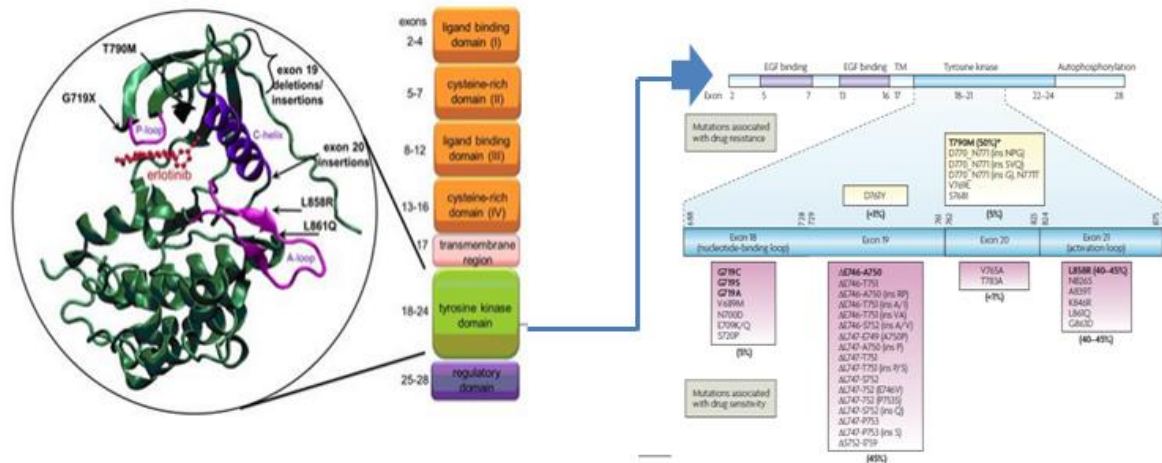


Figura 11. Le principali mutazioni identificate nel gene *EGFR* (modificato da: Jorge SE, Kobayashi SS, Costa DB. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer: preclinical and clinical data. Braz J Med Biol Res. 2014; Sharma et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Nat Rev Cancer. 2007)

In particolare, tra queste alterazioni genomiche, quelle maggiormente caratterizzate sono le cosiddette mutazioni "attivanti", in quanto sembrano essere implicate in un aumento dell'attività tirosin-chinasica del recettore. Le principali sono:

- le **delezioni in-frame nell'esone 19** (circa 45%), intorno ai residui aminoacidici 747-750;
- la **mutazione puntiforme p.L858R** nell'esone 21 (40-45%), che vede la sostituzione della leucina in posizione 858 con l'arginina;
- altre mutazioni meno comuni localizzate in altri esoni: EX20INS (inserzione in-frame nell'esone 20), p.L861Q (sostituzione della leucina in posizione 861 con la glutammina), p.G719X (sostituzione della glicina con un altro aminoacido, come la cisteina o la serina), p.S768I (sostituzione della serina con l'isoleucina). Queste mutazioni costituiscono circa il 5% della casistica³⁹.

Le mutazioni attivanti di EGFR rappresentano un determinante biologico critico per la scelta della terapia appropriata nei pazienti con tumore del polmone: infatti, esse si sono rivelate essere il più importante fattore predittivo di risposta ai farmaci biologici, quali gli inibitori delle tirosin chinasi (TKIs). Tali alterazioni geniche modificano il sito di legame per l'ATP del recettore, aumentandone l'affinità per i TKIs a discapito dell'ATP³⁹.

La mutazione clinicamente più rilevante nell'esone 20 è la **p.T790M**, che, a differenza delle alterazioni trattate in precedenza, viene definita mutazione di "resistenza", in quanto implicata nella mancata risposta ai farmaci TKIs.

Tale alterazione genomica si verifica in circa il 50% dei casi trattati con i TKIs³⁹.

Si tratta di una mutazione puntiforme che consiste nella sostituzione della treonina con una metionina in posizione 790 nell'esone 20. La treonina 790 viene chiamata residuo "gatekeeper", a causa della sua posizione all'ingresso della tasca idrofobica nella parte posteriore al sito di legame dell'ATP, rendendola un importante determinante della specificità degli inibitori delle proteine chinasi. La sua sostituzione con un residuo di metionina, molto più voluminoso, crea un ingombro sterico che interferisce nel legame dei TKIs, portando al blocco dell'azione dei suddetti farmaci. La p.T790M aumenta l'affinità dell'ATP per il dominio tirosin-chinasico di EGFR, portando di conseguenza ad un calo del legame dei TKIs. in quanto agenti ATP-competitivi⁴⁰.

LE MUTAZIONI DI KRAS COME ULTERIORE MECCANISMO DI RESISTENZA ALLA TERAPIA MIRATA

Approssimativamente, il 15-25% dei pazienti affetti da NSCLC presenta mutazioni a carico del gene *KRAS* (^{MUT}KRAS)⁴¹. In particolare, si tratta di mutazioni puntiformi localizzate nel codone 12 dell'esone 2 del gene, così come quelle che riguardano i codoni 13 o 61. Le mutazioni puntiformi provocano una perdita dell'attività intrinseca GTPasica della proteina, che porta ad una continua attivazione del segnale RAS.⁴¹ Sono state osservate maggiormente nella popolazione non-asiatica (Africani, americani e bianchi caucasici) piuttosto che negli asiatici⁴¹.

La sovrapposizione tra le mutazioni di EGFR e KRAS si presenta in meno dell'1% dei pazienti con tumore del polmone. Le mutazioni di KRAS sono associate ad una resistenza intrinseca agli EGFR-TKIs, per cui il loro rilevamento potrebbe essere usato per la selezione di pazienti come candidati per la terapia con EGFR-TKI⁴¹.

TRATTAMENTI DI "NUOVA GENERAZIONE"

Il tumore del polmone prevede una valutazione terapeutica multidisciplinare. La chirurgia, la radioterapia e la chemioterapia possono essere utilizzate singolarmente o in combinazione a seconda dell'istotipo tumorale, dello stadio della malattia, dell'età e dello stato di salute generale del paziente¹³.

Nel NSCLC, l'approccio terapeutico consiste nella resezione chirurgica (eventualmente preceduta e/o seguita da chemioterapia) limitata però ai soli stadi iniziali ed a eventuali lesioni localmente avanzate (stadio III A)^{42,43}.

Tuttavia, alla diagnosi la maggior parte dei pazienti presenta una malattia avanzata o metastatica (stadio III B e IV). In questi casi l'approccio terapeutico si basa essenzialmente, sull'associazione tra più linee poli-chemioterapiche e di terapia radiante concomitante o sequenziale: l'outcome (inteso come sopravvivenza, intervallo libero da progressione di malattia e qualità di vita) di questi pazienti appare insoddisfacente, con tassi di sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi per lo stadio IV di meno dell'1%^{27,28}.

In Europa, l'associazione più comunemente utilizzata è cisplatino-gemcitabina seguita da cisplatino-vinorelbina e cisplatino-docetaxel, mentre negli Stati Uniti lo schema più utilizzato è carboplatino-paclitaxel. Con questi regimi terapeutici il tasso di risposte obiettive in pazienti con malattia avanzata è intorno al 25-35%, la percentuale di sopravvivenza ad un anno del 30-40% e la mediana di sopravvivenza di circa 8-9 mesi^{27,28}.

Nel corso degli ultimi anni, grazie ad una migliore comprensione dei processi cellulari e molecolari alla base della biologia del tumore e della diffusione metastatica, si è registrato lo sviluppo di nuove molecole dotate di particolari meccanismi d'azione, in grado d'interferire in maniera selettiva con la cellula tumorale, bloccandone la proliferazione. Questi nuovi farmaci, definiti "biologici" in quanto indirizzati verso target molecolari specifici diversi da quelli tradizionali della chemioterapia, hanno dimostrato, in esperienze precliniche, interazioni favorevoli con le associazioni chemioterapiche classiche¹³.

I farmaci biologici agiscono prevalentemente con un meccanismo citostatico e non citotossico; nonostante ciò, la capacità di interferire con i processi di proliferazione cellulare ed antiapoptotici determina, nei pazienti sensibili, una più rapida regressione della malattia di quanto comunemente osservato con la chemioterapia tradizionale¹³.

Per il carcinoma del polmone assumono particolare importanza le alterazioni molecolari dell'EGFR. Nei tessuti normali l'espressione e la funzione del recettore EGFR sono finemente regolate. Un'alterazione della regolazione dell'attività del recettore e quindi la rottura dell'equilibrio tra processi di crescita e di morte cellulare con sbilanciamento a favore dell'iperproliferazione cellulare può rappresentare quindi l'input allo sviluppo dei tumori⁴⁴. L'abnorme attività del recettore è strettamente connessa ad un'eccessiva produzione del ligando o del recettore (iperespressione) o alla presenza di mutazioni che ne determinano un'attivazione costitutiva⁴⁴.

Sono state sviluppate due strategie terapeutiche per inibire l'EGFR, utilizzando farmaci biologici (FIGURA 12):

- una utilizza anticorpi monoclonali (mABS), come il *cetuximab* ed il *panitumumab*, che colpiscono il dominio extracellulare del recettore, bloccando di conseguenza il sito di legame con il ligando e, quindi, inducendo inibizione;
- l'altra determina il blocco dell'attivazione dell'EGFR mediante l'impiego di piccole molecole, definite inibitori delle tirosine chinasi (**Tyrosine Kinase Inhibitors, TKIs**), quali *gefitinib*, *erlotinib*, *afatinib*, *osimertinib*, in grado di legarsi alla tirosin-chinasi del recettore, che è l'enzima responsabile della trasduzione del segnale post-recettoriale all'interno della cellula⁴⁵.

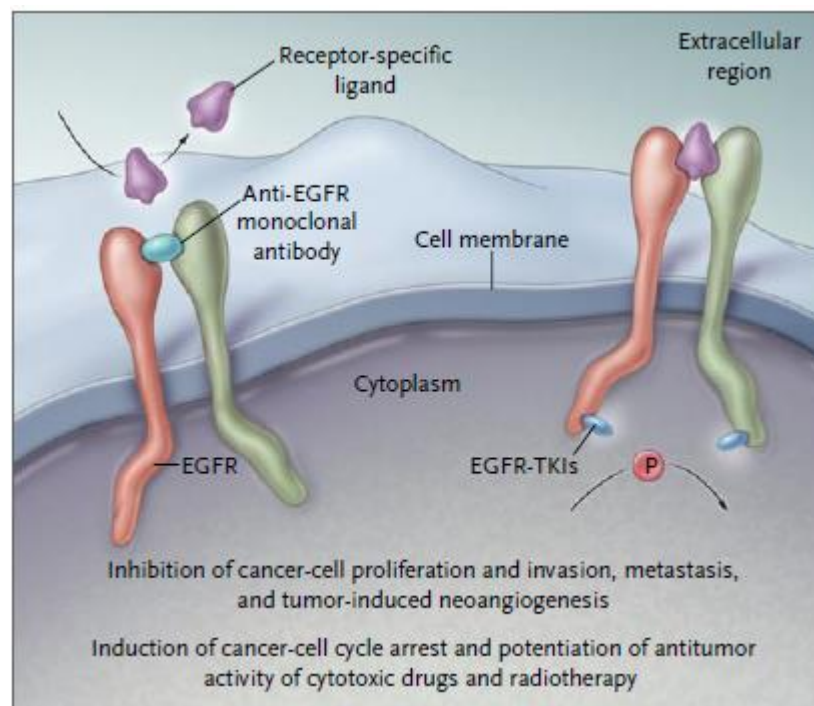


Figura 12. Meccanismo d'azione dei farmaci anti-EGFR (da: Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. N Engl J Med. 2008)

In particolare, i pazienti affetti da NSCLC vengono trattati con i TKIs in presenza delle specifiche mutazioni che determinano un'attivazione costitutiva dell'EGFR. Questi farmaci biologici agiscono come inibitori competitivi del legame dell'ATP con il sito attivo chinasi di EGFR, impedendo la fosforilazione continua e quindi la trasduzione del segnale a valle.

Le mutazioni "attivanti" nel dominio tirosin-chinasico (esoni 18-21) del gene di EGFR sono predittive di una risposta favorevole a tali farmaci e sono associate ad una buona prognosi. Tali alterazioni geniche modificano il sito di legame per l'ATP del recettore, aumentandone l'affinità per i TKIs a discapito dell'ATP (FIGURA 13).

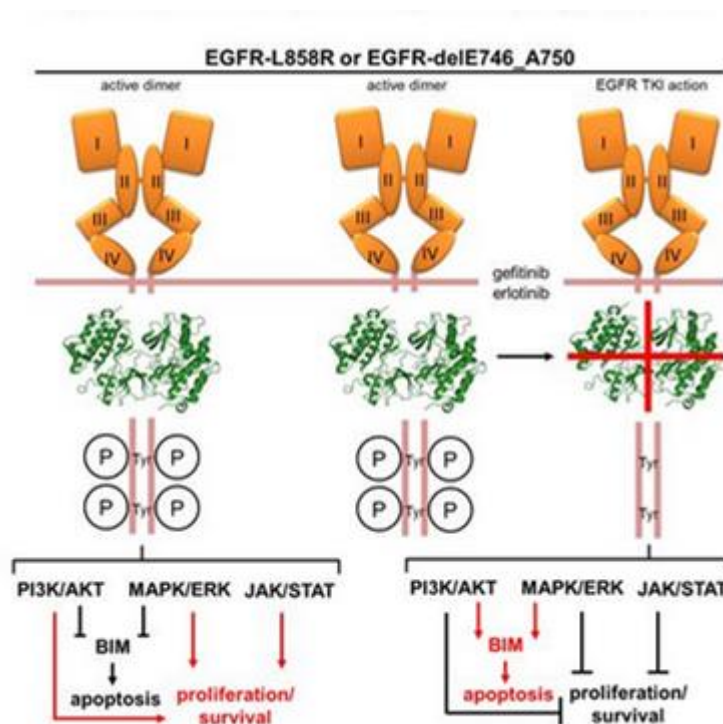


Figura 13. Meccanismi di attivazione costitutiva del recettore EGFR in presenza delle mutazioni attivanti a carico del gene EGFR e sua inibizione attraverso TKIs (da: Jorge SE, Kobayashi SS, Costa DB. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer: preclinical and clinical data. Braz J Med Biol Res. 2014)

Altri fattori predittivi di risposta sono il genere femminile, l'etnia asiatica e lo stato di non-fumatori.⁴⁵ Spesso tali farmaci vengono associati all'uso di antiangiogenici, che intervengono sulla vascolarizzazione del tumore in crescita, come il bevacizumab (inibitore del fattore di crescita dell'endotelio vascolare, VEGF), mostrando una maggiore efficacia rispetto alla monoterapia⁴⁶.

Pazienti con mutazioni di EGFR vengono sottoposti ad una prima linea di trattamento con gefitinib (o erlotinib o afatinib). Qualora avessero già iniziato la chemioterapia prima di aver identificato la mutazione, si deve interrompere o affiancare a gefitinib (o erlotinib o afatinib). In caso di progressione della malattia si procede con un ulteriore trattamento con TKIs: gefitinib oppure erlotinib oppure afatinib (NCCN Guidelines Version 4.2015).

Gli studi clinici quali IPASS, OPTIMAL, e EURTAC, LUX-Lung 3 e 6 hanno confermato la netta superiorità dei farmaci TKIs rispetto alla chemioterapia standard a base di platino nei pazienti con mutazioni di EGFR⁴⁷⁻⁵⁰.

Inoltre, questi nuovi farmaci presentano un profilo di tossicità estremamente più tollerabile rispetto ad una chemioterapia standard e caratterizzato in prevalenza da diarrea e rash cutaneo⁴⁷⁻⁵⁰.

Resistenza acquisita ai TKIs

I meccanismi alla base dell'instaurarsi di resistenza acquisita verso una certa categoria di farmaci si possono dividere in due classi:

- Alterazione del gene-bersaglio, in seguito a mutazione oppure amplificazione dello stesso, che porta ad una limitata azione della molecola nell'inibire la chinasi. In presenza del farmaco, la chinasi rimane attiva e trasmette un segnale aberrante. L'esempio principale è rappresentato dalla mutazione "di resistenza" p.T790M di EGFR⁵¹.
- Attivazione di vie alternative di trasduzione del segnale, che non necessitano dell'attivazione da parte della molecola-bersaglio dei farmaci. Come esempio, nel 5-10% dei casi resistenti agli EGFR-TKIs, la resistenza è mediata dall'amplificazione di c-MET, che attiva il segnale intracellulare indipendentemente da EGFR, permettendo alle cellule resistenti di crescere nonostante l'inibizione di EGFR⁵¹.

La resistenza acquisita ai farmaci TKIs è purtroppo un evento inevitabile che si verifica dopo circa 8-12 mesi di trattamento e viene distinta dalla resistenza primaria, sostenuta invece dall'assenza delle mutazioni attivanti di EGFR o dalla presenza di altre mutazioni a carico di geni diversi, tra cui KRAS⁵². Tale evento sarebbe da ascrivere all'insorgenza, sotto la pressione selettiva dei TKIs, di cloni caratterizzati da aberrazioni genomiche che conferiscono alle cellule neoplastiche la capacità di proliferare e sopravvivere nonostante la presenza del farmaco⁵³.

La ricerca ha studiato pazienti progrediti a TKIs per individuare, tramite re-biopsia alla progressione e successiva caratterizzazione molecolare, le alterazioni genomiche responsabili della resistenza.

La resistenza acquisita può essere dovuta ai seguenti meccanismi (FIGURA 14):

- mutazione p.T790M sull'esone 20 di EGFR (63%);
- amplificazione del gene che codifica per MET (5%);
- amplificazione del gene che codifica per HER2 (13%);
- trasformazione istologica in piccole cellule (3%);
- mutazione di PIK3CA;
- transizione epiteliale-mesenchimale (EMT);

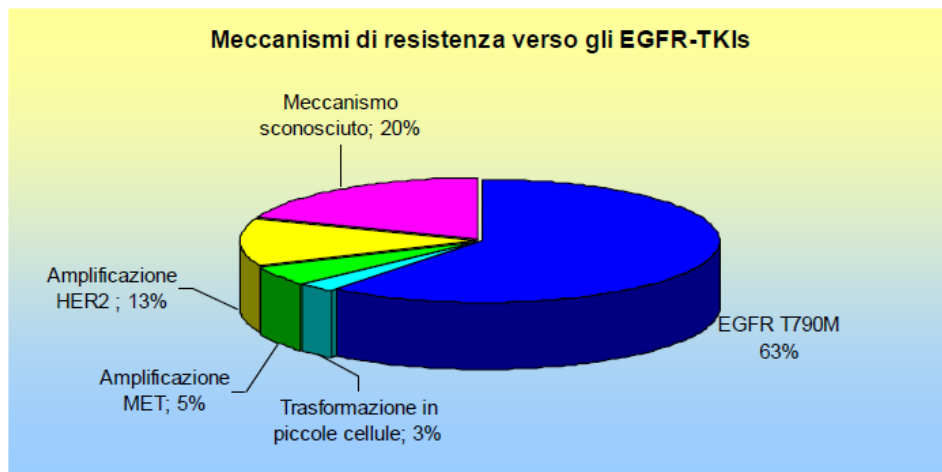


Figura 14. Mutazioni che conferiscono resistenza agli EGFR-TKIs

Un terzo di questi meccanismi rimane tuttora sconosciuto (20%). La sovrapposizione di più meccanismi di resistenza acquisita si ritrova nel 4% dei casi³¹.

La mutazione di resistenza p.T790M, la più frequente, interferisce con la capacità dei TKIs di prima generazione, quali gefitinib, erlotinib o afatinib, di legarsi al sito ATPasico (FIGURA 15) e quindi di svolgere la loro attività inibitoria e sarebbe

associata, rispetto ad altri meccanismi di resistenza, ad una miglior prognosi in quanto i pazienti portatori hanno presentato una minor incidenza di nuovi siti metastatici, miglior performance status e maggiore sopravvivenza⁵⁴.

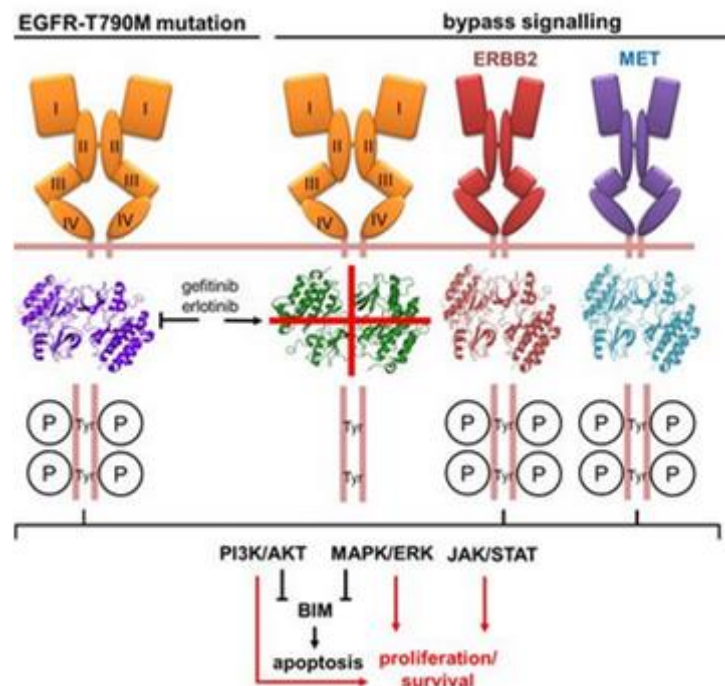


Figura 15. Meccanismi di resistenza acquisita a EGFR-TKIs (da: Jorge SE, Kobayashi SS, Costa DB. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer: preclinical and clinical data. Braz J Med Biol Res. 2014)

Alcune pubblicazioni hanno evidenziato come la p.T790M possa essere presente anche all'esordio della malattia, associata alla presenza della mutazione attivante definendo un quadro a peggior outcome e deponendo a favore dell'ipotesi che il clone di cellule p.T790M positive possa essere presente in fasi precoci della malattia e accrescersi quantitativamente sotto la pressione selettiva del farmaco⁵⁵.

Attualmente non ci sono trattamenti standard per i pazienti che hanno sviluppato resistenza agli inibitori della tirosin-chinasi di EGFR⁴⁰.

Pertanto, sono state proposte diverse strategie terapeutiche per trattare questa tipologia di pazienti:

1. La chemioterapia, come seconda linea di trattamento, è comunque una scelta ragionevole, nonostante la mancanza di evidenze prospettiche per questa categoria di pazienti. Studi hanno dimostrato un 15% di tasso di risposta (RR) e circa 4 mesi di sopravvivenza libera da progressione (PFS) nei pazienti con EGFR mutato, che hanno effettuato una chemioterapia dopo trattamento con erlotinib⁴⁰.
2. I TKIs di prima generazione (gefitinib ed erlotinib) sono degli inibitori reversibili ATP-competitivi, che possono essere nuovamente impiegati dopo un periodo di interruzione della terapia (tempo medio 11 mesi, ASCO 2012 meeting) oppure possono essere associati alla chemioterapia, in entrambi i casi si ottiene un effetto modesto⁴⁰.
3. I TKIs di seconda generazione sono farmaci con azione irreversibile ed una più alta affinità alla tirosina chinasi, ciò comporta un blocco più duraturo del segnale. Inoltre tali sostanze andando ad inibire il pan-HER (pan-human epidermal receptor), bloccano la via del segnale indotto da EGFR più esaustivamente. In vitro è stata inoltre dimostrata una loro attività contro la mutazione p.T790M. Di questa seconda generazione di EGFR-TKIs fanno parte: neratinib, dacomitinib e afatinib. I TKIs di seconda generazione hanno

mostrato effetti promettenti nei modelli preclinici, ma un'attività limitata nei trials clinici di pazienti con resistenza acquisita, a causa della loro tossicità⁴⁰.

4. I TKIs di terza generazione sono ancora in via di studio e di questa classe fa parte osimertinib, un inibitore orale potente, selettivo e irreversibile. Ha dimostrato attività anti-tumorale verso EGFR anche a basse dosi, pur alzando il dosaggio da 20 a 160 mg al giorno non è comparsa tossicità.⁴⁰

SCOPO DELLA TESI

Scopo del presente studio è di analizzare l'andamento nel tempo delle alterazioni molecolari attivanti e della comparsa di mutazioni secondarie responsabili di resistenza in pazienti con neoplasia polmonare in trattamento con target therapy, al fine di ottimizzare il trattamento antineoplastico. A tal riguardo, l'analisi del ctDNA isolato dal plasma di pazienti affetti da NSCLC verrà condotta con sistema droplet digital PCR™ QX100™ (ddPCR), che permetterà un'analisi estremamente sensibile e precisa degli acidi nucleici, consentendo la rilevazione di alleli mutati che differiscono per un singolo nucleotide e l'analisi di espressione genica.

MATERIALI E METODI

Pazienti

I pazienti coinvolti nello studio sono stati reclutati presso i reparti delle Oncologie mediche di Pisa e di Parma, previa adesione mediante consenso informato scritto all'interno di un protocollo di validazione di un metodo per l'analisi del ctDNA dal Comitato Etico per la Sperimentazione clinica dei Medicinali dell'Azienda Ospedaliera-Universitaria Pisana.

Nello studio retrospettivo di validazione del metodo per l'estrazione del DNA tumorale circolante da biopsia liquida e successiva analisi condotta con sistema droplet digital PCR™ QX100™ sono stati reclutati 33 pazienti con tumore del polmone a progressione di malattia.

Nello studio prospettico, invece, ad oggi sono stati reclutati 21 pazienti con tumore del polmone, portatori di una tra le mutazioni di EGFR (riscontrate a livello del tessuto primario del tumore o delle metastasi).

Raccolta e conservazione dei campioni

La partecipazione allo studio consiste nella donazione di 8 ml di sangue impiegato per l'analisi del genotipo; il sangue intero viene raccolto in un contenitore sterile tipo Vacutainer® contenente sodio EDTA e mantenuto a 4°C. Tutti i campioni ematici, prima di essere spediti alla U.O. Farmacologia Clinica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana (AOUP), vengono processati per la separazione del plasma e recapitati una volta congelati.

Trattamento dei campioni

I campioni di sangue raccolti in una soluzione anticoagulante sono stati elaborati entro 2 h dalla raccolta per evitare di danneggiare le cellule nucleate del sangue ed il rilascio del loro DNA. Il plasma è stato separato dalla frazione cellulare tramite 2 centrifugazioni per eliminare ogni eventuale contaminazione cellulare: la prima a 3000 g x 10 minuti da cui il plasma è stato prelevato per essere ulteriormente centrifugato a 4000 g x 5 minuti. Dopo le due centrifugazioni il plasma è stato isolato avendo cura di non prendere i detriti cellulari, e le aliquote sono state messe in tubi da 25 ml. Il plasma estratto, se non analizzato immediatamente, è stato conservato a -20°C.

Estrazione del DNA tumorale circolante

L'estrazione del DNA (frammenti di dimensione inferiore a 1000 b.p.) è stata fatta a partire da un volume di 3 ml di plasma tramite l'utilizzo del kit commerciale QIAamp® Circulating Nucleic Acid (Qiagen). Ai 3 ml di plasma presenti nei tubi, sono stati aggiunti 300 µl di QIAGEN proteasi K e 2,4 ml di Buffer ACL (precedente composto con RNA carrier, che migliora l'associazione degli acidi nucleici alla membrana QIAamp Mini. Per ottenere i massimi livelli di sensibilità in reazioni di amplificazione, può essere necessario ridurre la quantità di RNA carrier aggiunto al Buffer ACL). Aggiunti tutti i componenti, i campioni sono stati agitati su vortex per 30 secondi ed incubati a 60°C per 30 min, permettendo la fase lisi. Gli acidi nucleici liberi

che circolano nei fluidi biologici sono solitamente associati a proteine o avvolti in vescicole, e richiedono un passo efficace di lisi per rilasciare il DNA. I campioni vengono lisati sotto le condizioni altamente denaturanti di temperatura elevata e presenza di proteasi K e Buffer ACL, che insieme garantiscono l'inattivazione delle DNAsi e delle RNAsi e il rilascio di acidi nucleici da vescicole, lipidi e proteine associate. Dopo aver ricollocato il tubo sul banco di laboratorio sono stati aggiunti 5,4 ml di tampone ACB e i campioni sono stati resi omogenei tramite lento mescolamento, evitando la formazione di schiuma. I campioni sono stati poi incubati per 5 min nel ghiaccio. Durante questi 5 minuti di incubazione, per ciascun campione è stata assemblata una struttura, da posizionare sugli slot della pompa a vuoto QIAvac 24 plus, che conterrà il campione. La struttura è composta dalla VacValve, dal VacConnector, dalla VacMini Column e dal Tube extender; il tutto permetterà al campione di essere filtrato. La pompa a vuoto viene accesa per creare un vuoto a -900 mbar. Terminata l'incubazione nel ghiaccio i campioni vengono trasferiti nelle colonne poste sulla pompa e le valvole vengono aperte. Quando tutti i lisati sono stati filtrati, la pompa a vuoto viene spenta, tornando ad una pressione di 0 mbar. Gli acidi nucleici rimangono legati alla membrana di silice, mentre i contaminanti vengono efficacemente lavati via durante le 3 fasi di lavaggio che seguono. Vengono aggiunte all'interno della colonna QIAamp Mini 600 µl del Buffer di lavaggio ACW1 e viene nuovamente accesa la pompa. Dopo che i Buffer ACW1 sono stati filtrati, la pompa viene spenta di nuovo. A questo punto si aggiunge a ciascun campione, sempre all'interno della colonna QIAamp Mini, 750 µl

del Buffer di lavaggio ACW2 e si riaccende la pompa a vuoto. Dopo che anche i Buffer di ACW2 sono filtrati, la pompa viene di nuovo spenta. Adesso si aggiunge all'interno di ciascuna colonna QIAamp Mini, 750 µl di etanolo (96–100%), riaccendendo la pompa per l'ultima volta.

Dopo che tutto l'etanolo ha attraversato il filtro, la pompa viene spenta definitivamente. A questo punto la colonna QIAamp Mini viene tolta dalla pompa per essere posizionata nel suo serbatoio e centrifugata a 14.000 rpm (20.000 g) per 3 min. Dopo la centrifugazione, viene cambiato il serbatoio a ciascuna colonna Mini QIAamp, e aprendo il coperchio, inizia una fase di incubazione a 56°C per 10 min per asciugare completamente la membrana. Dopo l'incubazione, viene sostituito il serbatoio con una provetta sterile da 1,5 ml e vengono aggiunti 40 µl di Buffer di eluizione AVE al centro della membrana. Gli acidi nucleici circolanti puri vengono eluiti in Buffer AVE, a temperatura ambiente in 3 minuti. Dopodiché ogni campione viene centrifugato a 14.000 rpm (20.000 g) per 1 minuto per completare l'eluizione degli acidi nucleici.

Riassumendo possiamo dire che la procedura di purificazione degli acidi nucleici circolanti QIAamp comprende 4 fasi:

- deproteinizzazione del campione (lisi),
- trasferimento del campione in colonna per assorbimento (legame),
- rimozione di inibitori e di contaminanti (lavaggio),
- eluizione del DNA in un volume finale di 40 µl di buffer (eluizione).

I campioni contenenti il DNA vengono conservati in freezer a –20°C fino all'utilizzo.

Il protocollo permette di generare volumi di eluizione da 20 µl a 150 µl che contengono acidi nucleici purificati, privi di proteine, nucleasi e altre impurità. Se si necessita di più alte concentrazioni di acido nucleico, il volume di eluizione può essere ridotto fino a 20-30 µl. Il volume di eluizione basso conduce a eluati di acidi nucleici altamente concentrati. Per applicazioni a valle che richiedono piccoli volumi (per esempio, alcuni test PCR e RT-PCR), un eluato più concentrato può aumentare la sensibilità del dosaggio. Per applicazioni a valle che richiedono un maggiore volume di partenza, il volume di eluizione può essere aumentato fino a 150 µl. Tuttavia, un aumento nel volume di eluizione diminuisce la concentrazione degli acidi nucleici nell'eluato.

Analisi del DNA tumorale circolante

L'amplificazione e l'analisi del DNA tumorale circolante è stata effettuata anche con il sistema droplet digital PCR™ QX100™ (ddPCR Bio-Rad).

Il sistema ddPCR™ permette un'analisi degli acidi nucleici estremamente sensibile e precisa aiutando nella rilevazione di alleli mutati molto rari che differiscono per un singolo nucleotide e nell'analisi di espressione genica. Di particolare interesse per noi è il fatto che questo sistema fornisce una quantificazione assoluta delle molecole di DNA target mutato molto rare in presenza di un grande sfondo di DNA wild type.

Il sistema QX100 è costituito da due componenti, il droplet generator e il droplet reader.

Droplet generator

Il Droplet generator (generatore di gocce) ha la funzione di ripartire il campione, contenente il ctDNA target, in 20.000 goccioline delle dimensioni di nanolitri.

La ripartizione ha la funzione di ridurre la competizione tra il ctDNA e il DNA wt, aumentando la specificità e la sensibilità dell'analisi rispetto alla RT-PCR. In questo modo l'abbondanza relativa del DNA target mutato rispetto al wt viene aumentata.

Viene preparata la miscela da inserire nel droplet generator combinando:

- i primers Forward e Reverse ed i probes 20X marcati Vic, FAM o HEX;
- l'acqua distillata;
- 4 µl di ctDNA campione;
- iTaq™ universal SYBR® Green supermix concentrata 2x, che contiene: la iTaq DNA polimerasi, dNTPs, MgCl₂, SYBR® Green, esaltatori, stabilizzatori e una miscela di riferimento passivo di coloranti (compresi ROX e fluoresceina).

Le miscele di reazione sono state brevemente mescolate al vortex, evitando la formazione di bolle, e microcentrifugate per 20 sec, per poi essere mantenute nel ghiaccio fino all'inizio della generazione delle gocce.

Possono essere preparati fino a 8 campioni per volta. Per ciascun campione 20 µl della nostra miscela di reazione vengono messi nei pozzetti della piastra del *droplet generator*.

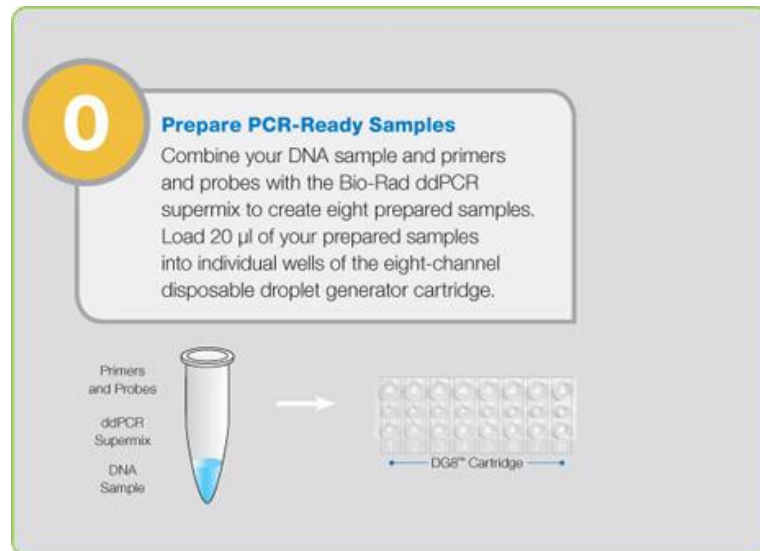


Figura 16. Preparazione dei campioni, piastra del Droplet Generator

La cartuccia, che verrà posizionata all'interno del droplet generator, possiede 3 file di 8 pozzetti: ci sono 8 pozzetti centrali (middle wells) ciascuno dei quali conterrà i 20 µl della nostra miscela di reazione, ci sono 8 pozzetti in basso (bottom wells) ciascuno dei quali conterrà i 70 µl di olio che permetteranno la formazione delle gocce e poi ci sono gli 8 pozzetti in alto (top wells) che rimangono per adesso vuoti, in cui andranno le gocce che si formeranno.

Una volta inseriti tutti i reagenti, la cartuccia viene coperta con l'apposito tappetino, per essere inserita nel droplet generator entro due minuti.

Il QX100 droplet generator usa i microfluidi per combinare i campioni oleosi e acquosi generando 20.000 gocce della grandezza di nanolitri al termine della corsa.



Figura 17. Meccanismo di formazione delle gocce

Il numero delle molecole di ctDNA target presenti possono essere calcolate dalla frazione di reazioni positive all'end-point, usando la statistica di Poisson secondo l'equazione:

$$\lambda = -\ln(1-p)$$

dove λ è il numero medio di molecole di DNA target replicate per reazione e p è la frazione di reazioni positive all'end-point. Utilizzando λ , insieme al volume di ogni replicazione di PCR e con il numero totale di replicazioni analizzate, è possibile calcolare una stima assoluta della quantità di DNA target presente.

A questo punto 40 μ l di gocce di ciascun campione vengono trasferite dai pozzetti della cartuccia del droplet generator all'interno dei pozzetti di una piastra da PCR (piastra da 96 pozzetti). La piastra da PCR viene poi ricoperta con un film resistente al calore che salda i pozzetti.

Le goccioline vengono adesso amplificate mediante 40 cicli termici grazie ad un termociclatore standard.

Il profilo termico a cui vengono sottoposti i campioni è il seguente:

- 10 minuti a 95°C
- 40 cicli in cui si ripetono:

1) fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi;

2) annealing e sintesi a 60°C per 1 minuto

- 98°C per 10 minuti
- 12°C all'infinito.

Il DNA presente in ciascuna goccia viene così amplificato indipendentemente.

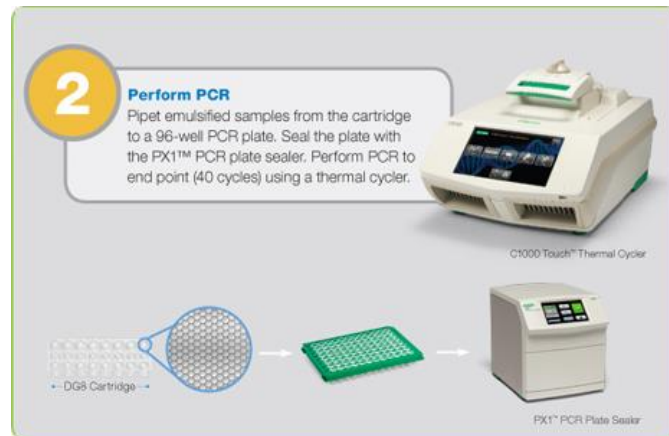


Figura 18. Meccanismo di amplificazione del DNA contenuto nelle gocce mediante ddPCR

Droplet reader

Dopo l'amplificazione, la piastra da 96 pozzetti viene collocata all'interno del QX100 droplet reader, il secondo componente della ddPCR, che legge ciascun

pozzetto della piastra indipendentemente. Le singole gocce di ciascun campione vengono fatte scorrere in fila una dietro l'altra a livello di un rilevatore di fluorescenza. Il rivelatore legge le gocce in serie e in base alla fluorescenza segna quelle che contengono il DNA target e quali no. QX100 ddPCR permette così il rilevamento e la quantificazione di alleli mutati e wt all'interno di ogni singolo campione.

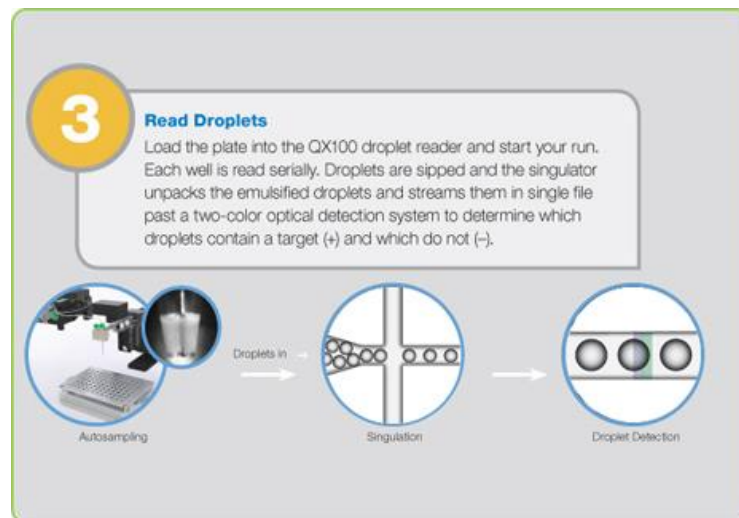


Figura 19. Meccanismo di lettura della fluorescenza da parte del Droplet Reader

Il lettore è connesso ad un computer che possiede il software "QuantaSoft" (BioRad). Il software fornisce un set completo di strumenti per l'impostazione e la denominazione dei campioni, per l'esecuzione e il controllo dello strumento e per l'analisi dei risultati. Grazie al software potremo trasformare il segnale da analogico a digitale e rilevare le gocce negative e positive in ciascun campione grazie alle varie fluorescenze lette. Le goccioline negative (prive del DNA target e/o del reference) e quelle positive (che hanno uno o entrambi i DNA), vengono contate. La frazione di gocce positive in un campione determina la concentrazione del DNA target espresso

in "copie/ μ l". Questo sistema ha una sensibilità dello 0,001%; molto più alta della RT-PCR.



Figura 20. Analisi dei risultati

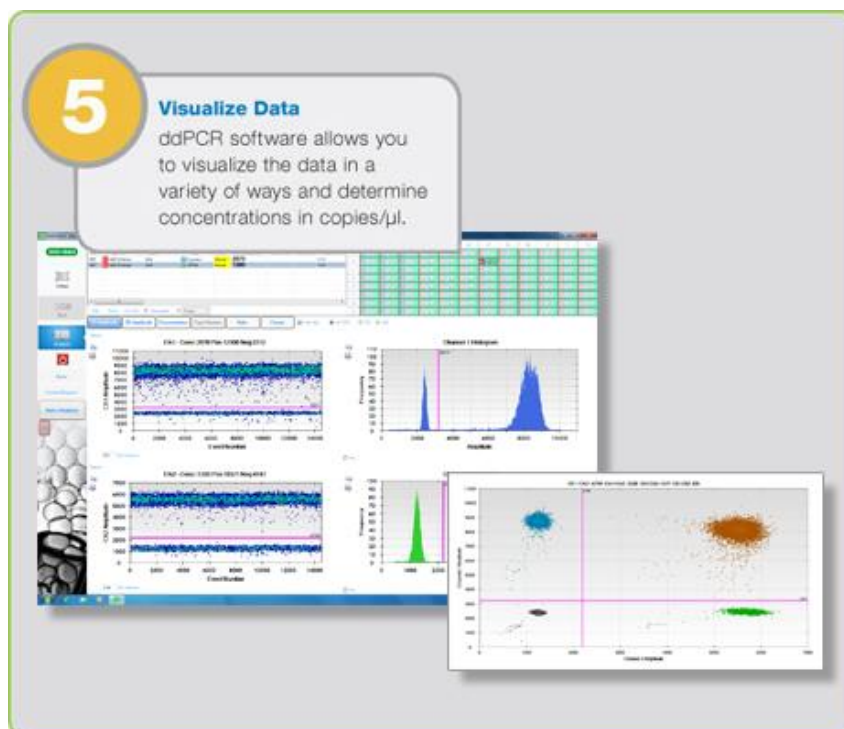


Figura 21. Visualizzazione dei dati

RISULTATI

Studio retrospettivo: validazione del metodo

Trentatré campioni di plasma raccolti da pazienti affetti da NSCLCs in progressione di malattia ed in trattamento con terapia target (gefitinib o erlotinib) sono stati sottoposti ad una prima fase di isolamento ed estrazione del ctDNA e ad una successiva analisi di genotipizzazione tramite ddPCR.

Lo studio retrospettivo ha evidenziato l'affidabilità della metodologia di isolamento e di estrazione del ctDNA da plasma, preventivamente separato dalla frazione cellulare tramite due centrifugazioni per eliminare ogni eventuale contaminazione cellulare, a partire da volumi di plasma compresi fra 1mL e 3ml. Seguendo le varie fasi descritte dal protocollo utilizzato, è stato possibile generare volumi di eluizione di 30 µl, a partire da volumi di plasma inferiori a 2 mL, e di 40 µl a partire da volumi di plasma superiori a 2.5 mL.

L'analisi del ctDNA estratto è stata condotta con la tecnologia della ddPCR per la ricerca del target mutato, relativamente sia alle mutazioni attivanti (ex19del, p.L858R, p.L747P e ex19ins) sia alla mutazione di resistenza (p.T790M) localizzate nel gene *EGFR*, come confermato dai risultati riportati in Tabella III.

Tabella III. Caratteristiche cliniche dei pazienti e mutazioni di EGFR

		N.(%)
Età (range)		62 (41-75)
Genere	maschio	13 (39.4%)
	femmina	20 (60.6%)
Abitudine al fumo	fumatori	2 (6.1%)
	non-fumatori	22 (66.7%)
	ex-fumatori	9 (27.2%)
Stadio	IIIB	1 (3%)
	IV	32 (97%)
Mutazioni attivanti EGFR	ex19del	20 (60.6%)
	p.L858R	10 (30.3%)
	p.L747P	2 (6.1%)
	ex19ins	1 (3%)
Linea di trattamento	1	23 (69.7%)
	2	6 (18.2%)
	≥3	4 (12.1%)
TKIs	gefitinib	27 (81.8%)
	erlotinib	6 (18.2%)
Risposta	CR	1 (3%)
	PR	22 (66.7%)
	SD	4 (12.1%)

	PD	6 (18.2%)
Mesi TTP (95% CI)		13.6 (8.0 – 19.2)
Mesi OS (95% CI)		40.2 (25.8 – 54.7)

Abbreviazioni: TKI: tyrosine kinase inhibitor; CR: risposta completa; PR; risposta parziale; SD: stabilizzazione della malattia; PD: progressione della malattia; TTP: time to progression; OS: overall survival

La frequenza delle mutazioni attivanti a livello del gene *EGFR* è stata la seguente: 20 pazienti (60,6%) hanno mostrato la delezione nell'esone 19, 10 pazienti (30,3%) la mutazione puntiforme p.L858R nell'esone 21, 2 pazienti (6,1%) la mutazione puntiforme p.L747P nell'esone 19 e 1 paziente (3%) l'inserzione nell'esone 19.

Ventisette pazienti (81,8%) hanno ricevuto gefitinib e 6 (18,2%) erlotinib; il trattamento è stato somministrato come prima linea a 23 pazienti (69,7%) (di cui a 2 come mantenimento), come seconda linea a 6 (18,2%) e come terza linea o ulteriore a 4 pazienti (12,1%). La maggior parte dei pazienti (66,7%) hanno avuto una risposta parziale al trattamento con gli inibitori delle tirosine chinasi (TKIs) e solo 1 paziente ha mostrato una risposta completa. Una stabilizzazione della malattia è stata osservata in 4 pazienti (12,1%) e una progressione in 6 soggetti (18,2%). I pazienti nei quali è stata osservata una progressione della malattia, nonostante il trattamento con EGFR-TKI (gefitinib), hanno presentato il seguente profilo molecolare nelle lesioni neoplastiche primarie: la mutazione p.L747P e la delezione nell'esone 19 (n = 1 ciascuno) e la mutazione p.L858R (n = 4).

Inoltre, i campioni sono stati caratterizzati valutando nel ctDNA anche le mutazioni puntiformi più frequenti localizzate nel codone 12 del gene *KRAS* (^{MUT}*KRAS*). In particolare, 16 campioni (48,5%) sono risultati mutati. Oltre a questo, la mutazione di resistenza p.T790M è stata osservata in 24 pazienti (72,7%). È interessante notare, che 13 pazienti (39,4%) hanno presentato sia la ^{MUT}*KRAS* sia la mutazione p.T790M, mentre 3 soggetti (9,1%) solo ^{MUT}*KRAS* e 11 (33,3%) solo la p.T790M. Sei pazienti non hanno presentato alcuna mutazione. (FIGURA 22)

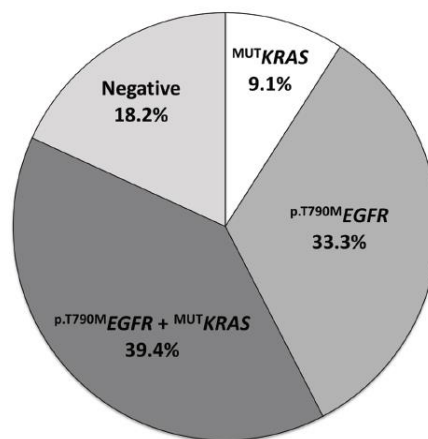


Figura 22. Frequenza (%) delle mutazioni in *KRAS* e della p.T790M in *EGFR* nel ctDNA di pazienti affetti da NSCLC e trattati con *EGFR*-TKIs

È stato possibile mettere a confronto il dato della re-biopsia con quello del ctDNA, per 8 pazienti. L'analisi delle re-biopsie attraverso metodi standard e ddPCR ha evidenziato la presenza della mutazione di resistenza p.T790M in 4 campioni (metodi standard) su 2 (ddPCR). La mutazione p.T790M è stata rilevata in 7 campioni di ctDNA. La concordanza tra tessuto (metodi standard) e plasma (ddPCR), calcolata combinando risultati positivi e negativi, è del 62,5% per la mutazione p.T790M. Inoltre, tre campioni trovati positivi per la p.T790M dalla re-biopsia (metodi standard)

e dal ctDNA (ddPCR), sono risultati negativi dalla ddPCR sul tessuto. L'analisi dello stato di KRAS con ddPCR al momento della diagnosi ha rivelato la presenza di ^{MUT}KRAS in 2 pazienti, che erano risultati ^{WT}KRAS con il metodo standard. Pertanto, la percentuale di pazienti che hanno sviluppato ^{MUT}KRAS come meccanismo di resistenza acquisita è risultata del 42% (14 pazienti) (TABELLA IV)

Tabella IV. Analisi molecolare delle re-biopsie e confronto con ctDNA

Campione	Tumore primario		Re-biopsie				ctDNA	
	^{MUT} KRAS	^{MUT} KRAS	p.T790M	^{MUT} KRAS	p.T790M	^{MUT} KRAS	p.T790M	^{MUT} KRAS
	std	ddPCR	ddPCR	ddPCR	std	std	ddPCR	ddPCR
2	-	NI	-	-	-	-	Mut	-
4	-	Mut	Mut	Mut	-	-	Mut	Mut
5	-	Mut	-	Mut	-	-	-	Mut
19	-	-	-	-	Mut	-	Mut	Mut
20	-	-	-	-	-	-	Mut	Mut
23	-	-	Mut	Mut	Mut	-	Mut	Mut
28	-	NA	-	-	Mut	-	Mut	-
30	-	NA	-	-	Mut	-	Mut	-

Mut: presenza mutazione; "-": assenza di mutazione; std: approccio standard; NI: campione non idoneo.

Studio prospettico: monitoraggio dinamico delle mutazioni nel ctDNA

Attualmente, 21 campioni di plasma raccolti da pazienti affetti da NSCLCs non in progressione di malattia ed in trattamento con terapia target (gefitinib, afatinib, osimertinib) sono stati sottoposti alla prima fase di isolamento e di estrazione del ctDNA ed alla successiva analisi con la ddPCR. L'analisi su di 1 campione non è stata effettuata, in quanto non processato adeguatamente in sede di prelievo. Inoltre, ulteriori 4 campioni non sono stati presi in considerazione per il presente studio in quanto non è stato completato il follow-up.

L'analisi del ctDNA estratto è stata condotta con la tecnologia della ddPCR per la ricerca del target mutato, relativamente sia alle mutazioni attivanti (ex19del, p. L858R) sia alla mutazione di resistenza (p. T790M) localizzate nel gene *EGFR*, come confermato dai risultati riportati in Tabella V. In breve, dei 16 pazienti, 13 (81,25%) sono femmine e 3 (18,75%) sono maschi. L'età media è di 62 anni (range 42–82); 14 pazienti erano affetti da malattia NSCLC allo stadio IV, mentre 2 erano allo stadio IIIB. La frequenza delle mutazioni attivanti di EGFR era la seguente: 9 pazienti (56,25%) mostravano la ex19del e 4 pazienti (25%) la p.L858R; 3 pazienti (18,75%) mostravano mutazioni attivanti EGFR inferiori all'1%. Dodici pazienti (75%) sono stati sottoposti a trattamento con gefitinib, mentre 3 pazienti (18,75%) con afatinib. Di un paziente non era noto il trattamento a cui è stato sottoposto, in quanto facente parte di un protocollo sperimentale (FLAURA), in cui i soggetti sono randomizzati in cieco a ricevere gefitinib o osimertinib. Tre pazienti (18,75%) hanno avuto una risposta

parziale al trattamento con gli inibitori delle tirosin-chinasi e nessun paziente ha mostrato una risposta completa. Una stabilizzazione della malattia è stata osservata in 3 pazienti (18,75%) ed una progressione in 10 soggetti (62,5%).

In particolare, 7 pazienti (70%) nei quali è stata osservata una progressione della malattia, nonostante il trattamento con EGFR-TKI (gefitinib o afatinib), sono risultati positivi per la mutazione di resistenza p.T790M.

Inoltre, i campioni sono stati caratterizzati valutando nel ctDNA anche le mutazioni puntiformi più frequenti localizzate nel codone 12 del gene *KRAS* (^{MUT}KRAS o KRAS p. G12X). È interessante notare, che 4 pazienti (40%) sono risultati mutati. In particolare, 1 paziente (10%) ha presentato sia la ^{MUT}KRAS sia la mutazione p.T790M, mentre 3 soggetti (30%) solo la ^{MUT}KRAS. Due pazienti non hanno presentato alcuna mutazione. Dei 4 pazienti che hanno presentato la mutazione a carico del gene *KRAS*, due pazienti sono andati in progressione di malattia.

Per quanto riguarda il trattamento farmacologico, 6 pazienti in cui è stata osservata la progressione di malattia sono stati sottoposti a terapia con osimertinib, mentre 4 hanno continuato il trattamento con gefitinib.

Tabella V. Caratteristiche generali e cliniche dei pazienti arruolati nello studio prospettico

		N.(%)
Età (range)		62 (42-82)
Genere	maschio	18,75%
	femmina	81,25%
Abitudine al fumo	fumatori	6,25%
	non-fumatori	62,5%
	ex-fumatori	31,25%
Stadio	IIIB	9,5%
	IV	90,5%
Mutazioni attivanti	ex19del	56,25%
	p.L858R	25%
	EGFR mutati < 1%	18,75%
Linea di trattamento	1	16 (100%)
TKIs	gefitinib	75%
	afatinib	25%

Abbreviazioni: TKI: tyrosine kinase inhibitor

Per ciascun campione, il software della droplet digital PCR ha generato un dato simile al seguente (FIGURA 23).

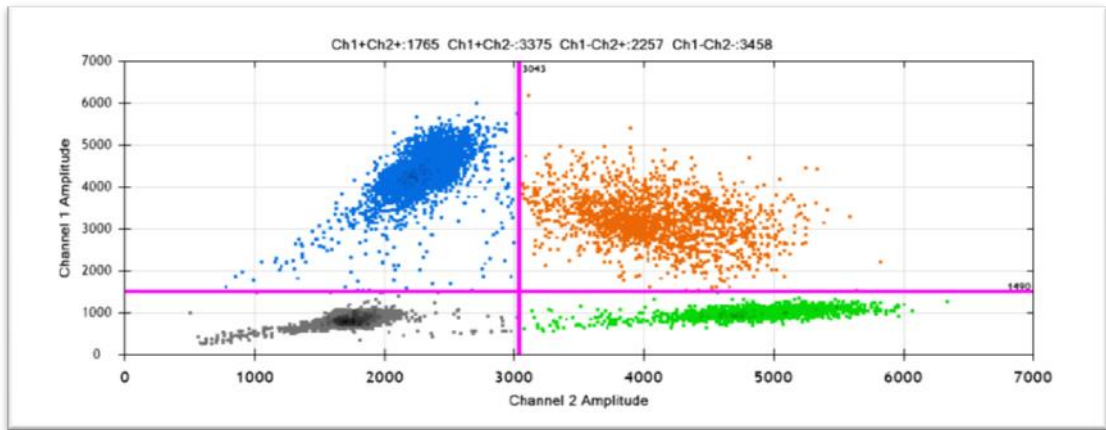


Figura 23. Esempio di grafico derivante da analisi ddPCR condotta sui campioni ottenuti da pazienti inclusi nello studio prospettico

In particolare, il segnale verde raffigura le gocce contenenti il ctDNA *wild type* (wt), mentre il segnale blu identifica le gocce contenenti il ctDNA mutato. L'area grigia rappresenta prodotti non amplificati, aspecifici, e primers dimerizzati; mentre il segnale marrone identifica le gocce contenenti sia il ctDNA mutato sia il ctDNA wt. Successivamente, mettendo a confronto i campioni analizzati, il software ha generato i seguenti grafici nei quali è possibile osservare in ciascuna colonna (che rappresenta un campione), le gocce contenenti il ctDNA *wt* (FIGURA 24) e il ctDNA mutato (FIGURA 25).

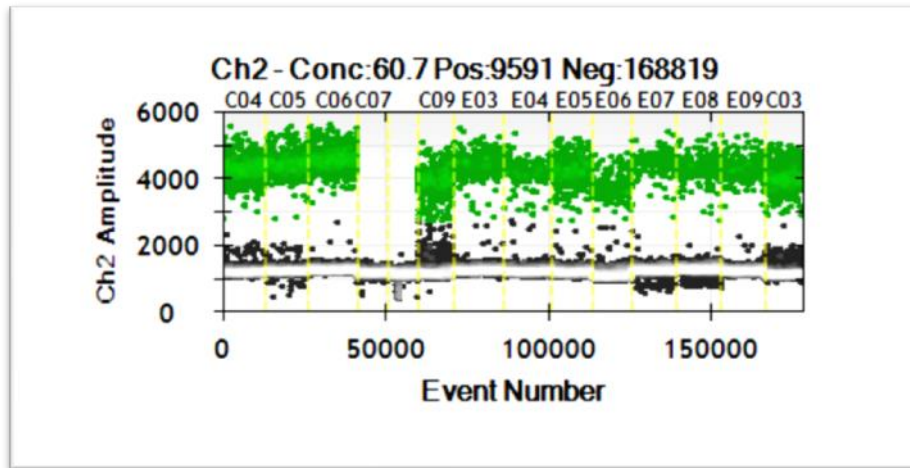


Figura 24. Grafico esemplificativo delle gocce contenenti DNA *wt*

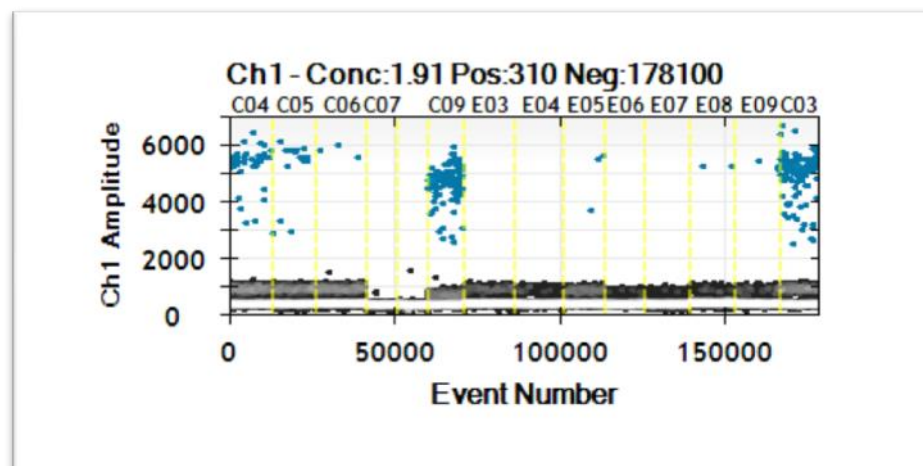


Figura 25. Grafico esemplificativo delle gocce contenenti DNA *mutato*

In seguito, il software genera un grafico che riporta per ciascun campione, in grigio il numero di gocce generato dallo strumento, in verde il numero di gocce con ctDNA *wt* ed in viola il numero di gocce con ctDNA mutato (FIGURA 26).

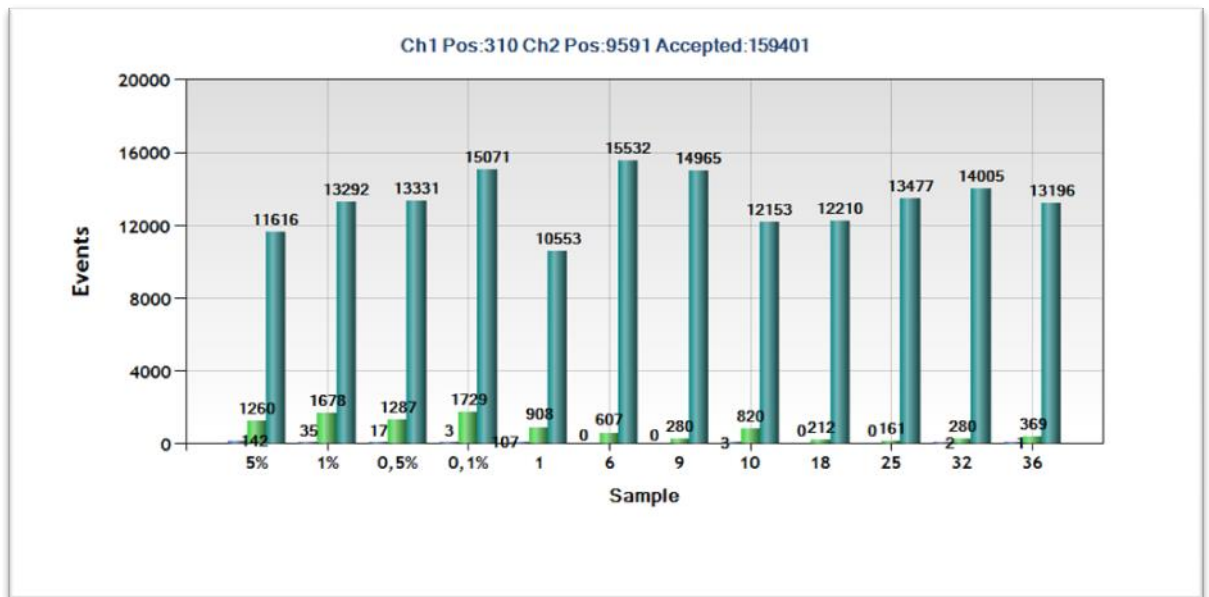


Figura 26. Grafico in cui vengono messe a confronto le gocce generate, le gocce con DNA *wt* e gocce con DNA mutato

Nei pannelli successivi (Figure 27-29), sono riportati i grafici recanti l'andamento dinamico, durante il monitoraggio dei follow-up clinici e delle progressioni di malattia, delle mutazioni attivanti (ex19del e p.L858R) e di resistenza (p.T790M) a carico del gene EGFR, relativi ad alcuni dei 16 pazienti in trattamento con EGFR-TKIs, per i quali è stata effettuata l'analisi del ctDNA nel plasma tramite la ddPCR. Inoltre, è stato messo in evidenza il monitoraggio, e quindi l'andamento dinamico, anche delle mutazioni a carico del codone 12 del gene KRAS.

Legenda:

◆ Mutazione attivante ■ Mutazione resistenza ◆ Mutazione KRAS
 GEF: gefitinib; AFAT: afatinib; OSIM: osimertinib; SD: stabilizzazione di malattia; RP: risposta parziale; PD: progressione di malattia

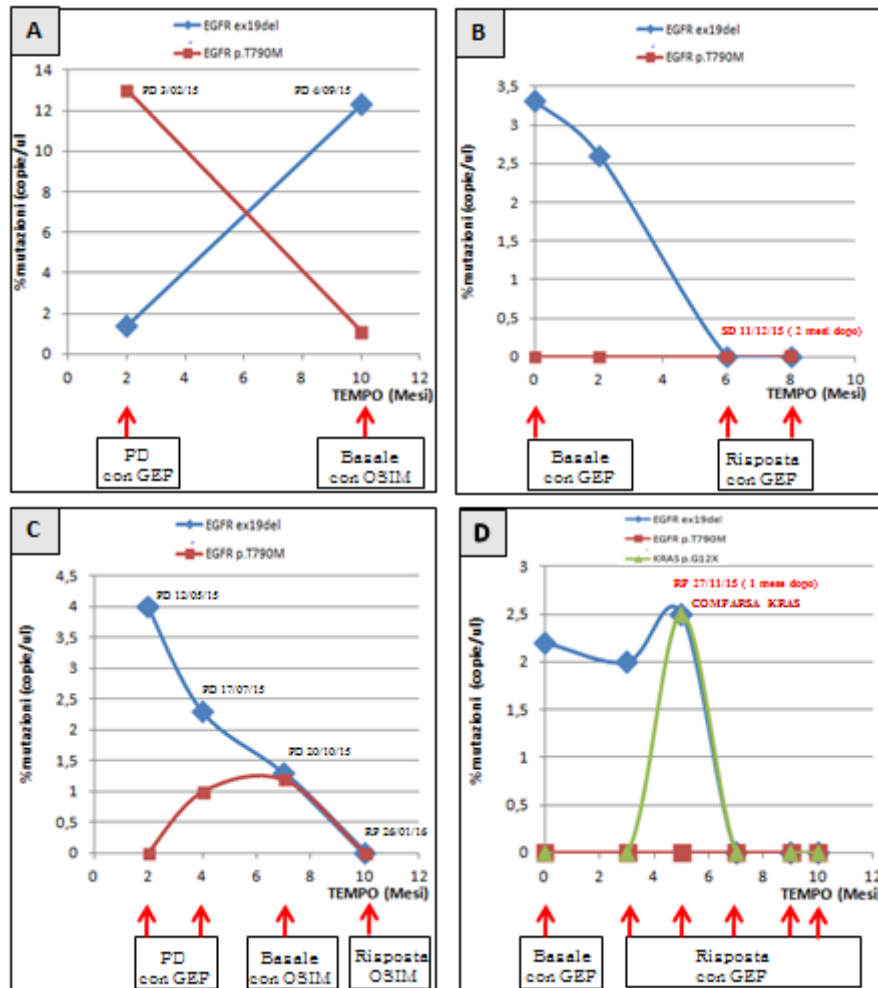


Figura 27. Andamento dinamico delle mutazioni attivanti e di resistenza a carico del gene EGFR relative ai campioni 4-7 (grafici curve A-D)

Gráfico A: Paziente in progressione di malattia, presenza della mutazione p.T790M ed incremento della ex19del nel ctDNA, che ha consentito lo switch del trattamento da gefitinib ad osimertinib. **Gráfico B:** nel prelievo basale, rilevata la presenza della ex19del nel ctDNA, che ha consentito il trattamento con gefitinib; analisi successive mostrano una riduzione evidente della ex19del che si accompagna a stabilizzazione di malattia. **Gráfico C:** in seguito a progressione di malattia, rilevata presenza della p.T790M e della p.L858R nel ctDNA, che ha consentito lo switch del trattamento da gefitinib a osimertinib; analisi successive mostrano una riduzione evidente della p.T790M e della p.L858R che si accompagna a risposta parziale. **Gráfico D:** nel prelievo basale, rilevata la presenza della ex19del nel ctDNA, che ha consentito il trattamento con gefitinib; analisi successive mostrano una riduzione evidente della ex19del che si accompagna a risposta parziale. Interessante la comparsa della mutazione a carico del gene KRAS.

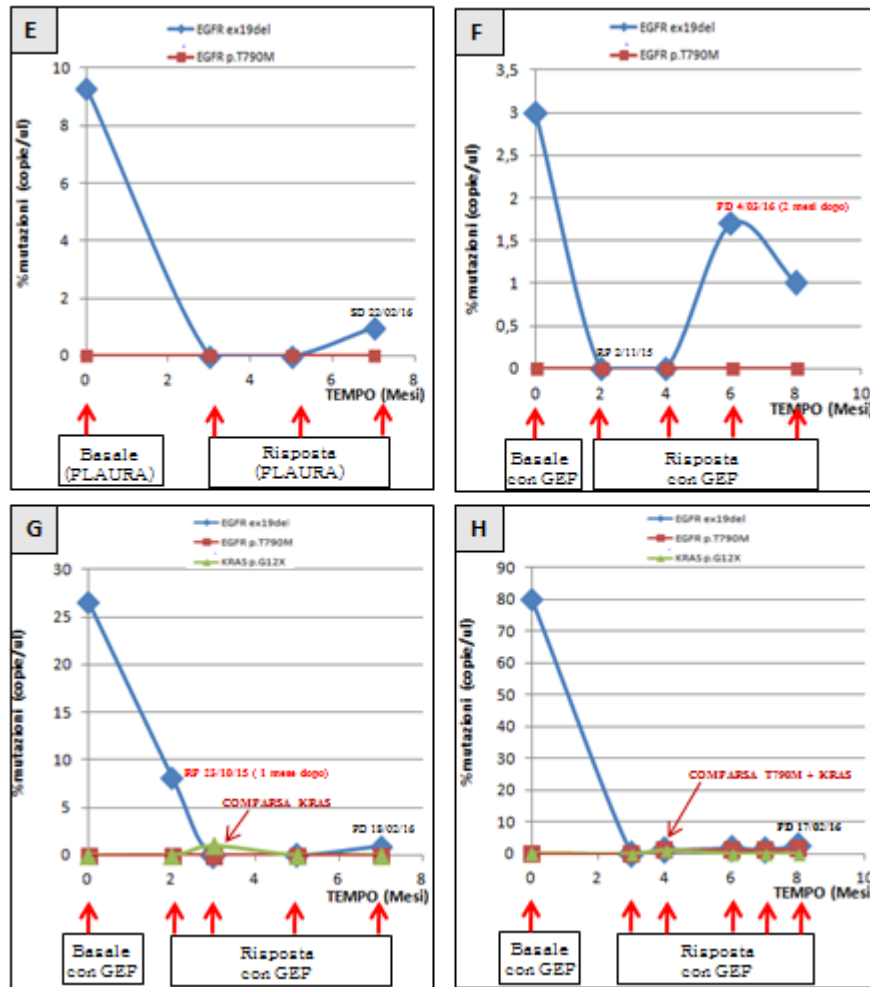


Figura 28. Andamento dinamico delle mutazioni attivanti e di resistenza a carico del gene EGFR relative ai campioni 8-11 (grafici curve E-H)

Grafico E: nel prelievo basale, rilevata la presenza della ex19del nel ctDNA, che si riduce nelle analisi successive, con lieve incremento al quarto follow-up clinico. Tale andamento si accompagna a risposta parziale. Non si conosce il trattamento perché il paziente è arruolato in uno studio randomizzato a cieco (FLAURA). **Grafico F:** nel prelievo basale, rilevata la presenza della p.L858R nel ctDNA, che ha consentito il trattamento con gefitinib; analisi successive mostrano una riduzione evidente della p.L858R e assenza della p.T790M che si accompagnano a stabilizzazione della malattia. Al quarto follow-up clinico, le analisi mostrano lieve incremento della p.L858R ed ulteriore assenza della p.T790M. Si ipotizza possibile progressione di malattia. **Grafico G:** nel prelievo basale, rilevata la presenza della ex19del nel ctDNA, che ha consentito il trattamento con gefitinib; analisi successive mostrano una riduzione evidente della ex19del che si accompagna a stabilizzazione di malattia. Interessante la comparsa della mutazione a carico del gene *KRAS*. **Grafico H:** nel prelievo basale, rilevata la presenza della p.L858R nel ctDNA, che ha consentito il trattamento con gefitinib; analisi successive mostrano un lieve incremento della p.L858R, che si accompagna a risposta parziale. Interessante la comparsa di mutazione a carico del gene *KRAS*.

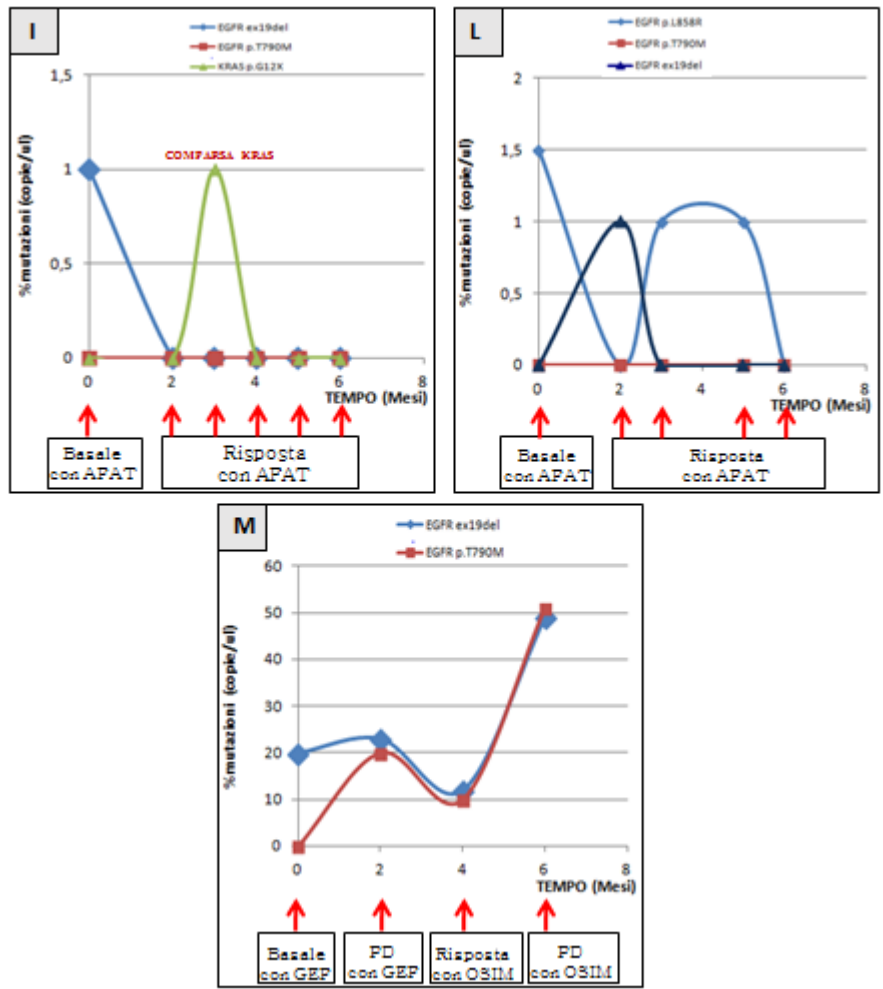


Figura 29. Andamento dinamico delle mutazioni attivanti e di resistenza a carico del gene EGFR relative ai campioni 12-14-16 (grafici curve I-N)

Grafico I: nel prelievo basale, rilevata la presenza della ex19del nel ctDNA, che ha consentito il trattamento con afatinib; analisi successive mostrano una riduzione evidente della ex19del, che si accompagna a stabilizzazione di malattia. Interessante la comparsa di mutazione a carico del gene *KRAS*. **Grafico L:** nel prelievo basale, rilevata la presenza della p.L858R nel ctDNA, che ha consentito il trattamento con afatinib; analisi successive mostrano la riduzione della p.L858R, che tende di nuovo ad aumentare nei successivi follow-up. Interessante la comparsa della ex19del, che poi si riduce successivamente. **Grafico M:** nel prelievo basale, rilevata la presenza della p.L858R nel ctDNA, che ha consentito il trattamento con gefitinib; in seguito a progressione di malattia, rilevato un incremento lieve della p.L858R e la presenza della p.T790M, che ha consentito lo switch da gefitinib a osimertinib. Si evidenzia poi riduzione della p.T790M, che tende di nuovo ad aumentare in progressione di malattia.

Particolare attenzione è stata dedicata a 2 campioni dei 16 analizzati. Un primo paziente presentava la mutazione attivante p.L858R, in assenza della mutazione di resistenza p.T790M. Infatti, il campione 16, risultato EGFR-mutato (p.L858R) dall'analisi del primitivo (dato confermato dall'analisi del ctDNA del plasma tramite la ddPCR) è stato inizialmente sottoposto a trattamento con gefitinib. In seguito a progressione della malattia, è stata effettuata l'analisi del ctDNA nel plasma che ha rilevato un incremento minimo della p.L858R e la presenza della p.T790M (FIGURA 30), responsabile di resistenza acquisita. Interrotto il trattamento con gefitinib, il paziente è stato sottoposto a terapia con osimertinib. Un'ulteriore analisi del ctDNA nel plasma in corso di trattamento (FIGURA 31), ha mostrato un'evidente riduzione di concentrazione della p.T790M, suggerendo così un iniziale successo della terapia. Il grafico in (FIGURA 32) mostra l'andamento dinamico della mutazione attivante e di resistenza, che deriva dal monitoraggio del follow-up clinico e della progressione della malattia, relativo al campione 16.

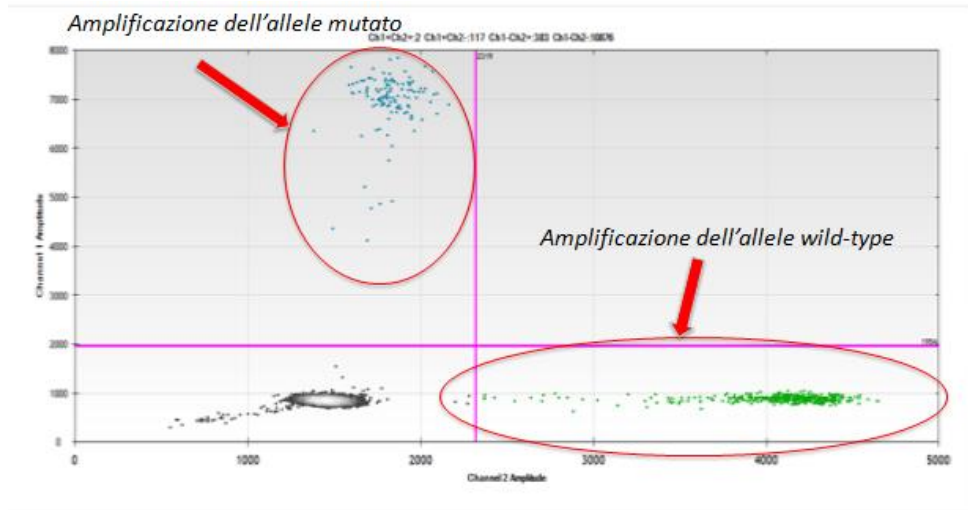


Figura 30. Grafico della ddPCR relativo al campione 16, che mette in evidenza la presenza della p.T790M dopo la prima linea di trattamento con gefitinib

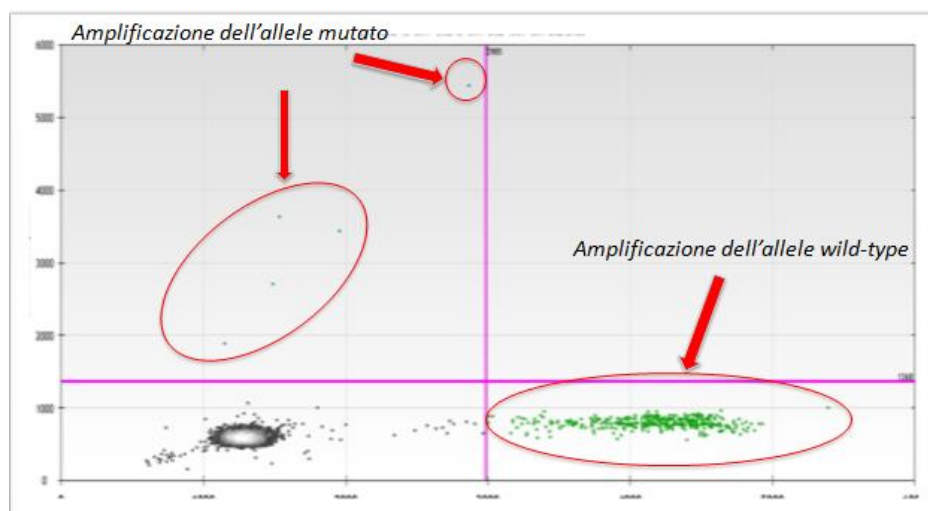


Figura 31. Grafico della ddPCR relativo al campione 16, che mette in evidenza la riduzione della concentrazione della p.T790M durante il trattamento con osimertinib

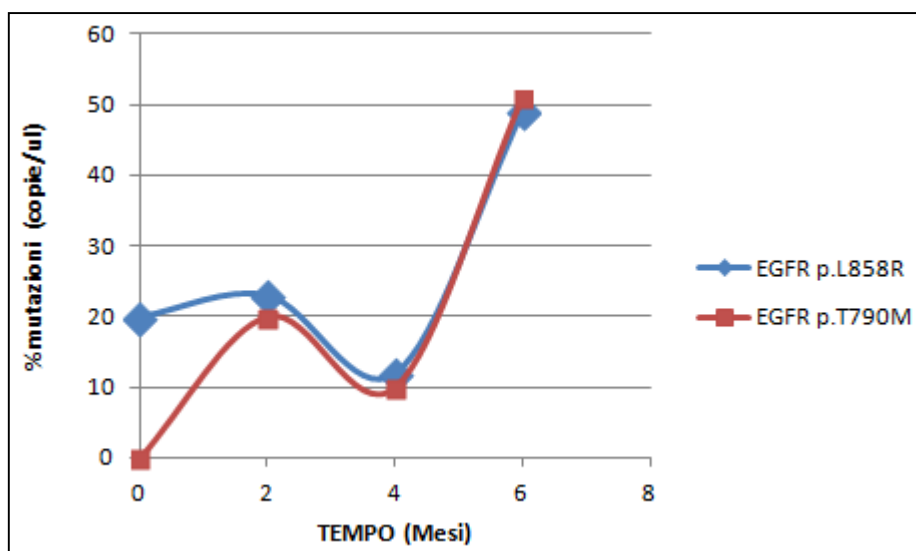


Figura 32. Andamento dinamico della mutazione attivante e di resistenza a carico del gene EGFR, relativo al campione 16

Un secondo paziente presentava la mutazione attivante p.L858R, in assenza però della mutazione di resistenza p.T790M (FIGURA 33). Infatti, il campione 9, risultato EGFR-mutato (p.L858R) dall'analisi del primitivo (dato confermato dall'analisi del ctDNA del plasma tramite la ddPCR) è stato inizialmente sottoposto a trattamento con gefitinib.

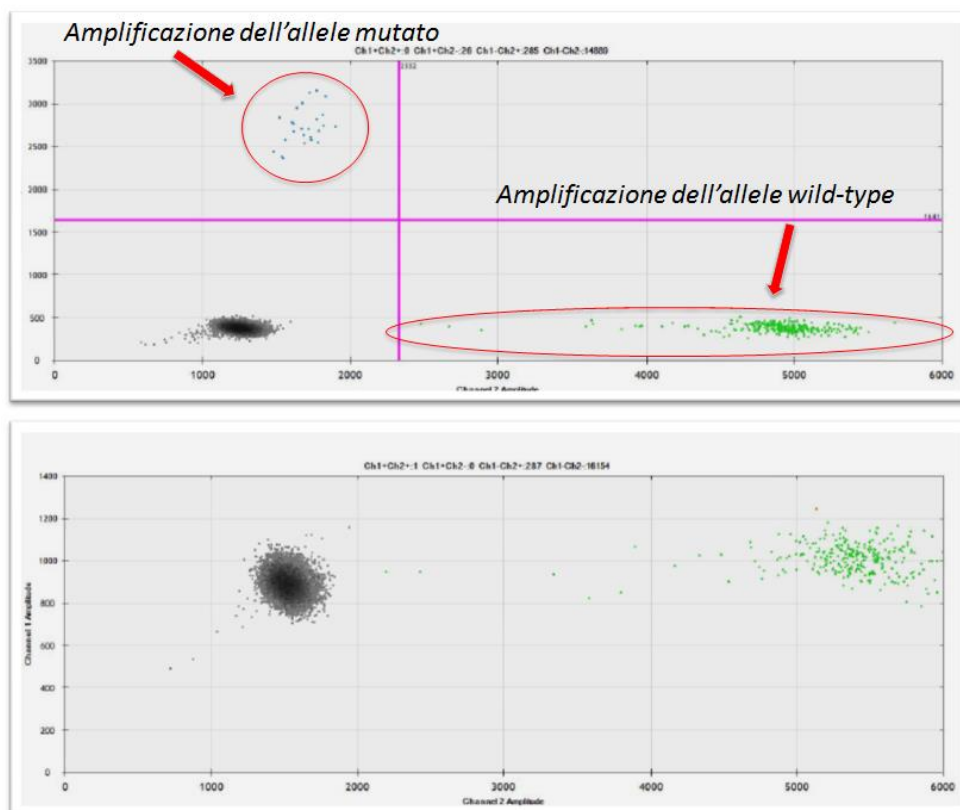


Figura 33. Grafico della ddPCR relativo al campione 9, che mette in evidenza la presenza della p.L858R (pannello superiore) e l'assenza della p.T790M (pannello inferiore) nel campione basale

Durante due successivi follow-up clinici, è stata effettuata l'analisi del ctDNA nel plasma che ha rilevato una riduzione evidente della p.L858R ed ancora l'assenza della p.T790M (FIGURA 34), suggerendo così l'iniziale successo della terapia con il TKI.

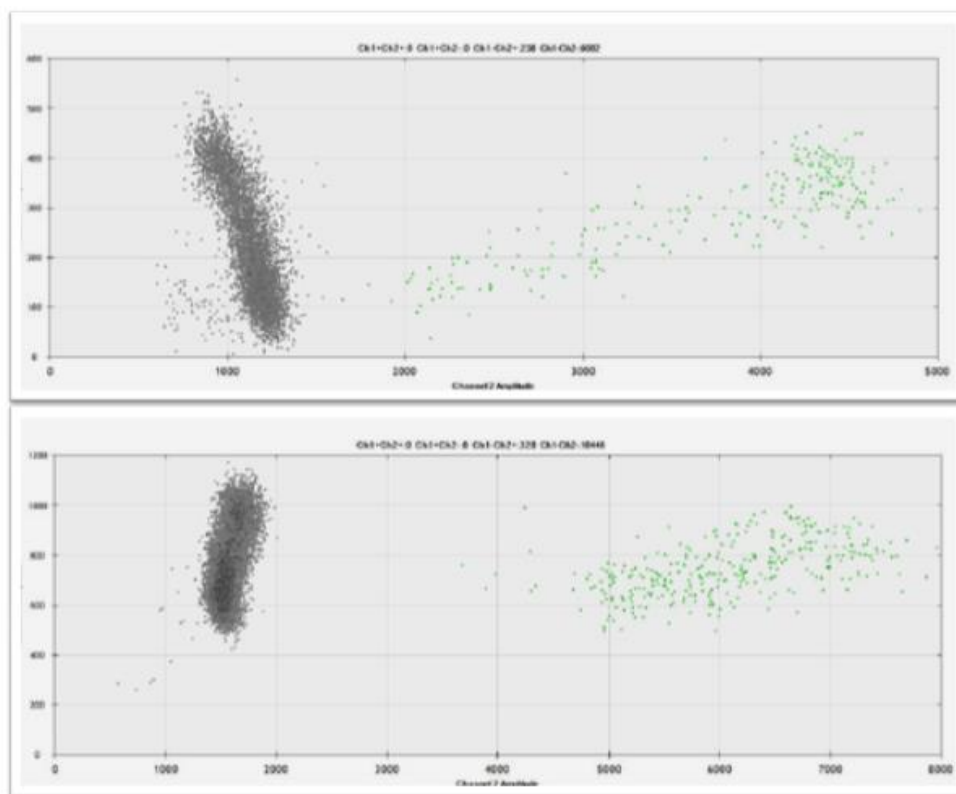


Figura 34. Grafico della ddPCR relativo al campione 9, che mette in evidenza una riduzione evidente della p.L858R (pannello superiore) ed ancora l'assenza della p.T790M (pannello inferiore), durante due successivi follow-up clinici

Pertanto, il paziente ha continuato il trattamento con gefitinib. Al terzo follow-up clinico, l'analisi del ctDNA nel plasma ha messo in evidenza un incremento minimo della p.L858R e l'ulteriore assenza della p.T790M (FIGURA 35), suggerendo quindi la possibile non risposta al trattamento con TKI da parte del paziente e, di conseguenza, la probabile progressione clinica della malattia.

Il grafico in FIGURA 36 mostra l'andamento dinamico della mutazione attivante e di resistenza, che deriva dal monitoraggio del follow-up clinico, relativo al campione 9.

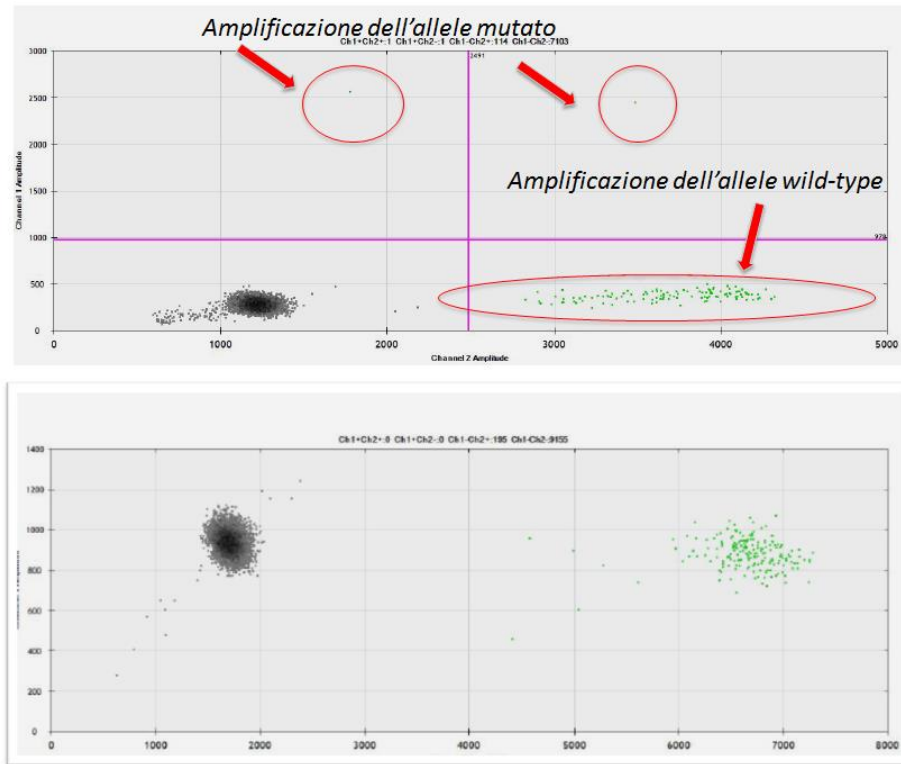


Figura 35. Grafico della ddPCR relativo al campione 9, che mette in evidenza un incremento minimo della p.L858R (pannello superiore) e l'ulteriore assenza della p.T790M (pannello inferiore), durante il terzo follow-up clinico

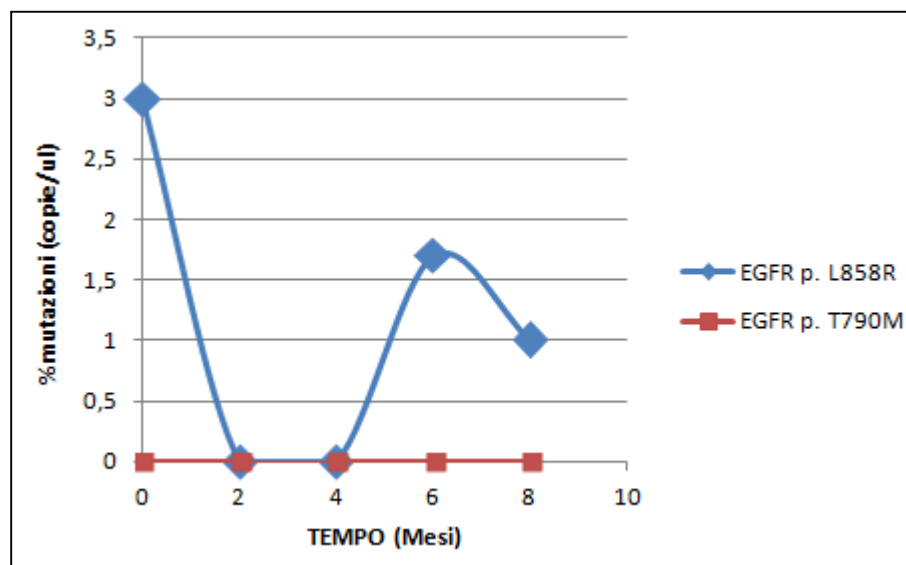


Figura 36. Andamento dinamico della mutazione attivante e di resistenza a carico del gene EGFR, relativo al campione 9.

DISCUSSIONE

Nello studio retrospettivo, è stata dimostrata l'affidabilità della metodologia di isolamento e di estrazione del ctDNA dal plasma di pazienti affetti da NSCLC, preventivamente separato dalla frazione cellulare. La resa della metodica di estrazione del ctDNA da plasma è giustificata dalla successiva analisi di genotipizzazione condotta con la ddPCR, tecnica PCR di terza generazione utilizzata per la rilevazione di frammenti di ctDNA.

In particolare, lo studio ha evidenziato la *specificità* e la *sensibilità* della tecnica ddPCR.

La *specificità* dell'analisi è giustificata dai risultati positivi ottenuti, che hanno permesso di stratificare i pazienti, affetti da NSCLC in progressione di malattia ed in corso di trattamento con TKIs, in base alla frequenza sia delle mutazioni attivanti (ex19del, p.L858R, p.L747P e ex19ins) sia della mutazione di resistenza (p.T790M), localizzate nel gene *EGFR*.

La delezione dell'esone 19 (ex19del) e la mutazione p.L858R rappresentano le alterazioni più frequenti, costituendo circa il 85-90% della casistica e sono più frequenti nei seguenti sottogruppi di pazienti: donne, non-fumatori e istotipo adenocarcinoma.⁵⁶ Questa frequenza è simile a quella riscontrata nel nostro studio (ex19del 60,6% e p.L858R 30,3%).

La mutazione p.T790M determina resistenza acquisita al trattamento con TKIs. Tale mutazione è stata descritta nelle re-biopsie del 63% dei tumori che progredivano

sotto trattamento con i TKIs e nel ctDNA con una frequenza simile al nostro studio (72,7%)⁵⁷.

Oltre alla p.T790M, altri meccanismi di resistenza acquisita sono stati descritti nelle re-biopsie tumorali dopo progressione sotto trattamento con i TKIs. Tra questi, sono descritte mutazioni a carico di KRAS, MET, HER2, PIK3CA, BRAF e trasformazione istologica in piccole cellule.⁴ In particolare, sebbene il ruolo delle mutazioni a carico del gene *KRAS*, nel concorrere al meccanismo di resistenza primaria al trattamento con TKIs, sia stato sufficientemente descritto e caratterizzato⁵⁸, lo sviluppo ed il coinvolgimento di tali mutazioni nel determinare resistenza acquisita ai TKIs nei pazienti affetti da NSCLC ed EGFR-mutati attualmente risultano scarsamente esplorati. Sulla base di queste evidenze, nel presente studio nel ctDNA isolato dai campioni ottenuti da pazienti affetti da NSCLC sono state valutate le mutazioni puntiformi più frequenti localizzate nel codone 12 del gene *KRAS* (*MUTKRAS*). In seguito a queste indagini sperimentali, è stato possibile osservare che una percentuale significativa di pazienti affetti da NSCLC e in progressione di malattia risultavano portatori di una mutazione a carico del gene *KRAS* (48,5%). Pertanto, le mutazioni a carico del gene *KRAS* sembrerebbero essere coinvolte nella capacità del tumore di resistere alla terapia farmacologica.

La *sensibilità* dell'analisi condotta con ddPCR è dimostrata dalla concordanza tra i dati ricavati dalla re-biopsia tissutale con quelli ottenuti dal ctDNA. A tal riguardo, otto pazienti sono stati sottoposti a re-biopsia dopo progressione tumorale durante trattamento con i TKIs, permettendo così un confronto tra tessuto e re-biopsia

“liquida”. Attraverso sia la metodica standard che la tecnica ddPCR, nel plasma sono state rilevate mutazioni che altrimenti non sarebbero state caratterizzate nel tessuto, suggerendo che la mutazione potrebbe essere espressa in un'altra lesione tumorale, non raggiunta con biopsia, condizione conseguente all'eterogeneità genomica di un tumore. Allo stesso tempo, la presenza di pazienti nei quali sono state individuate le mutazioni sia nel plasma che a livello tissutale evidenziate tramite analisi ddPCR, ma non attraverso i metodi standard, potrebbe essere ascrivibile ad una migliore sensibilità delle analisi effettuate con ddPCR. Complessivamente, i dati attualmente raccolti potrebbero, quindi, essere spiegati dall'alta sensibilità della metodica ddPCR combinata con la sua bassa performance in presenza di paraffina, che ostacola la formazione di emulsioni acqua/olio.

In conclusione, nonostante il nostro studio presenti delle limitazioni, rappresentate dall'esiguo numero di pazienti coinvolti nello studio e dalla natura retrospettiva dello studio stesso, i risultati ottenuti confermano l'importanza delle analisi del ctDNA isolato dal plasma per l'identificazione di mutazioni secondarie associate a resistenza verso i TKIs. Inoltre, lo studio retrospettivo ha confermato il ruolo di un approccio altamente specifico e sensibile svolto dalla ddPCR, una metodica sperimentale utile per una rapida rilevazione di bassi livelli di mutazioni a carico del gene *EGFR*, sia per la caratterizzazione delle mutazioni attivanti che per la caratterizzazione dell'acquisizione di mutazioni secondarie.

Confermata la resa del processo di estrazione del ctDNA da plasma e la robustezza, in termini di specificità e sensibilità, della tecnologia ddPCR per individuare alterazioni genomiche tipiche del tumore NSCLC, è stato disegnato uno studio prospettico finalizzato al monitoraggio dell'andamento dinamico delle mutazioni attivanti più frequenti e delle mutazioni implicate nel meccanismo di resistenza al trattamento farmacologico a carico del gene *EGFR*, in pazienti affetti da NSCLC non in progressione di malattia. Inoltre, sulla base dei risultati ottenuti dallo studio retrospettivo, il presente studio prospettico valuterà anche la presenza di mutazioni a carico del codone 12 del gene *KRAS*, al fine di caratterizzarne una sua possibile applicazione quale ulteriore potenziale biomarker utile per l'individuazione precoce di pazienti che hanno sviluppato una resistenza ai trattamenti TKIs.

È noto che le mutazioni di *EGFR* identificano un sottogruppo di pazienti NSCLC che presentano una malattia dal comportamento biologico peculiare e per i quali sono disponibili farmaci a target molecolare in grado di bloccare la specifica alterazione individuata, tra cui gefitinib, erlotinib, afatinib, osimertinib (TKIs). Per quanto riguarda l'opportunità di monitorare la risposta alla terapia con TKIs nei pazienti *EGFR* mutati, è stato evidenziato come i livelli di mutazione attivanti rilevabili nel plasma si riducano in conseguenza ad una risposta al trattamento, configurando talvolta una risposta completa plasmatica.⁵⁹ Successivamente, è stato osservato come i livelli di mutazioni attivanti risalcano nel plasma congiuntamente ai livelli di mutazione p.T790M in seguito all'emergenza di cloni resistenti⁶⁰. Nei pazienti

sottoposti a monitoraggio plasmatico, il quadro di resistenza plasmatica si è sviluppato settimane o addirittura mesi prima dell'evidenza di progressione clinica o radiologica⁶⁰.

Il nostro studio prospettico presenta delle limitazioni, rappresentate soprattutto dalla recente attuazione dello studio stesso e, quindi, dal numero esiguo di pazienti attualmente coinvolti. Tuttavia, nonostante tali limitazioni, il monitoraggio dinamico delle variazioni dei livelli di mutazioni dosabili nel ctDNA del plasma in relazione alla risposta del farmaco TKIs e alla comparsa di resistenza ha permesso di ottenere risultati preliminari interessanti. In particolare, il monitoraggio ci ha permesso di evidenziare una correlazione tra la mutazione di resistenza p.T790M, presente nel ctDNA del paziente dopo progressione tumorale (già accertata dalla radiografia), ed una ridotta risposta al trattamento con TKIs. La rilevazione del marker molecolare p.T790M dopo progressione della malattia rappresenta un dato di notevole rilevanza clinica in quanto può consentire lo switch del trattamento farmacologico, interrompendo quindi la cura con i TKIs di prima generazione (quali gefitinib, erlotinib, afatinib) che stanno perdendo di efficacia nel paziente in questione, e indirizzando i clinici verso l'utilizzazione di TKIs di terza generazione, come osimertinib, ancora in fase di valutazione clinica e presto disponibile nella pratica clinica. L'approvazione di osimertinib da parte della Food and Drug Administration (FDA) si basa sui dati ottenuti da due studi clinici AURA di fase II (AURA extension e AURA2) che hanno dimostrato l'efficacia del farmaco su 411 pazienti con NSCLC positivi per la p.T790M, in progressione di malattia durante o in seguito a terapia con

TKIs di prima generazione. In tali studi, il tasso di risposta obiettiva globale (ORR, una misurazione della riduzione del tumore) è stato del 59%. Il profilo di tollerabilità di osimertinib ha mostrato che non si sono verificati singoli effetti avversi gravi superiori al grado 3 ($\geq 3,5\%$). Inoltre, il presente studio ha permesso di valutare il possibile impatto clinico svolto dal monitoraggio dei livelli delle mutazioni attivanti nel ctDNA del plasma. A tal riguardo, è stato osservato un incremento, sebbene di lieve entità, dei livelli della mutazione attivante p.L858R, in assenza della p.T790M, in un paziente trattato con gefitinib, quando ancora la progressione clinica della malattia tramite radiografia non era documentabile. Sebbene sia ampiamente descritto in letteratura che i livelli di mutazioni attivanti risalgano nel plasma congiuntamente ai livelli di mutazione p.T790M, studi riguardanti il possibile ruolo svolto dalle mutazioni attivanti, in assenza della p. T790M, come marker molecolari utili per l'individuazione precoce di pazienti che stanno sviluppando una resistenza ai trattamenti TKIs e utili per anticipare la progressione clinica della malattia, sono ancora scarsi.

Per questo motivo il presente studio mostra evidenze innovative circa l'utilità clinica del monitoraggio molecolare dei pazienti affetti da NSCLC, fin dalla diagnosi della patologia, al fine di consentire non solo lo switch del trattamento farmacologico quando la progressione della malattia è già stata accertata tramite radiografia, ma anche la possibilità di anticipare la resistenza al trattamento con TKIs quando l'avanzamento della malattia non è stato ancora accertato da indagini cliniche macroscopiche.

CONCLUSIONI

L'individuazione del ctDNA, rilasciato nel torrente circolatorio dalle cellule tumorali attraverso processi di necrosi e di apoptosi, apre una nuova area di ricerca e offre la possibilità di un test non invasivo per la diagnosi e la prognosi di un tumore, ma anche per lo screening, per l'identificazione di potenziali bersagli terapeutici e per il follow-up dei pazienti, per seguire dunque il decorso della malattia dopo la chirurgia o le terapie, monitorando la risposta al trattamento.

L'analisi molecolare del DNA tumorale circolante ha permesso di oviare alle biopsie invasive per poter:

- a) verificare la presenza di alterazioni genetiche ed epigenetiche tumore-specifiche che possono determinare lo sviluppo di resistenza verso determinati farmaci o che ci possono indirizzare nell'utilizzo di terapie personalizzate, convenienti sia in termini di salute che di costi economici;
- b) identificare precocemente la ripresa della malattia e la presenza di metastasi tumorali nel follow-up dei pazienti. La chiave per poter effettuare un *follow-up* a lungo termine dei pazienti sottoposti a terapia antitumorale è proprio l'utilizzo di metodi che hanno una invasività ridotta.

L'individuazione precoce di un biomarcatore della possibile progressione è di fondamentale importanza per incrementare la sopravvivenza dei pazienti, poiché permetterebbe un intervento rapido limitando quindi il rischio di espansione della malattia.

A tal riguardo, il ctDNA presente nel plasma e nel siero dei pazienti può così essere utilizzato come biomarcatore su cui costruire dei test diagnostici e prognostici meno

invasivi con ridotte criticità logistiche in sede di campionamento. Nel presente studio è stata valutata la possibilità di utilizzare il ctDNA presente nel plasma dei pazienti con tumore del polmone NSCLC, per trovare mutazioni secondarie da utilizzare soprattutto per seguire la progressione tumorale e la risposta della malattia alla terapia con TKIs. Per perseguire questo scopo, è stato utilizzato un metodo appropriato e riproducibile, in modo da seguire tutti i vari aspetti mutevoli della malattia. In particolare, per lo sviluppo e l'impiego terapeutico dei farmaci a bersaglio molecolare è fondamentale la caratterizzazione molecolare dei tumori, preferibilmente attraverso i biomarcatori, in modo da fare una proiezione verosimile sull'efficacia delle terapie mirate. Il presente approccio clinico implementa le probabilità di beneficio per i pazienti, diminuendo il numero di coloro che riceverebbero terapie inefficaci, con conseguente vantaggio sia in termini di salute dei pazienti che di costi economici. Fino ad oggi, le analisi dei biomarcatori sono state approntate sul tessuto tumorale primario o metastatico prelevato attraverso biopsia. Avvalendosi delle nuove tecnologie, è possibile attualmente sostituire la tecnica delle ripetute biopsie con l'utilizzo del ctDNA che ci può fornire informazioni sull'instabilità genomica tumorale e sull'evoluzione molecolare clonale dovuta alle pressioni di selezione immunitarie e non. Pazienti che inizialmente rispondono ad una *target therapy* possono andare incontro a progressione, con conseguente comparsa di sub-cloni che nonostante la bassa frequenza sono caratterizzati da mutazioni somatiche secondarie che possono generare resistenza verso i farmaci impiegati. Il sub-clone che determina resistenza al farmaco può non essere rilevabile

con le normali tecniche di campionamento del tessuto. Per questo motivo l'utilizzo del ctDNA potrebbe permettere di prevedere con metodi non invasivi la comparsa precoce di resistenza ai farmaci.

È evidente che l'eterogeneità tumorale, sia spaziale che temporale, tra i diversi siti della malattia, rende inefficiente la tecnica della biopsia per analizzare tutti gli aspetti mutevoli della malattia necessari per prendere decisioni riguardo le cure da intraprendere. Tecniche meno invasive devono oggi essere utilizzate per seguire le mutazioni somatiche secondarie che compaiono durante l'evoluzione del tumore. Ulteriori progressi nella comprensione della farmaco-resistenza e delle metastasi senza dubbio dipenderanno dalla capacità di monitorare le dinamiche e la selezione darwiniana dei sub-cloni di tumore, preferibilmente con un campione di sangue piuttosto che con multiple biopsie. Dati i rischi clinici di eventuali ripetute biopsie sul tumore e le sfide associate all'eterogeneità intra- e inter-tumorale, il ctDNA consentirà rapidi progressi nella comprensione dell'evoluzione del tumore nel tempo. Può essere inoltre uno strumento per predire la recidiva precoce e per monitorare la comparsa di resistenza ai farmaci data da sub-cloni che hanno bassissima frequenza ma che sono comunque presenti.

Un potenziale utilizzo in interventi terapeutici è il monitoraggio periodico del ctDNA per l'identificazione di cambiamenti molecolari associati alla resistenza ai trattamenti mirati o per ottenere il genotipo del tumore quando lo stato mutazionale non è ottenibile tramite biopsia.

Il test che si basa sul ctDNA offre molteplici vantaggi. E' economico ed è relativamente semplice da analizzare; inoltre è più accettabile per il paziente rispetto alle tecniche invasive delle biopsie e la sua analisi può essere ripetuta più volte nel tempo senza problemi, permettendo lo studio dei meccanismi di resistenza ai farmaci durante la progressione del tumore. Per contro, gli ostacoli agli studi sul ctDNA sono invece i seguenti: a causa della piccola quantità e della natura molto frammentata, non è semplice e di facile esecuzione un isolamento rapido, efficiente ed affidabile. I prodotti commerciali per l'isolamento degli acidi nucleici dai fluidi corporei sono stati sviluppati focalizzandosi su DNA a medio ed alto peso molecolare e possono dare risultati variabili per rendimento, qualità e contaminazione del DNA tumorale circolante. Il confronto dei numerosi dati disponibili è spesso difficile da fare a causa della mancanza di procedure e metodologie di analisi standardizzate, che variano nella raccolta del plasma o del siero, per il metodo di purificazione, per il target genetico analizzato. La base per il successo nella rilevazione del DNA tumorale circolante è la selezione di un metodo di isolamento che garantisce l'estrazione di una quantità sufficiente e di qualità. È evidente che qualsiasi futura applicazione del plasma o del siero, per l'analisi del DNA tumorale circolante per scopi prognostici e diagnostici, dipenderà dalla possibilità di avere risultati affidabili e riproducibili, che richiedono l'ottimizzazione e l'equivalenza delle procedure utilizzate.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di monitorare dinamicamente le variazioni dei livelli di mutazioni attivanti e di resistenza localizzate nel gene *EGFR*, analizzando il ctDNA di pazienti affetti da tumore del polmone non a piccole cellule, con un

metodo adeguato e riproducibile per l'individuazione delle suddette alterazioni genomiche che potrebbero consentire il trattamento con *target therapy*. In particolare, ci siamo focalizzati sulla convalida della robustezza, in termini di specificità e di sensibilità, del metodo di analisi, che è stata la droplet digital PCR (tecnica PCR di terza generazione altamente sensibile utilizzata per la rilevazione di frammenti di ctDNA). Vari studi ne hanno dimostrato un'elevata sensibilità e specificità. Si tratta, infatti, di una tecnologia utile nella rapida detenzione di bassi livelli di mutazioni, non rilevabili dai metodi standard di genotipizzazione su tessuto a causa dell'eterogeneità tumorale. L'individuazione delle mutazioni nel ctDNA attraverso tecnologie avanzate può avere importante applicazione nel monitoraggio dei pazienti per la presenza di mutazioni che consentono il trattamento con farmaci ad azione biologica mirata così come per la comparsa di mutazioni secondarie, amplificazione ed espansione di cloni di cellule che rendono il tumore resistente agli agenti antitumorali mirati, evidenziando il fenotipo resistente prima della progressione clinica della malattia.

In conclusione, con strumenti sufficientemente sensibili, le mutazioni di EGFR, importanti per decidere le terapie mirate nei casi di tumore del polmone che abbiamo trattato in questa tesi, possono essere rilevate tramite prelievo di sangue periferico dando un'alternativa alla biopsia per l'analisi dei tessuti primari del tumore o delle metastasi.

L'analisi delle mutazioni del gene EGFR tramite ctDNA ha un potenziale valore come strumento clinico per test pretrattamento atti a migliorare la selezione della terapia

e per seguire la comparsa di eventuali resistenze che potrebbero portare a tempi più brevi di progressione libera da malattia (PFS) e di sopravvivenza globale (OS) rispetto a pazienti senza mutazione che rispondono ai trattamenti anti-EGFR.

BIBLIOGRAFIA

1. Linee Guida delle Neoplasie del Polmone. 2015. (Accessed at <http://www.aiom.it>.)
2. I tumori in Italia. (Accessed at <http://www.tumori.net>.)
3. Davidson MR, Gazdar AF, Clarke BE. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. *Journal of thoracic disease* 2013;5 Suppl 5:S463-78.
4. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine* 2011;32:605-44.
5. Beckett WS. Epidemiology and etiology of lung cancer. *Clinics in chest medicine* 1993;14:1-15.
6. La Vecchia C, Boyle P, Franceschi S, et al. Smoking and cancer with emphasis on Europe. *Eur J Cancer* 1991;27:94-104.
7. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132:29S-55S.
8. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic proceedings* 2008;83:584-94.
9. Yokota J, Shiraishi K, Kohno T. Genetic basis for susceptibility to lung cancer: Recent progress and future directions. *Advances in cancer research* 2010;109:51-72.
10. Pontieri, Frati. *Patologia Generale*. Terza Edizione PICCIN,2008.
11. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *The New England journal of medicine* 2008;359:1367-80.
12. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2015;10:1243-60.
13. Bonadonna R, Della Cuna, Valagussa. *Medicina Oncologica*. Ottava Edizione, 2007.
14. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 2013;501:338-45.

15. Fisher R, Puztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *British journal of cancer* 2013;108:479-85.
16. Perkins G, Yap TA, Pope L, et al. Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. *PloS one* 2012;7:e47020.
17. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2014;32:579-86.
18. Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer treatment reviews* 2002;28:255-71.
19. Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS letters* 2007;581:795-9.
20. Corradi P, Tillo, et al. Protocollo QIAamp ® Circulating Nucleic ACID Handbook, 2012.
21. Tong YK, Lo YM. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2006;363:187-96.
22. Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Circulating nucleic acids in plasma or serum. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2001;313:143-6.
23. Benesova L, Belsanova B, Suchanek S, et al. Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. *Analytical biochemistry* 2013;433:227-34.
24. Kirsch C, Weickmann S, Schmidt B, Fleischhacker M. An improved method for the isolation of free-circulating plasma DNA and cell-free DNA from other body fluids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008;1137:135-9.
25. Swanton C. Plasma-derived tumor DNA analysis at whole-genome resolution. *Clinical chemistry* 2013;59:6-8.
26. Boni L, Cassinotti E, Canziani M, Dionigi G, Rovera F, Dionigi R. Free circulating DNA as possible tumour marker in colorectal cancer. *Surgical oncology* 2007;16 Suppl 1:S29-31.
27. El-Telbany A, Ma PC. Cancer genes in lung cancer: racial disparities: are there any? *Genes & cancer* 2012;3:467-80.

28. Krawczyk K, Wojas-Krawczyk. Screening of Gene Mutations in Lung Cancer for Qualification to Molecularly Targeted Therapies. 2012.
29. Cotran Re. Le Basi Patologiche delle Malattie, VII Edizione.
30. Shames DS, Wistuba, II. The evolving genomic classification of lung cancer. *The Journal of pathology* 2014;232:121-33.
31. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013;19:2240-7.
32. Arcila ME, Chaft JE, Nafa K, et al. Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012;18:4910-8.
33. Dricoll B. Lung Cancer, Volume 2: Diagnostic and Therapeutic Methods and Reviews.
34. Johnson JL, Pillai S, Chellappan SP. Genetic and biochemical alterations in non-small cell lung cancer. *Biochemistry research international* 2012;2012:940405.
35. Bazley LA, Gullick WJ. The epidermal growth factor receptor family. *Endocrine-related cancer* 2005;12 Suppl 1:S17-27.
36. Alberts. *Biologia molecolare della cellula*, Quinta Edizione ZANICHELLI, 2013.
37. Jancik S, Drabek J, Radzioch D, Hajduch M. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010;2010:150960.
38. Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nature reviews Cancer* 2010;10:760-74.
39. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature reviews Cancer* 2007;7:169-81.
40. Wu WS, Chen YM. Re-Treatment with EGFR-TKIs in NSCLC Patients Who Developed Acquired Resistance. *Journal of personalized medicine* 2014;4:297-310.
41. Meng D, Yuan M, Li X, et al. Prognostic value of K-RAS mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer* 2013;81:1-10.
42. Crino L, Scagliotti GV, Ricci S, et al. Gemcitabine and cisplatin versus mitomycin, ifosfamide, and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A

randomized phase III study of the Italian Lung Cancer Project. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1999;17:3522-30.

43. Cardenal F, Lopez-Cabrerizo MP, Anton A, et al. Randomized phase III study of gemcitabine-cisplatin versus etoposide-cisplatin in the treatment of locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1999;17:12-8.

44. Prigent SA, Lemoine NR. The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Progress in growth factor research* 1992;4:1-24.

45. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *The New England journal of medicine* 2008;358:1160-74.

46. Helwick. Managing Resistance to Targeted Agents: The future of NSCLC Therapy. *The ASCO Post*, 2014.

47. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *The New England journal of medicine* 2009;361:947-57.

48. Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *The Lancet Oncology* 2011;12:735-42.

49. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2012;13:239-46.

50. Yang JC, Wu YL, Schuler M, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *The Lancet Oncology* 2015;16:141-51.

51. Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013;31:1105-11.

52. Spaans JN, Goss GD. Drug resistance to molecular targeted therapy and its consequences for treatment decisions in non-small-cell lung cancer. *Frontiers in oncology* 2014;4:190.

53. Chmielecki J, Foo J, Oxnard GR, et al. Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling. *Science translational medicine* 2011;3:90ra59.
54. Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17:1616-22.
55. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *The New England journal of medicine* 2008;359:366-77.
56. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2005;97:339-46.
57. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:2070-5.
58. Mao C, Qiu LX, Liao RY, et al. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer* 2010;69:272-8.
59. Marcq M, Vallee A, Bizieux A, Denis MG. Detection of EGFR mutations in the plasma of patients with lung adenocarcinoma for real-time monitoring of therapeutic response to tyrosine kinase inhibitors? *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2014;9:e49-50.
60. Sorensen BS, Wu L, Wei W, et al. Monitoring of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-sensitizing and resistance mutations in the plasma DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer during treatment with erlotinib. *Cancer* 2014;120:3896-901.