



## **Profilo mutazionale degli oncogeni EGFR e KRAS in cellule di carcinoma broncogeno non a piccole cellule ottenute da *fine needle aspiration cytology* (FNAC)**

Francesca Cemmi<sup>1</sup>, Giulia Maria Stella<sup>1</sup>, Michele Zorzetto<sup>1</sup>, Simona Inghilleri<sup>1</sup>,  
Patrizia Morbini<sup>2</sup>, Roberto Dore<sup>3</sup>, Ernesto Pozzi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinica delle Malattie dell'Apparato Respiratorio, <sup>2</sup>S.C. di Anatomia Patologica, Università degli Studi di Pavia, e <sup>3</sup>S.C. di Radiologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

---

### ***Profilo mutazionale degli oncogeni EGFR e KRAS in cellule di carcinoma broncogeno non-a-piccole cellule ottenute da Fine needle aspiration cytology (FNAC)***

Il cancro è una malattia genetica e, su questa base, i molti risultati raggiunti dalla ricerca scientifica hanno consentito non solo di ampliare le conoscenze relative al processo di oncogenesi ma anche di identificare nuovi bersagli terapeutici. In particolare la correlazione tra la presenza di mutazioni attivanti geni coinvolti nel processo di carcinogenesi e la risposta a determinate molecole rappresenta un elemento cruciale per l'identificazione di farmaci o combinazioni di farmaci che colpiscano selettivamente il profilo genetico di ciascun tumore. D'altro canto l'esperienza derivata dall'impiego clinico degli inibitori dei recettori a funzione tirosin-chinasica ha posto in evidenza come i farmaci biologici siano realmente efficaci solo in determinati gruppi di tumore. Solo i tumori costituiti da cellule che dipendono per la propria sopravvivenza e proliferazione dalla costitutiva attivazione recettoriale conseguente alla presenza di lesioni genetiche rispondono a farmaci mirati a bloccare la trasmissione del segnale cellulare persistentemente trasmesso dal recettore. Pertanto il silenziamento del segnale, ottenuto con inibitori specifici, genera uno *shock* oncogenico (*oncogenic shock*) che, conseguentemente, induce il clone neoplastico in apoptosi. In conclusione, queste evidenze supportano un forte razionale scientifico a sostegno della necessità della diagnosi molecolare e della selezione dei pazienti per trattamenti antineoplastici individualizzati. In considerazione della alta incidenza e della prognosi, ad oggi ancora sostanzialmente negativa per i pazienti affetti da questo tumore, il carcinoma broncogeno rappresenta uno degli obiettivi principali della ricerca in campo oncologico molecolare e oncogenomico. I risultati ottenuti da studi sul tumore del polmone, in particolare nelle forme non-a-piccole cellule (NSCLC), costituiscono i traguardi fondamentali raggiunti dalla ricerca traslazionale. Lesioni molecolari attivanti i mediatori coinvolti nella via di segnale della chinasi EGFR giocano un ruolo fondamentale nella induzione della carcinogenesi polmonare e possono essere considerate come marcatori genetici a funzione predittiva della risposta agli inibitori di EGFR. Nei carcinomi non-a-piccole cellule non selezionati per il profilo genetico la frequenza di mutazioni di EGFR è relativamente bassa (10%); tale frequenza aumenta quasi oltre il 50% dei casi in un ristretto gruppo di pazienti: donne asiatiche dell'est, non fumatrici, affette da adenocarcinoma (prevalentemente dalla variante bronchiolo-alveolare). Inoltre, la frequenza di mutazioni di EGFR aumenta al 77% nei tumori che rispondono agli inibitori del recettore, mentre risulta di circa il 7% nei casi refrattari alla terapia.

Lo scopo di questo progetto è di valutare, in una coorte di pazienti affetti da NSCLC, la prevalenza di mutazioni attivanti EGFR e KRAS attraverso l'analisi del DNA estratto da cellule tumorali ottenute tramite agoaspirato trans toracico. Questa metodica rappresenta attualmente l'approccio diagnostico di elezione nel caso di lesioni parenchiamali polmonari periferiche, come l'adenocarcinoma che costituisce circa il 40% delle diagnosi di NSCLC. Alla validazione delle tecniche di sequenziamento genico su campioni tumorali costituiti da poche cellule potranno conseguire due rilevanti implicazioni. In primo luogo sarebbe consentita l'applicazione routinaria dello studio del profilo di attivazione oncogenica di ciascun tumore, ad integrazione della diagnostica istopatologica convenzionale. Inoltre la gestione clinica dei pazienti affetti da NSCLC potrà beneficiare della caratterizzazione dello stato mutazionale di EGFR-KRAS allo scopo di attuare un approccio terapeutico basato sul profilo farmacogenomico individuale e, quindi, potenzialmente selettivo ed efficace.

### ***Mutational profiling of EGFR and KRAS oncogenes in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells obtained through fine needle aspiration cytology (FNAC)***

Cancer is a genetic disease and this concept has now been widely exploited by both biologists and clinicians to design new targeted therapeutical approaches. Indeed many data have already allowed us to ameliorate not only our knowledge about cancer onset, but also about patient treatment. Correlation between mutations in cancer alleles and drug response is a crucial point to identify drugs or drug combinations that match the genetic profile of individual tumors. On the other hand, experiences derived from receptor tyrosine kinases (RTKs) inhibition have pointed out that targeted treatment is really successful only in a small subset of tumors. The latter are eventually addicted to the genetic alterations responsible for receptors activation and continued expression of their signaling pathways. Therefore, switching off the oncogenic activity by specific inhibitors will trigger an "oncogenic shock" which eventually will lead tumor cell to die. Overall these observations provide a strong rationale for molecular-based diagnosis and cancer patients selection for targeted treatment. Understanding how the mutational status of oncogenic alleles affects sensibility or resistance to drugs represents the most potential strategy in identifying patients for effective personalized therapies.

In consideration of the high incidence and the poor prognosis of affected patients, lung carcinoma has been considered and still identify major objective of the targeted therapeutic approach. Experiences derived from this disease, and mainly from non-small cell lung cancer (NSCLC), represent fundamental achievement of translational research. From this perspective, members of the EGFR signal transduction pathway play a key role in lung carcinogenesis and act as genetic markers predictive of response to anti-EGFR therapy. In unselected NSCLCs EGFR activating mutations are rarely present (10%); mutation frequency increases to over 50% in a restricted subset of NSCLC patients: East-Asian, women, non smokers, affected by ADC (mainly BAC variant). Moreover the incidence of EGFR mutations in NSCLCs increases up to 77% among EGFR TKIs responders, while it is 7% in unsensitive cases.

This project aims to evaluate in a cohort of NSCLC patients the prevalence of activating mutations in EGFR and KRAS genes by analyzing tumor cells obtained through transthoracic biopsy by FNAC, which actually represents the most appropriate diagnostic tool for peripheral lesions, such as ADKs that actually account for 40% of NSCLC diagnosis. Validation of sequencing technology on tumor samples constituted by only few cells has two relevant implications. First it might allows routinary tumor molecular profiling as powerful integration of conventional histo-pathological diagnosis. Besides the clinical management of NSCLC will take advantages from the characterization of EGFR-KRAS mutational status in order to develop personalized and effective treatment strategies.

---

## **Introduzione**

### ***Basi molecolari del processo di oncogenesi***

Il cancro è una malattia complessa, associata a lesioni genetiche (mutazioni somatiche che inducono la produzione di proteine alterate) che tendono ad accumularsi nel tempo quale risultato della esposizione a cancerogeni ambientali introdotti con la dieta o derivanti da scorretti stili di vita (ad esempio l'abitudine al fumo di tabacco) [1]. I tumori solidi, generalmente, insorgono nell'adulto proprio perché

le cellule adulte dell'organismo umano sono soggette a continui insulti responsabili dell'acquisizione sequenziale di danni al DNA che conducono, in ultimo, alla trasformazione neoplastica. In tal modo, da una singola cellula trasformata, deriva una popolazione clonale di cellule figlie portatrici delle stesse lesioni genetiche. Queste cellule sono in grado di proliferare in modo afinalistico, invadere il tessuto circostante ed, infine, colonizzare organi a distanza (Figura 1).

Il fatto che le cellule tumorali contengano diverse lesioni genetiche acquisite progressivamente nel tempo implica che il cancro sia una malattia eterogenea che è difficilmente aggredibile e che richiede la continua integrazione di trattamenti sulla base dell'evoluzione della malattia stessa. La ricerca scientifica, negli ultimi anni, ha raggiunto traguardi importanti e inattesi: contrariamente alle ipotesi iniziali e fortunatamente per i risvolti in clinica, le lesioni genetiche che caratterizzano la maggior parte dei tumori solidi e sono responsabili della loro progressione non sono più di alcune dozzine. Queste informazioni hanno guidato la ricerca farmacologica nello sviluppo e validazione di farmaci in grado di bloccare l'attività di un piccolo *set* di proteine alterate: questi sforzi hanno condotto allo sviluppo dei farmaci antineoplastici di ultima generazione. Questi farmaci sono definiti *targeted* proprio perché sono in grado di inibire selettivamente la funzione di specifiche molecole attivate nel cancro [2]. Questi presupposti costituiscono le basi della oncogenomica e della farmacogenomica in oncologia e da essi derivano due importanti conseguenze:

1. in primo luogo il trattamento dei pazienti con farmaci *targeted* è imprescindibile dalla identificazione della lesione molecolare che il farmaco stesso, potenzialmente, andrà ad inibire; in altre parole la terapia *targeted* è effettivamente efficace solo nei pazienti portatori di alterazioni nel DNA tumorale che rendono il tumore stesso bersaglio di un dato farmaco;
2. la seconda implicazione è che l'approccio diagnostico/terapeutico *targeted* del cancro richiede l'integrazione della diagnostica convenzionale istopatologica con la caratterizzazione molecolare del tumore. Ne consegue che, per l'impostazione di una terapia individualizzata del cancro, è necessaria, accanto alla classificazione d'organo e morfologica, l'identificazione delle alterazioni molecolari proprie del tumore stesso.

### Geni critici per il cancro

La sempre più approfondita conoscenza del programma genetico, che determina la proliferazione del clone cellulare neoplastico, la successiva invasione dei tessuti circostanti e la metastatizzazione a distanza, ha consentito di decifrare, almeno parzialmente, il comportamento clinico delle neoplasie. È ormai dimostrato che una singola cellula cancerosa è portatrice di numerose mutazioni in diversi geni e anomalie nel corredo cromosomico che determinano una amplissima variabilità del suo profilo di espressione genica. Nel 95% dei casi di tumore solido le mutazioni avvengono in cellule somatiche [3]. Si parla di mutazione per indicare una variazione nella sequenza del DNA che è presente in <0.1% della popolazione; si definisce, invece, polimorfismo una variazione nella sequenza del DNA che è presente almeno nell'1% della popolazione.

Ad oggi sono noti più di 100 geni che risultano ripetutamente alterati nelle cellule umane tumorali. Essi sono identificati come geni critici del cancro (*gate-keepers*): tale definizione rende ragione del fatto che, mutazioni che avvengono a livello di questi geni, contribuiscano alla iniziazione e progressione neoplastica. Si distinguono proto-oncogeni, per i quali l'occorrenza di una mutazione conduce ad un guadagno di funzione; le forme mutanti iperattive di questi geni sono dette oncogeni. I geni in cui la presenza di una mutazione somatica induce una perdita di funzione sono, invece, chiamati geni oncosoppressori. La mutazione su un solo allele è sufficiente per indurre l'attivazione degli oncogeni: in questo caso la mutazione ha effetto dominante. Al contrario, la perdita di funzione dei geni oncosoppressori necessita di una lesione su entrambi gli alleli (effetto recessivo). Una terza classe di geni (*care-takers*) è rappresentata da quelli che regolano i processi di riparazione del DNA e controllano

processi responsabili della ricombinazione meiotica e della segregazione cromosomica: se inattivati, mutazioni in oncogeni e geni oncosoppressori avvengono con maggiore frequenza. Infine alterazioni epigenetiche (non-mutazionali) possono condurre alla aumentata o ridotta espressione di questi geni. La definizione del ruolo causale di queste alterazioni risulta di più difficile interpretazione rispetto alla identificazione di mutazioni: il livello delle alterazioni cromatiniche è difficilmente quantificabile rispetto all'evento mutazionale che è, per definizione, digitale (mutazione presente *vs* assente).

Si definisce pertanto il processo di oncogenesi come un processo costituito da stadi successivi caratterizzati dalla progressiva acquisizione, da parte della cellula neoplastica, di mutazioni attivanti a livello dei geni oncogeni e inattivanti a livello dei geni oncosoppressori.

Attualmente non è stato del tutto chiarito il numero di mutazioni somatiche necessarie per l'induzione del fenotipo maligno. Si è stimato che nel corpo umano normale avvengono nel corso della vita  $10^{16}$  divisioni cellulari; anche in un ambiente libero da mutageni le mutazioni avvengono spontaneamente, con un valore di circa  $10^6$  mutazioni per geni per divisione cellulare. Pertanto, nel corso della vita, è probabile che ogni singolo gene subisca una mutazione in circa  $10^{10}$  distinte occasioni. È stato dimostrato che la frequenza di mutazioni in una cellula tumorale è simile a quella attesa in una cellula normale al termine di diversi passaggi replicativi [4]. Inoltre l'introduzione di una singola mutazione somatica in linee cellulari epiteliali immortalizzate (*Knock-In*) non è in grado di determinarne la trasformazione, pur inducendo le proprietà biochimiche attese dalla attivazione del gene [5].

Queste osservazioni suggeriscono importanti implicazioni. In primo luogo non tutte le mutazioni risultano funzionalmente attive: si distinguono, infatti, mutazioni funzionalmente attive, *drivers* del fenotipo maligno, e mutazioni *passengers*, che, invece, non esitano in variazioni fenotipiche [6]. Inoltre l'instabilità genetica del clone neoplastico è requisito essenziale per la selezione Darwiniana del clone stesso e per la progressione neoplastica; tuttavia il livello delle alterazioni genetiche deve essere evidentemente maggiore di quello di una cellula normale ma non così elevato da impedire l'ulteriore replicazione cellulare e l'induzione del programma di apoptosi [7].

#### Alterazioni nella trasduzione del segnale cellulare

La maggior parte dei geni critici per il cancro codificano per proteine che regolano importanti funzioni della cellula quali: sopravvivenza, proliferazione, differenziazione e motilità e mediano il *cross-talk* tra cellule vicine. In condizioni fisiologiche questi processi biologici derivano, nella maggior parte dei casi, dalle interazioni tra complesse vie di segnale mediate da fattori di crescita, citochine ed ormoni. Si definisce pertanto trasduzione del segnale il processo attraverso cui le informazioni vengono trasmesse dall'ambiente esterno a quello intracellulare inducendo l'attivazione di meccanismi di risposta quali proliferazione, differenziazione e morte cellulare. L'interazione tra un fattore di crescita e il suo recettore è specifica e attiva, tramite secondi messaggeri, una cascata di risposte biologiche, sovente ridondanti, all'interno della cellula. La trasmissione del segnale al nucleo della cellula conduce alla espressione di geni coinvolti nei processi di mitosi e differenziazione della cellula. In situazioni patologiche, quali il cancro, l'espressione di geni attivati da vie di segnale, a loro volta attivate da fattori di crescita, contribuisce alla induzione della proliferazione aberrante della cellula maligna (Figura 2).

Nonostante molti dei mediatori del segnale siano ridondanti nella cellula, è importante sottolineare che:

1. geni diversi fanno parte della stessa via di segnale; in altre parole il numero dei *pathways* di segnale è definito e molto minore di quello dei geni critici del cancro;
2. alterazioni in un numero relativamente piccolo di vie di segnale sottendono tipi di tumore differenti. Ne deriva pertanto che esiste una cellulo-specificità dell'effetto della alterazione di una via di segnale. Inoltre è verosimile che la cronologia della acquisizione delle alterazioni sia responsabile dello sviluppo di tumori diversi a partire da una stessa cellula trasformata.

Infine queste osservazioni giustificano l'efficacia e l'utilizzo della stessa terapia *targeted* in tumori differenti portatori, però, delle stesse alterazioni molecolari [8].

In particolare nel cancro sono coinvolti fattori di crescita che legano recettori trans-membrana a funzione tirosin-chinasica. Le cellule tumorali sono in grado di produrre fattori di crescita e recettori inducendo la trasmissione del segnale in maniera autocrina e/o paracrina. La cellula trasformata è in grado di secernere fattori di crescita biologicamente attivi che attivano con *loop* autocrino i recettori presenti alla superficie della cellula stessa e possono agire con stimolazione paracrina anche su cellule adiacenti. Inoltre i recettori per i fattori di crescita possono essere attivati indipendentemente dalla presenza del ligando a causa di lesioni molecolari, e.g. mutazioni (Figura 3).

Nei recettori a funzione tirosin-chinasica la presenza di mutazioni somatiche induce modificazioni conformazionali del recettore stesso; in tal modo esso dimerizza e transfosforila il recettore adiacente assumendo uno stato persistentemente attivo. Infine l'attivazione del recettore *wild type* può avvenire in modo inappropriato quando il recettore è presente in numero maggiore del previsto sulla superficie della cellula. Questa situazione è molto spesso conseguente al fenomeno di amplificazione del gene che codifica per il recettore stesso. Per amplificazione genica si intende un aumentato numero di copie di una ristretta regione cromosomica; questo fenomeno, ancorché rilevante nel processo di oncogenesi, non è trattato in dettaglio in quanto esula dall'obiettivo dello studio clinico affrontato in questo lavoro di tesi.

### ***Oncogenetica del carcinoma broncogeno non a piccole cellule (NSCLC)***

#### *Inquadramento epidemiologico, istologico e clinico-terapeutico*

Il tumore del polmone, attualmente, è il carcinoma più frequentemente diagnosticato ed è la principale causa di morte per tumore solido al mondo, con un'incidenza che è aumentata del 250% negli ultimi 50 anni. I tassi di sopravvivenza, variabili sulla base dello stadio di malattia e del performance status (PS) del paziente, pur essendo aumentati negli ultimi 30 anni grazie ai miglioramenti nella tecnica di diagnosi e alla introduzione di terapie di associazione, permangono molto bassi: in media solo il 15% dei pazienti è vivente a 5 anni dalla diagnosi. L'età media di insorgenza (o per meglio dire, al momento della diagnosi) varia tra i 40 e 70 anni di età, con un picco intorno ai 50-60 anni; solo il 2% dei casi è diagnosticato prima dei 40 anni [9].

Più del 99% dei tumori del polmone sono carcinomi. Dal punto di vista isto-patologico e clinico (probabilità di metastatizzazione a distanza e sensibilità ai farmaci) il carcinoma broncogeno è distinto in due istotipi: carcinoma broncogeno non a piccole cellule (*Non-Small Cell Lung Cancer* - NSCLC) e carcinoma a piccole cellule o microcitoma (*Small Cell Lung Cancer* - SCLC). Il NSCLC rappresenta circa il 75-80% delle diagnosi ed è a sua volta suddiviso in quattro sottogruppi: il carcinoma squamocellulare o epidermoidale (SCC), l'adenocarcinoma (ADK) con la sua variante bronchiolo-alveolare (BAC), il carcinoma a grandi cellule (LCC), inclusa la sua variante neuroendocrina (LCNEC) e il carcinoma anaplastico. I diversi istotipi hanno sedi di insorgenza generalmente differenti: il SCLC e il SCC hanno solitamente localizzazione centrale-parailare, mentre sono a crescita periferica il LCC e l'ADK, compresa la sua variante BAC, che, tuttavia, può presentarsi anche con una distribuzione diffusa simil-polmonitica. La sede di insorgenza condiziona e determina la sintomatologia di esordio che è, comunque, molto aspecifica: il 15% dei casi sono del tutto asintomatici e la diagnosi avviene casualmente nel corso di esami strumentali di controllo. L'ADK è attualmente l'oncotipo di più frequente diagnosi (30-45% dei casi) e predomina nei soggetti non-fumatori; nel 2-4 % delle diagnosi è descritta la variante BAC, spesso associata a concomitanti o pregresse patologie interstiziali ad esito fibrosante (come le patologie granulomatose, la fibrosi idiopatica, le malattie autoimmuni e il morbo di Hodgking) (dati dal *Cancer Medicine* 6, on-line ed.).

Almeno nel 75% dei casi il tumore del polmone è correlato all'esposizione al fumo; il restante 25% dei casi insorge in soggetti non fumatori e rappresenta specificatamente il 15% dei tumori polmonari nei

maschi e il 53% nelle femmine. Gli oncotipi più frequentemente associati all'abitudine al fumo di tabacco sono il SCC e il SCLC. L'SCC rappresenta circa un terzo delle diagnosi, spesso caratterizzato da necrosi centrale e con un indice mitotico molto basso. L'LCC rappresenta circa il 9% delle diagnosi di NSCLC; è caratterizzato dalla presenza di cellule non differenziate, sia in senso ghiandolare sia epidermoidale. Sono, peraltro, descritte varianti a cellule fusate, a cellule giganti (complessivamente l'1% delle diagnosi di LCC) e la variante neuroendocrina, che presenta un andamento clinico e un profilo di risposta terapeutica simile a quelli del SCLC. Se si considera il tumore polmonare non-correlato al fumo come un'entità nosologica distinta, esso rappresenta la settima causa di morte per cancro a livello mondiale. La relazione causale con il fumo di sigaretta è ben documentata ed è responsabile di un incremento di 10-20 volte del rischio di insorgenza di cancro polmonare rispetto ai non fumatori. Tuttavia molti studi hanno posto in evidenza il ruolo patogenetico di altri fattori: ambientali (esposizione all'asbesto, ad inquinanti ambientali, fattori introdotti con l'alimentazione), ormonali (correlati ai livelli di espressione dei recettori degli estrogeni), genetici (polimorfismi del sistema del citocromo P450, nei geni coinvolti nella riparazione dei danni del DNA, nei loci genici associati ad una maggiore suscettibilità all'insorgenza di cancro all'interno di una stessa famiglia), virali (descritto un ruolo patogenetico per il papilloma virus (HPV), nelle varianti 16 e 18, e per il retrovirus *Jaasiekte sheep* (JSRV))[10].

Ad oggi per il tumore del polmone non esiste una metodica diagnostica validata come *screening* di soggetti a rischio. In caso di sospetto clinico di carcinoma broncogeno le indagini strumentali sono rappresentate, in primo luogo, dall'esame radiografico standard del torace; il completamento della stadiazione richiede tecniche di *imaging* quali TC (con o senza MdC) e TC-PET. Per la diagnosi istologica si ricorre alla metodica dell'agoaspirazione trans-toracica (*fine needle aspiration cytology* - FNAC) sotto guida TC nel caso di masse toraciche periferiche o sub-mantellari o extra-toraciche, biopsia endobronchiale (EBB) e/o trans bronchiale (TBB) nel caso di lesioni centrali vegetanti con interessamento di linfonodi in stazioni mediastiniche accessibili; in alcuni casi è possibile l'accesso biotico sotto guida ecografica. La strategia terapeutica è scelta in base all'estensione della neoplasia la cui stadiazione è basata sul sistema TNM (AJCC *Cancer Staging Manual*, 6th ed. 2002) che consente di definire situazioni a prognosi progressivamente peggiore (Figura 4).

Nel NSCLC il principale approccio terapeutico, con intento curativo, consiste nella resezione chirurgica (eventualmente preceduta e/o seguita da chemioterapia) limitata però ai soli stadi iniziali ed a eventuali lesioni localmente avanzate (stadio IIIA) ma è gravata, soprattutto in questi ultimi, da un *outcome* a lungo termine peggiore. La maggior parte dei pazienti, al momento della diagnosi, presenta una malattia avanzata o metastatica (stadio IIIB e IV); in questi casi l'approccio terapeutico si fonda, essenzialmente, sull'associazione tra più linee poli-chemioterapiche e di terapia radiante concomitante o sequenziale (*combined modality therapy*): 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%. La chemioterapia attuale si basa sull'associazione tra i derivati del platino (agente alchilante) con i chemioterapici di terza generazione quali: gemcitabina (inibitore della DNA polimerasi), vinorelbina (alcaloide della vinca), pemetrexed (antimetabolita). Tale terapia di associazione si è dimostrata più efficace della sola terapia di supporto (*Best Supportive Care- BSC*) nell'aumentare la sopravvivenza sia dei pazienti in cui viene utilizzata come terapia adiuvante sia nei pazienti in stadio avanzato, ma i tassi di risposta rimangono inferiori al 15%. Ciò è verosimilmente dovuto al fatto che, ancora attualmente, la scelta del farmaco chemioterapico e delle diverse associazioni viene fatta empiricamente, sul meccanismo di attività antitumorale delle singole molecole e sulla valutazione della possibile tossicità crociata e cronica [11].

Biologia molecolare del NSCLC

• Suscettibilità dell'ospite

Studi molto recenti sulla suscettibilità genetica individuale al rischio di sviluppare il tumore del polmone hanno posto l'attenzione su polimorfismi del gene codificante il recettore nicotico dell'Acetilcolina (Ach). È stato infatti dimostrato che polimorfismi genici nel *locus* cromosomico 15q21 correlano in modo statisticamente significativo sia con lo sviluppo di tumore del polmone sia con l'abitudine tabagica o la propensione a fumare [12]. In questa regione cromosomica sono contenuti diversi geni, in particolare tre, che codificano per le sub-unità del recettore nicotico dell'Ach: CHRNA5, CHRNA3 (che codificano per le sub unità recettoriali  $\alpha 5$  e  $\alpha 3$ ) e CHRNB4 (subunità recettoriale  $\beta 4$ ). In particolare nel gene CHRNA5 una sostituzione non sinonima (D398N - sostituzione dell'acido aspartico con asparagina in posizione 398), che codifica per una regione altamente conservata del recettore (il dominio M2), è uno dei marcatori di predisposizione di malattia più potenti. Poiché polimorfismi in questi geni giocano un importante ruolo nella dipendenza da nicotina, è stata studiata anche la correlazione tra lo sviluppo di cancro e l'abitudine tabagica: come atteso, il rischio di malattia risulta maggiore nei soggetti fumatori ed ex-fumatori rispetto a chi non ha mai fumato; non si documentano invece correlazioni con l'istotipo della malattia [13]. In conclusione, si potrebbe affermare che la variabilità genetica individuale, in particolare nell'ambito del braccio lungo del cromosoma 15, correla direttamente con il rischio di dipendenza da nicotina e, quindi, può esporre al rischio di sviluppo di patologie correlate al fumo quali tumore polmonare e malattie cardiovascolari.

Un ulteriore meccanismo di incrementata suscettibilità allo sviluppo di carcinoma broncogeno è rappresentato dalla ridotta capacità di riparazione del DNA, soprattutto in soggetti fumatori. In particolare alterazioni germinali dei geni del sistema di *Nucleotide Excision Repair* (NER), tra cui ERCC1 (*Excision Repair Cross Complementing-1*) e RRM1 (Ribonucleotide Reduttasi Subunità-1), sono state associate ad un maggior rischio di insorgenza di cancro. L'aumentata espressione di ERCC1 e RRM1 nel NSCLC correla con una prognosi migliore ma con ridotta sensibilità alla terapia con platino [14].

• Alterazioni molecolari responsabili dello sviluppo e della progressione neoplastica

I fattori ambientali (*e.g.* fumo di tabacco) e la suscettibilità individuale interagiscono nel processo di carcinogenesi polmonare. L'esposizione cronica ad agenti cancerogeni induce la formazione di lesioni epiteliali multifocali che presentano alterazioni genetiche identificate in perdita di eterozigotà dei *loci* 17p,3p,9p,8p,18q e amplificazione di 11q13. Ciascuna lesione *patch* ha origine monoclonale e non presenta caratteri di crescita invasiva e/o metastatica (lesione pre-maligna). È pertanto verosimile che, nei soggetti fumatori, il fenomeno di cancerizzazione d'organo (*field cancerization*) culmini nella trasformazione maligna partendo da cellule precursori (CSC - *Cancer Stem Cells*) che derivano da quadri cito-istologici pre-neoplastici (Figura 5).

I carcinomi che insorgono nei soggetti fumatori e nei non fumatori presentano profili molecolari - incluse mutazioni di p53, KRAS, EGFR ed ErbB-2 - distinti. Questi marcatori molecolari sono predittivi di rischio ma anche di prognosi e sensibilità al trattamento. Così possono essere identificati marcatori della fase precoce (*e.g.* mutazioni di p53 ed EGFR) e marcatori della fase tardiva (*e.g.* mutazioni di PIK3CA) di sviluppo del cancro; questi marcatori possono, inoltre, essere rilevanti per la definizione dei meccanismi di resistenza ai farmaci *targeted*. Alterazioni precoci del cancro polmonare sono costituite dalla perdita di eterozigotà della regione cromosomica 3p21.3 (dove sono localizzati i geni RASSF1A e FUS1), 3p14.2 (dove è localizzato il gene FHIT- *fragile histidine triad gene*), 9p21 (*p16*) e 17p13 (*p53*). Tutti questi sono geni oncosoppressori. Mutazioni di EGFR avvengono precocemente nello sviluppo di ADK

non correlato al fumo di tabacco mentre nei soggetti fumatori si sviluppano più precocemente mutazioni di KRAS. Successivamente, nella progressione tumorale, è descritta l'alterazione di oncogeni responsabili dell'incremento della motilità cellulare (PI3CA) e della crescita invasiva (MET) (Figura 6) [15-16].

Il profilo molecolare del NSCLC è differente da quello del SCLC [17]. In generale, molti dei risultati ottenuti dalla ricerca scientifica sono relativi al carcinoma broncogeno non-a-piccole cellule: il microcitoma polmonare è molto spesso accomunato al NSCLC ma è evidente che si tratta di una patologia distinta, anche per quanto riguarda le alterazioni genetiche *drivers*. La maggior parte degli studi clinici recenti sono, tuttavia, attuati su casistiche di NSCLCs e i risultati semplicemente traslati al microcitoma.

Infine è importante sottolineare che i tumori solidi sono costituiti da più tipi cellulari che differiscono per lo stato di differenziazione (*proliferative hierarchy*) e contengono un *subset* cellulare con caratteri fenotipici di staminalità (CSC) che mantiene l'esclusiva abilità di sostenere la tumorigenesi e che esprime, in maniera costitutiva, marcatori molecolari aspecifici di multi-resistenza ai farmaci [18]. È stato ipotizzato che, nell'albero respiratorio, esistano nicchie di cellule staminali diverse; è verosimile che da esse originino le CSCs del carcinoma broncogeno. Nel tratto prossimale le cellule basali hanno fenotipo *stem-like*; nel tratto più periferico l'identificazione morfologica delle cellule staminali è più difficile: probabilmente tali cellule sono rappresentate dalle cellule di Clara nei bronchioli e da pneumociti di tipo II a livello alveolare. Varianti di queste cellule sono probabilmente le cellule inizianti il carcinoma broncogeno: non sono ad oggi note le lesioni molecolari responsabili della trasformazione delle cellule staminali in CSCs e della differenziazione di queste ultime in cellule della massa neoplastica vera e propria [19].

È di seguito analizzata la via di segnale di EGFR e KRAS (Figura 7). Come sopra descritto, le alterazioni molecolari di entrambi gli oncogeni hanno un ruolo rilevante nell'induzione del tumore del polmone ed in particolare del NSCLC e rappresentano marcatori genetici a valore prognostico e predittivo di risposta ai farmaci inibitori *targeted*.

- Meccanismi di attivazione di EGFR

Come descritto in precedenza, EGFR codifica per il recettore del fattore di crescita epidermico (EGF). EGF è costituito da 53 aminoacidi uniti da 3 ponti disolfuro e deriva dal clivaggio proteolitico di un precursore di 1200 aminoacidi. Altri membri della famiglia di EGFR includono: TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor- $\alpha$* ), AR (*amphiregulin*), HB-EGF (*heparin-binding EGF*), BTC ( *$\beta$ -cellulin*), EPR (*epiregulin*) e fattori della famiglia NRG (*neuregulin*). Queste molecole condividono circa il 30% di omologia di sequenza e il 100% di omologia a livello dei sei residui cisteinici presenti nel fattore EGF maturo. I fattori appartenenti alla famiglia di EGF legano specificamente i recettori trans membrana della famiglia EGF/Erb che include: EGFR (o ErbB-1), ErbB-2 (o HER-2), ErbB-3 e ErbB-4. Il legame con il recettore induce la dimerizzazione (omodimeri o eterodimeri) e l'attivazione per la transforilazione delle tirosine del dominio chinasi (Figura 8).

Il segnale trasmesso dalla attivazione del recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) è coinvolto nella regolazione di importanti processi biologici tra cui la proliferazione cellulare, l'apoptosi, l'angiogenesi e la capacità di invasione. Elevati livelli di espressione della chinasi EGFR sono stati identificati in diversi tumori solidi: testa-collo, ovaio, vescica, encefalo, mammella e polmone, e di frequente correlano con una prognosi infausta. L'iper-espressione della proteina è facilmente identificabile con tecniche di immunostochimica e sottende l'attivazione costitutiva della chinasi conseguente a lesioni molecolari quali mutazioni somatiche e/o amplificazione genica.

I recettori mutati sono, infatti, funzionalmente e costitutivamente attivi, trasmettendo in modo persistente il segnale proliferativo, antiapoptotico e proinvasivo all'interno della cellula. In altre parole, i recettori mutati funzionano come oncogeni. Globalmente la frequenza delle mutazioni di EGFR è di circa il 77% dei casi nei pazienti che rispondono alla terapia anti-EGFR, mentre scende al 7% nei casi resistenti alla terapia. Le mutazioni somatiche sono relative agli esoni 18-19-20-21 che codificano per il dominio chinasi del recettore. In particolare, nel recettore mutato, viene indotta una modificazione conformazionale del sito di legame dell'ATP: in tal modo EGFR diventa costitutivamente attivo ma anche meno affine all'ATP e, pertanto, più suscettibile al legame con il farmaco inibitore [20]. Circa il 45% dei cambi interessa l'esone 19: si tratta di delezioni *in-frame* di triplette codificanti per gli aminoacidi 747-750; la mutazione più frequente a livello dell'esone 21 risulta nella sostituzione L858R ed è presente in circa il 40% dei casi mutati; mutazioni negli esoni 18 e 20 sono presenti nel rimanente 10% dei pazienti. I casi di NSCLC con mutazione dell'esone 19 sembrano rispondere meglio alla terapia con piccoli inibitori rispetto ai portatori della mutazione L858R. L'incidenza delle mutazioni di EGFR nel NSCLC è di circa il 10% nei pazienti di origine caucasica; tale frequenza sale al 30-50% nei pazienti asiatici. Le mutazioni occorrono più frequentemente in pazienti di sesso femminile, non fumatrici e affette da adenocarcinoma, variante BAC. Dati pre-clinici e clinici suggeriscono che le mutazioni di EGFR avvengono in una fase precoce dello sviluppo del carcinoma polmonare: topi transgenici, mutati per la delezione dell'esone 19, o portatori del cambio L858R, sviluppano iperplasia adenomatosa atipica che, di fatto, costituisce il danno istologico precursore di adenocarcinomi a crescita periferica che evolvono tipicamente nella variante BAC [21]. Per quanto riguarda l'amplificazione di EGFR (7p12), i dati sono discordanti con le percentuali relative all'aumento del numero di copie analizzate in FISH che variano nelle diverse casistiche: da meno del 20% dei casi al 40% [22].

- Meccanismi di attivazione di KRAS

La via di segnale di KRAS-BRAF-MEK è a valle del *signalling* di EGFR e di altri recettori che mediano la proliferazione cellulare [23]. Il gene KRAS (*Kirsten Rat sarcoma 2 viral oncogene Homolog*) è localizzato sul cromosoma 12p12 e codifica per una GTP-asi localizzata sulla faccia intracitoplasmatica della membrana cellulare. L'attivazione costitutiva di KRAS, indotta da mutazioni somatiche della sequenza codificante, comporta una perdita della funzione GTP-asi che è, invece, necessaria per riportare la proteina RAS allo stato di inattivazione tramite il legame con il GDP (Figura 9).

In molti tumori solidi, tra cui NSCLC, è stato dimostrato che le mutazioni di EGFR e KRAS avvengono in maniera mutualmente esclusiva [24]. Le mutazioni di KRAS sono state identificate nel NSCLC più di 20 anni fa; solo recentemente sono state riconosciute quali marcatori di resistenza alla terapia anti-EGFR. KRAS è mutato in circa il 17% dei NSCLCs, prevalentemente negli ADKs. Circa il 97% delle mutazioni somatiche di KRAS nel NSCLC inducono sostituzioni aminoacidiche nei codoni 12 e 13. Nelle forme avanzate/metastatiche le mutazioni di KRAS sono predittori negativi altamente specifici di resistenza alla sola terapia con Erlotinib. Le mutazioni di KRAS sembra siano più frequenti nei carcinomi insorti in soggetti fumatori: in particolare, sostituzioni G>T sono associate a tumori fumo-indotti mentre cambi G>A sono stati recentemente descritti in ADKs insorti in pazienti non fumatori. Inoltre è stato dimostrato che le mutazioni di KRAS insorgono precocemente nel corso dell'oncogenesi polmonare e sono dimostrabili anche in lesioni pre-neoplastiche quali l'iperplasia alveolare atipica [25].

Iniziali studi clinici avevano evidenziato una associazione tra l'occorrenza di mutazioni di KRAS e una prognosi peggiore: di fatto, attualmente, il valore prognostico della attivazione di

KRAS è ancora dibattuto. Studi recenti hanno riportato frequenze mutazionali più elevate in ADKs a variante micropapillare che presentano alta capacità di invasione e fenotipo più aggressivo [26]. Ad oggi non esistono inibitori diretti di KRAS per i quali sia stata comprovata l'efficacia clinica; tuttavia molte molecole sono in fase di studio e sviluppo. Tra le molecole disponibili, gli inibitori dell'enzima farnesyl-trasferasi (FT), che regola la corretta maturazione e funzione della proteina RAS, sono stati testati sul carcinoma broncogeno non a piccole cellule: in studi di fase II l'inibitore di FT R115777 (Zarnestra® Johnson & Johnson) ha mostrato solo una modesta efficacia clinica quando utilizzato come trattamento di prima linea nel NSCLC avanzato [27].

### ***Farmacogenetica e farmacogenomica del NSCLC***

#### ***Farmacogenetica dei farmaci chemioterapici antineoplastici***

La definizione del cancro come malattia genetica e la progressiva conoscenza a livello molecolare delle alterazioni di segnale cellulare responsabili del programma di crescita neoplastica hanno condotto allo sviluppo di un diverso approccio della gestione terapeutica del malato oncologico. In tal senso, lo studio delle mutazioni dei geni implicati nella oncogenesi (oncogeni, geni oncosoppressori, geni con azione di stabilizzazione e controllo) è stato uno dei principali bersagli della ricerca scientifica nelle ultime due decadi. La maggior parte dei farmaci chemioterapici (anche di ultima generazione) agisce inducendo il programma di morte cellulare: lo studio delle mutazioni somatiche selezionate durante il processo di oncogenesi e, pertanto, correlate direttamente al tumore, ha consentito di disegnare molecole in grado di interferire con i meccanismi di proliferazione della cellula agendo sulla trasduzione del segnale e bloccandone così la replicazione a finalistica. Sulla base di queste considerazioni, e con il supporto dei recenti progressi nell'ambito della biologia molecolare, i maggiori sforzi della ricerca in ambito di terapia oncologica sono orientati, attualmente, in due direzioni:

- la definizione delle alterazioni genetiche alla base del processo di oncogenesi e il disegno di farmaci mirati a bloccarle o inattivarle - si definisce così una *targeted therapy* quella terapia che, prevedendo l'utilizzo di piccole molecole di sintesi o altre sostanze quali, ad esempio, anticorpi monoclonali, è in grado di colpire bersagli molecolari tramite un'azione farmacologica selettiva e specifica al fine di inibire le potenzialità proliferative del clone neoplastico ottenendo la sua eliminazione (definizione del *National Cancer Institute* - NCI);
- lo studio delle basi genetiche della mancata risposta ai farmaci antiblastici responsabile da un lato della insorgenza di gravi reazioni avverse e dall'altro della mancata efficacia di un dato trattamento farmacologico, con possibile esposizione del paziente ai soli effetti tossici del trattamento stesso senza alcun beneficio.

#### ***Basi genetiche della variabilità individuale nella risposta ai farmaci***

Le reazioni avverse ai farmaci costituiscono la quarta causa di morte nei paesi occidentali e la maggior parte di queste risposte imprevedibili è dovuta alla variabilità inter-individuale nella risposta ai farmaci. L'aspetto speculare di questa variabilità è costituito dalla mancata efficacia di un trattamento farmacologico con la possibile esposizione del paziente ai soli effetti tossici del trattamento senza alcun beneficio.

È stato ormai ampiamente definito il ruolo di specifiche alterazioni a livello molecolare nella variabilità interindividuale nella risposta ai farmaci e nella insorgenza di reazioni avverse ad un dato trattamento. Se in passato tale variabilità era interpretata come legata a fattori essenzialmente non genetici (età, sesso, stile di vita), oggi si pensa che la componente genetica individuale sia responsabile di almeno il 95% della risposta ad un farmaco [28]. Tale variabilità interindividuale è conseguente al fatto che circa l'80% dei geni sono presenti sotto forma di varianti alleliche.

Alla iniziale osservazione clinica che diversi pazienti trattati con lo stesso farmaco possono presentare diverse concentrazioni sieriche e urinarie del farmaco, con conseguente differente risposta clinica, è seguita l'identificazione che tale variabilità è regolata a livello genetico (Figura 10).

Si parla di farmacogenetica per definire quella disciplina che studia come l'assetto genetico degli individui influenzi l'azione dei farmaci ad essi somministrati con l'obiettivo di progredire e quindi prevenire reazioni avverse e fallimenti terapeutici, ma anche di favorire l'identificazione del farmaco giusto e del suo corretto dosaggio per ogni singolo paziente. Spesso i termini farmacogenetica e farmacogenomica sono utilizzati indifferentemente; tuttavia il concetto di farmacogenomica risulta essere più ampio e comprende non solo lo studio delle variazioni interindividuali nella sequenza del DNA in relazione alla risposta ai farmaci - alla base della farmacogenetica - ma si estende alla scoperta e al disegno di nuovi farmaci e al loro impiego clinico [29].

In generale, i geni coinvolti nella determinazione della risposta ai farmaci sono:

- Geni codificanti per il bersaglio terapeutico primario (recettori, canali ionici o enzimi);
- Geni codificanti per proteine coinvolte nell'assorbimento, metabolismo, escrezione dei farmaci.

Il metabolismo dei farmaci - o meglio degli xenobiotici - avviene prevalentemente a livello epatico con lo scopo di rendere le sostanze introdotte maggiormente idrosolubili, favorendone, in tal modo, l'eliminazione dall'organismo con la bile e le urine (Figura 11).

Come è noto, questo processo avviene attraverso fasi diverse:

- Reazioni di fase I: reazioni di funzionalizzazione, che rendono i substrati maggiormente reattivi.
- Reazioni di fase II: reazioni di coniugazione, che rendono i substrati più idrosolubili.
- Reazioni di fase III: coinvolgono i meccanismi di eliminazione.

Polimorfismi a singolo nucleotide sono stati dimostrati in numerosi geni codificanti per ciascuna delle fasi di metabolizzazione dei farmaci con conseguenze funzionali diverse a carico del prodotto genico: in particolare è stata dimostrata l'esistenza di varianti alleliche inattive di differenti membri della superfamiglia del citocromo P450 (e.g. CYP2D6, CYP2C19, CYP2A6) i cui polimorfismi causano l'introduzione nella sequenza di codoni di stop con la conseguente produzione di proteine troncate o causano sostituzioni aminoacidiche che determinano proteine inattive. Nel caso degli enzimi preposti al metabolismo degli xenobiotici, entrambi gli alleli contribuiscono alla produzione del prodotto per cui la presenza di una variante allelica inattiva determina la produzione del 50% (se eterozigosi) o l'assenza dell'enzima (se omozigosi) rispetto al normale; d'altro canto è stato evidenziato che alcuni farmaci possono essere metabolizzati da più di un enzima di fase I o II, seppur con diversa efficienza [30]. La presenza di varianti alleliche inattive è in genere studiata in relazione alla comparsa di reazioni avverse; tuttavia, dal momento che talvolta i farmaci vengono assunti non in forma attiva ma come pro-farmaci (molecole inattive che necessitano di essere attivate proprio dagli stessi meccanismi di metabolizzazione degli xenobiotici), è importante sottolineare come un soggetto, omozigote per una variante allelica inattiva di un enzima necessario alla conversione del pro-farmaco, andrà incontro non ad una reazione avversa, bensì a fallimento terapeutico. Gli studi di farmacogenetica si basano sulla ricerca di una correlazione tra un dato aplotipo e una determinata risposta ad un trattamento e posso essere:

- di tipo diretto: studi di associazione allelica, definita sulla base di conoscenze a priori, in cui si misura la frequenza di una variante allelica in soggetti che manifestano una determinata risposta ad un dato trattamento se confrontati con un gruppo di controllo. Per questi studi esistono due modelli: il modello poligenico, secondo cui il tratto farmacogenetico dipende da numerose varianti alleliche che concorrono alla risposta al trattamento con effetto additivo, ma che singolarmente hanno un modesto effetto quantitativo, e il modello epistatico, secondo cui tutte le varianti alleliche dei geni coinvolti devono essere presenti per determinare il fenotipo;

- di tipo indiretto, ovvero di *linkage*, che non richiedono conoscenze a priori, ma che si basano sulla identificazione di specifici polimorfismi, spesso neutrali perchè situati in regioni intergeniche, la cui unica rilevanza deriva dal fatto che risultano essere sufficientemente vicini a varianti alleliche responsabili di un certo profilo farmacogenetico; tale vicinanza è responsabile del fatto che il sito polimorfico e l'allele in studio vadano difficilmente incontro a ricombinazione meiotica e vengano trovati frequentemente associati sullo stesso cromosoma nella popolazione; il fenomeno per cui due loci difficilmente ricombinano è noto come *linkage disequilibrium* ed è indice della vicinanza tra i medesimi.

#### Meccanismi di resistenza ai farmaci chemioterapici antineoplastici

Subito dopo l'introduzione della chemioterapia antineoplastica si è scoperto che, come per la terapia antibiotica, esiste il problema della resistenza ai farmaci e della conseguente mancata risposta alla terapia.

In generale la sopravvivenza delle cellule tumorali è correlata direttamente al loro numero e a quello delle cellule sopravvissute dopo terapia. Per la maggior parte dei farmaci esiste un chiaro rapporto tra dose e capacità di eliminare le cellule tumorali entro i limiti di tossicità: la distruzione cellulare da parte dei farmaci (in una popolazione cellulare cinematicamente e fenotipicamente omogenea) segue la legge cinetica di primo ordine secondo un modello esponenziale (*log-kill*) per cui una data dose di farmaco distrugge una frazione costante di cellule, non un numero fisso di esse [31-32].

Una neoplasia viene definita resistente o refrattaria ad un dato farmaco antiblastico quando si osserva una sua progressione nel corso del trattamento stesso. Sebbene il fenomeno della resistenza sia dovuto a più meccanismi se ne distinguono due tipi :

- resistenza temporanea, che dipende dalla sede anatomica (esistenza di santuari farmacologici ovvero di compartimenti cellulari inaccessibili al farmaco), da condizioni di diminuita vascolarizzazione (con conseguente limitata diffusione e penetrazione del farmaco nel tessuto tumorale), dalla peculiare cinetica cellulare (bassa frazione di crescita);
- resistenza permanente, definita intrinseca se dipendente da fattori molecolari propri delle cellule tumorali (genotipi cellulari resistenti) o acquisita se insorta in tumori inizialmente sensibili alla chemioterapia e responsabile quindi di fenomeni di recidiva e di progressione.

Secondo il modello di mutazione somatica i fenotipi farmaco-resistenti insorgono rapidamente e casualmente con una frequenza indipendente dal tipo di farmaco. La dimensione (quantità di dose singola) e l'intensità (dose cumulativa somministrata in funzione del tempo) sono i componenti della dose del farmaco che vanno presi in considerazione per ridurre la probabilità della selezione di cloni cellulari farmaco-resistenti: ad una elevata intensità segue una distruzione rapida ed efficace così come una elevata dimensione implica un ridotto sviluppo di cloni resistenti; ne consegue pertanto la fondamentale importanza della dose iniziale di farmaco e della precocità dell'impostazione del trattamento. Esiste un'ampia fluttuazione nel numero di cellule farmaco-resistenti a parità di oncotipo e stadio della malattia (in generale aumentando la dimensione del tumore aumenta la selezione di cloni resistenti); inoltre, esistono evidenze sperimentali che dimostrano come alcune linee cellulari, esposte ad un unico agente citotossico, possano sviluppare la capacità di resistere ad un amplissimo spettro di farmaci diversi per struttura e meccanismo di azione (fenomeno della *Multi-Drug Resistance* - MDR). I meccanismi molecolari responsabili della farmaco-resistenza ai farmaci antiblastici sono conseguenti a:

- Diminuiti livelli del farmaco attivo in sede intracellulare.
  - *Diminuzione del trasporto intracellulare* → alterato legame con la molecola di trasporto.
  - *Aumento del trasporto extracellulare* → elevata espressione di proteine di membrana.Questo fenomeno appare correlato alla sovra-espressione nel tessuto tumorale di:

- P-glicoproteina (P-gP): glicoproteina di 170 KDa (codificata dal gene MDR1 - cromosoma 16), ad attività ATP-asi, localizzata nella membrana cellulare con funzione di pompa di trasporto (MDR1 appartiene alla famiglia di geni i cui prodotti sono definiti *ABC transporters*, accomunati dalla presenza di una sequenza che permette loro di legare e degradare ATP detta *ATP Binding Cassette*).
- *MultiDrug Resistance-associated Protein 1* (MRP1): proteina di 190 KDa appartenente alla famiglia degli *ABC transporters*.
- *Lung Resistance Protein* (LRP): proteina di 110 KDa, identificata in NSCLC trattati con adriamicina (il gene è localizzato sul braccio corto del cromosoma 16); è la principale proteina di un complesso ribonucleoproteico detto *vault* (*Major Vault Protein* - MVP). I *vaults* sono costituiti da 4 diverse proteine di cui LRP/MVP è la più abbondante e da una piccola molecola di RNA (vRNA). Non risulta ancora chiarito il meccanismo per cui è legata alla farmacoresistenza: è ipotizzabile la sua localizzazione su un poro nucleare - *nuclear pore complex* - anche se la maggior parte dei *vaults* è localizzata nel citosol.
- *Inattivazione del farmaco*
  - Sistema di inattivazione legato al glutatione (GST) che viene coniugato al composto da inattivare attraverso la glutatione-S-trasferasi (isoenzimi  $\alpha$ ,  $\mu$  e  $\pi$ ). Meccanismo di resistenza per diversi agenti alchilanti che sono substrati del GST (e.g. CDDP); può inoltre essere accoppiato ad un sistema di trasporto extracellulare del farmaco.
  - Esistenza di polimorfismi genetici relativi ai geni codificanti per gli enzimi coinvolti nella bio-trasformazione dei farmaci (enzimi di fase I, II e III) (dal *Cancer Medicine* 6, online ed).
- Differenza nell'importanza dei bersagli biochimici.
  - *Aumentata capacità di riparazione del DNA*.
  - *Alterazione del bersaglio del farmaco* → mutazioni dell'enzima bersaglio che presenta minore affinità per il farmaco. Questo tipo di alterazione è responsabile anche della MDR atipica con alterazione della topoisomerasi: diminuzione della espressione di mutazioni e alterazioni delle topoisomerasi II producono nel DNA rotture transitorie di un singolo filamento (topoisomerasi I) o di entrambi i filamenti (topoisomerasi II, di cui esistono 2 isoenzimi  $\alpha$  - 170KDa - e  $\beta$  - 180KDa - prodotti di geni diversi). Gli inibitori delle topoisomerasi II stabilizzano il complesso dell'enzima con il DNA con la conseguente rottura del filamento (antracicline, epipodofillotossine). Alterazioni quali-quantitative dell'enzima condizionano MDR atipica (resistenza crociata con altri farmaci - e.g. antimicrotubuli e alcaloidi della vinca - che sono associati al fenomeno MDR legato alla sovraespressione di P-gP).
- Alterazione dei geni e delle proteine regolatorie del ciclo cellulare.
  - *Ridotta capacità delle cellule tumorali ad entrare nel programma di morte* (apoptosi) dopo esposizione ad agenti antitumorali:
    - mutazioni di p53, proteina regolatoria del ciclo cellulare (60% in NSCLC) che può inoltre transattivare diversi geni (e.g. gene *p21* e gene *BAX*, responsabili di arresto del ciclo).
    - Alterazioni dell'equilibrio del dimero Bcl2 (prevenzione apoptosi)/dimero BAX (induzione apoptosi).
    - Mancata induzione alla apoptosi mediata da espressione di recettori di membrana (APO1/FAS), iniziatori del programma di morte cellulare.

Gli approcci attualmente in studio per contrastare l'insorgenza di farmaco-resistenza, in particolare di multiresistenza, prevedono lo sviluppo di:

- farmaci che si oppongono alla espulsione del chemioterapico mediante legame diretto e inibizione della P-gP (*e.g.* agenti steroidei ed immunosoppressori); inibitori di MRP1 che inibiscono il trasporto di ioni organici (*e.g.* inibitori protein-chinasi C, per cui dati sperimentali suggeriscono una correlazione tra l'espressione degli isoenzimi  $\alpha$  e  $\beta$ I e l'attività della P-gP); inibitori multispecifici per ABC *transporters*; inibitori del riparo del DNA e farmaci in grado di interagire con il sistema del glutatione; strategie contro lo sviluppo di resistenza secondaria alla ipossia tramite l'utilizzo di agenti vasodilatatori, di antiaggreganti, di agenti bioriduttivi (profarmaci attivati solo in ambiente ipossico, attivati da enzimi riducenti, quali ad esempio la mitomicina);
- agenti in grado di agire a livello dei *check points* del ciclo cellulare tramite il ristabilimento della attività della p53, attraverso la reintroduzione del gene p53, l'inibizione del gene MDM2 che codifica per una proteina che induce la degradazione di p53, l'inibizione della ubiquitinazione della proteina e l'impedimento della inibizione delle cellule *wild type* da parte di quelle mutate (la proteina agisce in tetrameri e la presenza di elementi mutati inattiva il tetramero).

Questo tipo di ricerca farmacologica si fonda, evidentemente, sui progressi della genomica funzionale (intesa come studio del ruolo fisiologico dei geni e distinta dalla genomica strutturale che determina la struttura delle proteine sulla base della sequenza nucleotidica) che ha l'obiettivo di delineare il pattern genetico del tumore, ma anche quello dell'ospite, arrivando a consentire, nel prossimo futuro, la valutazione a priori della probabilità di risposta e di tossicità del farmaco scelto.

#### Dalla farmacogenetica alla farmacogenomica

L'applicazione di queste conoscenze ha interessato evidentemente anche la ricerca farmacologica, non solo ma soprattutto in campo oncologico. I primi farmaci antitumorali utilizzati in clinica sono stati quelli che hanno come target il DNA e il suo sistema di riparazione: agenti alchilanti (ciclofosfamide), analoghi nucleosidici (gemcitabina, citosina arabinoside) e inibitori enzimatici (5-fluoro-uracile, metotrexate); sono stati successivamente introdotti farmaci in grado di agire e bloccare il ciclo cellulare, quali ad esempio agenti antitubuline (paclitaxel, docetaxel), e alcaloidi della vinca (vincristina e vinorelbina), così come inibitori della topoisomerasi I e II (irinotecan, topotecan) e antracicline (doxorubicina, daunorubicina). L'utilizzo di tali farmaci ha condotto alla possibilità di ottenere, almeno in alcuni tipi di tumori umani, una remissione più o meno durevole della malattia; d'altro canto, nonostante molteplici studi rivolti alla delucidazione molecolare dell'azione di questi farmaci e alla definizione dei meccanismi di resistenza messi in atto nelle cellule tumorali trattate, il rischio di fallimenti terapeutici, dovuti a multiresistenza o a tossicità gravi, risulta molto elevato e invariato nel tempo.

Sebbene la risposta ad un farmaco costituisca un fenotipo regolato da molteplici fattori, è attualmente confermato che la sistematica analisi mutazionale e funzionale delle alterazioni geniche è alla base della ricerca in campo farmacologico. La nuova generazione di farmaci antineoplastici ad oggi in commercio, e sui quali si stanno indirizzando gran parte degli studi scientifici, è stata studiata con un approccio differente, derivato dall'approfondimento delle conoscenze biomolecolari del processo di oncogenesi e dalla parallela applicazione di nuove tecnologie: se si può individuare il bersaglio dei farmaci chemioterapici classici nei meccanismi di replicazione della cellula neoplastica (quali, ad esempio, la regolazione del ciclo cellulare e dei meccanismi di riparazione del DNA), si può pensare ai nuovi farmaci *targeted* come a molecole che bloccano i segnali che portano la cellula neoplastica alla replicazione.

Le potenzialità della farmacogenomica sono enormi: le tecniche di genotipizzazione ad elevata sistematizzazione ed efficienza (*high throughput sequencing analysis*) consentono di testare migliaia di polimorfismi genici in una singola piattaforma; è possibile da un singolo campione di sangue o di tessuto biptico del paziente eseguire analisi di *screening* per un pannello di migliaia di geni e testare quelli in grado di determinare la risposta ad un dato farmaco [33]. Il valore in clinica di questo tipo di analisi risulta di grande interesse: la valutazione biomolecolare di una patologia riveste pertanto un aspetto fondamentale non solo al momento della diagnosi, ma diventa imprescindibile per l'impostazione della terapia e nella valutazione della variabilità nella risposta interindividuale ad un dato trattamento (Figura 12).

La definizione di farmacogenetica applicata ai farmaci di nuova generazione risulta, in questo senso, più complessa perché lo studio delle variazioni individuali nella risposta ai farmaci prevede l'analisi integrata:

- dei geni codificanti per proteine coinvolte nei processi di metabolizzazione dei farmaci;
- dei geni coinvolti nei *pathways* di segnale a livello intra ed intercellulare.

Il disegno di nuovi farmaci è basato sulla integrazione delle informazioni derivate da una duplice prospettiva molecolare:

- Intracellulare: la crescita e la progressione tumorale derivano dalla attuazione di specifici programmi genetici a livello cellulare e dalla attivazione aberrante di segnali di proliferazione e di crescita.
- Intercellulare: alterazioni genetiche e biochimiche che hanno luogo nello stroma peritumorale (e.g. neoangiogenesi, ipossia tissutale) contribuiscono all'attivazione dei programmi di proliferazione e invasione neoplastica.

Nella identificazione dei meccanismi molecolari alla base dell'effetto di un dato trattamento è importante però sottolineare alcuni punti critici:

1. la componente genetica della risposta ai farmaci è molto spesso poligenica. Gli approcci sviluppati per lo studio dei determinati poligenici sono basati essenzialmente su:
  - a. analisi e mappatura di dati siti di polimorfismo;
  - b. analisi di geni candidati basate sulla conoscenza a priori del meccanismo di azione del farmaco e dei *pathways* molecolari coinvolti nel suo metabolismo; il limite di questa strategia è dovuto essenzialmente alla spesso incompleta conoscenza della farmacocinetica e dei meccanismi di azione di un farmaco.
2. la necessità di una caratterizzazione biomolecolare della patologia da trattare; ciò consente di:
  - a. disegnare molecole in grado di bloccare precisi bersagli molecolari che sono diversi non solo in patologie diverse, ma in diversi pazienti con la stessa patologia;
  - b. identificare parametri utilizzabili per la valutazione quantitativa della risposta al farmaco.

Si deve sottolineare come questo tipo di approccio possa condurre a revisioni delle classificazioni nosologiche - non solo per le patologie neoplastiche - basate sulla identificazione di determinati genotipi che, sebbene possano essere in classi fenotipicamente non distinguibili, sono, in ultimo, responsabili della evoluzione della malattia e della variabilità nella risposta al trattamento.

Nonostante la ricerca scientifica e i progressi tecnologici abbiano consentito di definire molti dei *targets* molecolari attivi in diverse patologie, soprattutto in campo oncologico, per cui sono stati sviluppate decine di nuove molecole, l'evidenza dei dati clinici non consente entusiasmi: nell'ambito dei trattamenti oncologici le terapie convenzionali con agenti citotossici continuano ad essere la scelta in prima linea anche se sempre più spesso vengono associate al trattamento con farmaci nuovi. La sostanziale mancata efficacia della terapia *target* deriva da diversi fattori e in primo luogo dal fatto che il

blocco di una singola via di segnale non è, evidentemente, sufficiente a inibire la proliferazione cellulare. Su questa base devono essere ridefiniti alcuni parametri della farmacologia classica, quali:

- la resistenza al trattamento;
- la tossicità del farmaco;
- l'individuazione di *biomarkers* ed *endpoints* surrogati per la valutazione della risposta al trattamento.

I farmaci di nuova generazione hanno per definizione una azione selettiva e specifica, basata in generale sulla inattivazione di una cascata di segnale attivata in maniera aberrante nel tempo e nello spazio. Ai meccanismi precedentemente descritti quali determinanti della resistenza alla terapia si devono aggiungere alcune precisazioni.

La mancata efficacia del farmaco può risultare da una non corretta identificazione del bersaglio molecolare o da una inappropriata strategia di inibizione del bersaglio stesso. È evidente, inoltre, che il blocco di una sola via di segnale è insufficiente per inibire la proliferazione cellulare che risulta, invece, dalla attivazione integrata a diversi livelli di numerose ma definite cascate di segnale [34]. Su questa base si è passati dal disegno di farmaci altamente selettivi (*e.g.* Gefitinib su EGFR mutati) allo sviluppo di inibitori selettivi per le tirosin-chinasi ma meno specifici (*e.g.* Dasatinib, Lapatinb), in modo da colpire con un solo farmaco più bersagli e/o all'utilizzo integrato di più farmaci (inibitori delle tirosin-chinasi e dell'angiogenesi). La cellula neoplastica, inoltre, può mettere in atto strategie che rendono la propria replicazione indipendente dal segnale bloccato dal farmaco attraverso eventi mutazionali (alterazioni di nucleotidi che portano alla traduzione di proteine a struttura stericamente differente in cui il sito bersagliato del farmaco è inattivo o inaccessibile) o biochimici (attivazione di sistemi efflusso del farmaco o di inattivazione enzimatica del farmaco) - meccanismo di resistenza intrinseca o primaria -. Molto spesso, inoltre, si assiste ad una iniziale e parziale risposta al trattamento, seguita da una ripresa della malattia che diventa insensibile al farmaco precedentemente attivo (resistenza acquisita o secondaria). Se da un lato è documentabile che il genoma delle cellule tumorali è soggetto a mutazioni il cui accumulo può rendere inefficace un trattamento che precedentemente lo era stato, nella valutazione della risposta, o mancata risposta, ad un trattamento appare importante sottolineare che:

1. parte della massa neoplastica è costituita da tessuto di supporto che, pur avendo un ruolo importante nella progressione della malattia, può non presentare le alterazioni geniche delle cellule cancerose risultando, pertanto, non sensibile alle terapie target utilizzate e, inoltre, può essere responsabile di ridurre l'afflusso al tumore del farmaco in concentrazione terapeutiche [35]. Questa considerazione giustifica l'associazione di farmaci che bersagliano lo stroma tumorale (antiangiogenetici, inibitori di fattori di crescita) [36].
2. Le cellule staminali neoplastiche da cui si genera il clone neoplastico presentano caratteristiche che fisicamente (la *niche* è spesso scarsamente raggiunta da concentrazioni terapeutiche del farmaco) e biochimicamente (il sistema di MDR è costitutivamente attivo) le rendono scarsamente sensibili ai farmaci [37]. Inoltre queste cellule, verosimilmente, non presentano attivazione aberrante delle cascate di segnale di proliferazione (anche se non sono molti i dati relativi al sequenziamento genico del loro DNA) per cui, a priori, risulta privo di efficacia ogni trattamento che prevede una inibizione specifica di un qualsiasi segnale iperattivo (per mutazione o iperespressione genica). Molta parte degli studi scientifici è attualmente orientata a migliorare la caratterizzazione molecolare di queste cellule, anche per le potenziali conseguenze in ambito farmacologico o, meglio, farmaco genomico.

I farmaci di nuova generazione non presentano effetti tossici di particolare gravità, soprattutto se confrontati con i farmaci convenzionali. I farmaci chemioterapici convenzionali hanno una azione prevalentemente citotossica che risulta in una inibizione della crescita cellulare; la sostanziale non selettività di azione è correlata all'elevato grado di tossicità che presentano. Il meccanismo di azione particolarmente selettivo dei farmaci *targets* non richiede dosi terapeutiche elevate e, non avendo essi effetto su cellule genotipicamente normali, il loro profilo di tossicità è decisamente meno significativo. Le tossicità riportate per questi farmaci riguardano prevalentemente astenia e *fatigue*, disturbi gastrointestinali e *rash* cutanei (definite dai CTCs) che sono, però, responsabili della sospensione del trattamento (CTC grado 3-4) in una ridotta percentuale di casi. Ne consegue che un incremento della dose a livelli di tossicità non è generalmente necessaria e che la correlazione dose/tossicità è un parametro scarsamente significativo, probabilmente inappropriato per valutare l'efficacia di questo tipo di terapia. L'azione antineoplastica di questi farmaci è fondamentalmente citostatica: ne deriva che i regimi di trattamento sono caratterizzati da tempi lunghi e dosaggi bassi e che la variazione della dimensione del tumore deve essere presa in considerazione solo parallelamente alla individuazione di altri parametri.

Si parla di dose biologicamente attiva per identificare quel dosaggio del farmaco in grado di produrre il massimo effetto di inibizione sul *pathway* di segnale che ne costituisce il bersaglio [38].

Nel processo di sviluppo di un farmaco *target* il primo passo è costituito dalla corretta identificazione del bersaglio molecolare, la cui attivazione ha un ruolo critico nella patogenesi del tumore. A questo punto vengono utilizzati approcci di genetica, citogenetica e proteomica per caratterizzare, in fase pre-clinica, il bersaglio molecolare e disegnare un farmaco appropriato. La traslazione in clinica presenta in genere diversi problemi legati all'arruolamento dei pazienti il cui tumore presenti le caratteristiche biomolecolari coerenti con quelle note per essere soggette all'effetto del farmaco (selezione accurata dei pazienti attraverso analisi genetiche e citogenetiche altamente specifiche); un ulteriore problema è legato alla possibilità di quantificare l'inibizione ottimale nel tessuto tumorale: proprio in considerazione del meccanismo di azione di questi farmaci i criteri RECIST [39] di valutazione macroscopica della risposta al trattamento risultano insufficienti. Sulla base della difficoltà di questi procedimenti, necessari per definire l'efficacia di un farmaco, si è cercato di identificare parametri biomolecolari (*markers*) utilizzabili per monitorare l'andamento clinico.

In generale si definisce *endpoint* surrogato di un trattamento clinico qualsiasi *test* di laboratorio o segno obiettivo clinicamente utilizzabile come parametro significativo, in grado di quantificare lo stato clinico del paziente e la sopravvivenza; variazioni dell'*endpoint* surrogato devono rispecchiare variazioni significative dell'andamento clinico [40]. Gli *endpoints* surrogati possono essere utilizzati per supportare una approvazione accelerata di un farmaco se il surrogato è ragionevolmente correlato e predittivo dell'*endpoint* clinico di interesse. Il corretto utilizzo di questo tipo di approccio assume, a priori, una corretta relazione tra risposta clinica/parametro surrogato che presuppone una corretta conoscenza dei *pathways* di traduzione del segnale nella cellula neoplastica - ad esempio, la quantificazione della fosforilizzazione delle proteine a valle della cascata di attivazione di EGFR può rappresentare un *endpoint* surrogato per la determinazione della attività del farmaco inibitore del recettore migliore rispetto alla segnalazione degli eventuali effetti collaterali. Un ulteriore parametro, utilizzato per la valutazione dell'efficacia di questi farmaci, è il cosiddetto tessuto surrogato (*surrogate tissue*) che indica la necessità di ottenere campioni di tessuto adeguato per valutare l'azione inibitoria [41]. Per esempio studi di farmacodinamica di inibitori di EGFR in campioni di cute avevano dimostrato una significativa inibizione del segnale di crescita cellulare; gli stessi studi in tessuti neoplastici hanno mostrato risultati meno entusiastici, seppur significativi e tali da giustificare la loro introduzione nei regimi terapeutici [42].

Razionale dell'utilizzo degli inibitori della tirosin-chinasi egfr nella terapia antineoplastica

Il processo di fosforilazione delle proteine è una reazione biochimica molto ben caratterizzata, alla base della regolazione reversibile della attività delle proteine. Le protein-chinasi e le protein-fosfatasi costituiscono gli attori principali di queste reazioni e il loro ruolo è, pertanto, fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi della cellula; viceversa una attività aberrante di questi enzimi è spesso alla base di diverse patologie, ed in primo luogo le neoplasie. Nel corso della reazione di fosforilazione un gruppo fosfato viene aggiunto attraverso un legame fosfo-diestere alla terminazione idrossilica di un residuo di un dato aminoacido, prevalentemente serina, treonina o tiroxina. (Figura 13). Il gruppo fosfato è portatore di una carica negativa e il suo attacco ad un residuo aminoacidico può determinare modificazioni conformazionali della proteina. La reazione di fosforilazione presenta alcune peculiarità: è rapida (alcuni secondi), reversibile e non richiede la sintesi o la degradazione di ulteriori proteine. La superfamiglia delle chinasi agisce trasferendo un gruppo fosfato da una molecola di ATP ad uno specifico sito bersaglio su un residuo aminoacidico; le fosfatasi, al contrario, rimuovono tale gruppo dal substrato. Attraverso le reazioni di fosforilazione le cellule regolano diverse funzioni, quali la proliferazione, la differenziazione, l'adesione, il metabolismo e l'apoptosi, e su questa base non sorprende il fatto che una attivazione aberrante di queste reazioni correli con lo sviluppo di patologie come il cancro [43].

La disregolazione delle tirosin-chinasi è responsabile, nel cancro, della inibizione della apoptosi, della proliferazione cellulare, del processo di metastatizzazione e di neoangiogenesi. La prima tirosin-chinasi venne identificata alla fine del 1970, solo successivamente, nel 1988, fu purificata la prima fosfatasi. Le chinasi rappresentano circa il 2-2.5% dei geni negli organismi eucarioti: esse sono generalmente caratterizzate dalla presenza di un dominio catalitico altamente conservato; chinasi atipiche presentano il dominio catalitico similmente alle chinasi classiche ma mostrano differenze in alcune sequenze nucleotidiche [44].

Nell'uomo sono state descritte finora 478 chinasi classiche e 40 atipiche per un totale di 518 chinasi. Il dominio catalitico delle chinasi è tipicamente costituito da una struttura bilobare al cui centro si trova il sito attivo: differenze strutturali a tale livello sono responsabili della selettività di azione dei diversi enzimi. Sulla base del residuo aminoacidico coinvolto nella reazione di fosforilazione, si distinguono 4 famiglie: le tirosin-chinasi (TKs), le chinasi simili alle tirosin-chinasi, le serin-treonin-chinasi (STKs) e le chinasi lipidiche. Tutte le chinasi mostrano la stessa capacità nel trasferire il gruppo fosfato  $\gamma$  dall'ATP al substrato. Le serin-treonin-chinasi costituiscono la maggior parte delle chinasi (circa 400 membri) mentre le tirosin-chinasi contano circa 90 membri. Nonostante il loro numero sia relativamente minore, le tirosin-chinasi sono enzimi chiave nei meccanismi di traduzione del segnale a livello cellulare [45].

I recettori delle tirosin-chinasi possono essere divise in:

- recettori tirosin-chinasi (*Receptor Protein* - TK): proteine recettoriali transmembrana caratterizzate essenzialmente da un dominio extracellulare che presenta il sito di legame per il ligando e un dominio chinasico intracellulare;
- proteine non recettori tirosin-chinasi (*Non Receptor Protein* -TK): proteine citoplasmatiche generalmente coinvolte nella trasduzione del segnale a livello intracellulare.

Come detto precedentemente la reazione di fosforilazione è dinamica e reversibile in quanto l'attività delle chinasi è bilanciata da quella delle fosfatasi che catalizzano la reazione di defosforilazione. Alla superfamiglia delle fosfatasi appartengono le serin-treonin fosfatasi (STPs) che idrolizzano specifici legami fosfodiesteri serina/treonina e le tirosin fosfatasi (TPs) con attività specifica per i residui fosfotirosinici; esistono, inoltre, fosfatasi con azione meno selettiva (*dual phosphatases*) che possono agire sia sui residui fosfotirosinici che su quelli fosfoserin-treoninici. Peraltro, come per le chinasi, esistono due classi:

- fosfatasi recettoriali (RP-TPs) in posizione transmembrana che sembrano coinvolti anche in alcuni processi di interazione intercellulare;

- le fosfatasi intracellulari (NRP-TPs) il cui ruolo consiste, verosimilmente, nella modulazione della trasmissione del segnale attivato dalle chinasi.

Il sequenziamento del genoma delle chinasi (cinoma), delle fosfatasi (fosfatoma) e la successiva analisi mutazionale hanno consentito di iniziare a caratterizzare il ruolo di questi enzimi nel processo di oncogenesi [46]. I geni attivi nel processo di tumorigenesi possono essere grossolanamente suddivisi in due categorie sulla base del loro meccanismo di azione:

1. quando una mutazione risulta in un aumento della funzione della proteina, ci si riferisce al gene corrispondente definendolo oncogene; in questo caso la mutazione su un singolo allele è sufficiente per determinare il fenotipo maligno (attivazione del gene).
2. Quando la mutazione determina, invece, una perdita della funzione della proteina, il gene corrispondente è definito oncosoppressore; in questo caso è necessario per la determinazione del fenotipo canceroso (inattivazione del gene) che la mutazione sia presente su entrambi gli alleli.

L'analisi mutazionale delle chinasi e delle fosfatasi ha posto in evidenza alcune differenze qualitative e ha consentito di definire che:

- i geni codificanti per le chinasi presentano generalmente mutazioni in eterozigoti; ciò significa che queste mutazioni sono attivanti e vengono tradotte in un aumento della attività catalitica (fosforilazione) della proteina. Questi geni se mutati agiscono evidentemente come oncogeni.
- i geni che codificano per le fosfatasi sono frequentemente alterati da mutazioni dissenso presenti su entrambi gli alleli; questo dato permette di ipotizzare che tali geni mutati agiscano come oncosoppressori.

Sulla base di queste osservazioni le tirosin-chinasi sono diventate oggetto di studio in ambito farmacologico per il disegno di molecole in grado di inibire l'attivazione aberrante che si verifica nel cancro. L'industria farmaceutica ha prodotto diverse molecole in grado di bloccare in modo selettivo l'attività catalitica di questi enzimi: appare in modo sempre più evidente come anche la risposta agli inibitori delle chinasi abbia una base genetica e che le alterazioni genetiche presenti nel tumore possono essere sfruttate per identificare i pazienti sensibili al trattamento. È attualmente accettato che le alterazioni genetiche presenti nelle chinasi vengono selezionate nel corso del processo di tumorigenesi e che pertanto rappresentano un *target* legittimo della terapia antineoplastica. Le chinasi deregolate possono essere inibite a diversi livelli (Figura 14):

- il dominio extracellulare può essere bloccato con anticorpi monoclonali (mAbs) che, una volta legati, inibiscono l'attivazione del recettore; ligandi monometrici che interferiscono con la dimerizzazione del recettore; porzioni solubili del recettore in grado di sequestrare i ligandi;
- il dominio catalitico è inattivato da piccole molecole che interferiscono con il sito di legame dell'ATP o con il sito di fosforilazione del substrato.

Molti dati, soprattutto, in ambito ematologico, hanno confermato questo paradigma: il primo esempio di successo con gli inibitori delle tirosin-chinasi si è avuto con l'utilizzo dell'Imatinib mesilato (Gleevec<sup>TM</sup>) nel trattamento della leucemia mieloide cronica. Si tratta di un piccolo composto chimico che è in grado di inibire a concentrazioni micromolari, l'attività aberrante (determinata dalla traslocazione 9\22) della chinasi ABL competendo con l'ATP per il suo sito di legame: in tal modo le cellule leucemiche portatrici della traslocazione *Bcr-ABL* vengono indotte alla apoptosi [47-48]. Un altro esempio a supporto di questa strategia di *targeting* molecolare coinvolge il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) che risulta frequentemente iperespresso (per mutazioni attivanti e/o

per amplificazione genica) in numerosi tumori solidi umani, tra cui quelli del tratto gastroenterico e il tumore del polmone non-a-piccole cellule (NSCLC).

Gli inibitori dell'EGFR attualmente in commercio agiscono attraverso due diversi approcci [49]:

- il blocco a livello extracellulare del sito di legame per il ligando sui recettori ErbB1 (Cetuximab, Panitumumab) e ErbB2 (Trastuzumab);
- l'utilizzo di piccole molecole di sintesi che competono per il sito di legame dell'ATP (Gefitinib, Erlotinib).

La risposta al trattamento con anticorpi monoclonali è associata al numero di copie del gene (amplificazione genica); la sensibilità al trattamento con Gefitinib è correlata invece, alla presenza di mutazioni nel dominio catalitico che determinano modificazioni conformazionali della proteina che diventa più sensibile al farmaco e non lega l'ATP.

### Oncogenic addiction: il tallone d'achille del cancro

Dalla scoperta degli oncogeni, avvenuta circa 20 anni or sono, ad oggi sono stati identificati circa 100 oncogeni e almeno 15 geni oncosoppressori. Si deve inoltre sottolineare che, nonostante essi siano in grado di determinare il destino di una cellula, il loro ruolo spesso dipende dal tipo di cellula in cui sono espressi: così la maggiore espressione di un oncogene può indurre la crescita in un dato tipo di cellula e inibirlo o indurre l'apoptosi in un altro. Su questa base, molta parte della ricerca scientifica è stata indirizzata a valutare quanto l'attivazione di un oncogene, cruciale per lo sviluppo iniziale di un dato tumore, sia importante per il mantenimento del fenotipo maligno del tumore stesso.

Il termine *oncogenic addiction* è stato coniato da Weinstein nel 2000 per descrivere il fenomeno per cui una cellula tumorale, nonostante le molteplici alterazioni a livello genetico, diventi, per la propria sopravvivenza e proliferazione, completamente dipendente da un solo *pathway* derivato dalla attivazione di un determinato oncogene [50]. Iniziali studi in ambito ematologico hanno consentito di definire che le cellule cancerose sono spesso dipendenti (*addicted to*) dalla costitutiva attivazione o sovraespressione di un oncogene per il mantenimento del loro fenotipo (Figura 15): è stato dimostrato che topi transgenici caratterizzati da una sovraespressione dell'oncogene *myc* nelle cellule del sistema ematopoietico sviluppavano, come atteso, neoplasie ematologiche ed in particolare leucemie acute mieloidi; quando però il gene veniva silenziato, le cellule leucemiche mostravano un arresto della proliferazione ed attivavano, invece, il programma di apoptosi.

Dati simili sono stati ottenuti silenziando l'espressione di *Bcr-Abl* in topi leucemici che sopravvivevano dopo la procedura. Questi riscontri sono stati alla base dello sviluppo di trial clinici basati sull'utilizzo di Imatinib in pazienti affetti da leucemia mieloide cronica. Dati più recenti supportano l'evidenza che lo stesso meccanismo sia frequentemente coinvolto nella progressione di molti tumori solidi umani.

Per quanto riguarda il NSCLC, molti dati *in vitro* hanno dimostrato come mutazioni di EGFR promuovono meccanismi di proliferazione aberrante (mediati da altri trasduttori di segnale) così che il tumore stesso diventa dipendente da EGFR, mutato per la sua sopravvivenza. È stato dimostrato, infatti, che bersagliare EGFR con inibitori chinatici, anticorpi monoclonali e con tecniche di interferenza dell'espressione di RNA (miRNA o siRNA) esita in una cessazione del segnale di proliferazione da cui la cellula tumorale dipende, portando, in ultimo, alla estinzione del clone neoplastico [51]. Le cellule normali e le cellule neoplastiche (che probabilmente dipendono per la loro proliferazione da segnali tradotti da altri mediatori), non dipendenti da EGFR, non risultano colpite. I meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno non sono stati chiariti del tutto: sono stati proposti dei modelli che evidenziano come nelle cellule neoplastiche si crei uno sbilanciamento, tra segnali pro-apoptosici e proliferativi, definito *shock* oncogenico (Figura 16) che può spiegare i fenomeni apoptosici che seguono l'inattivazione acuta di un oncogene cruciale per la sopravvivenza del tumore stesso.

Dopo l'inibizione acuta di un oncogene cruciale, attraverso l'utilizzo di un farmaco, i segnali di proliferazione vengono rapidamente dissipati e prevalgono quelli di apoptosi. Durante questa finestra di vulnerabilità e sensibilità alla terapia i segnali di apoptosi inducono la morte cellulare. Un possibile meccanismo di resistenza alla terapia è dovuto allo sviluppo di meccanismi di adattamento e di superamento dello *shock* oncogenico.

Secondo questo modello l'attivazione di un oncogene, che ha azione cruciale per la sopravvivenza del clone tumorale, dà luogo a segnali che inducono sia l'apoptosi sia la proliferazione: quando l'oncogene è attivo i segnali di proliferazione prevalgono sugli altri, conducendo alla progressione della malattia. Se interviene una inattivazione improvvisa e acuta dell'oncogene (terapia con inibitori di EGFR) si assiste in primo luogo ad un decadimento dei segnali di proliferazione seguito da un più durevole incremento dei segnali che inducono il programma di apoptosi; questo definisce un periodo finestra che risulta importante per il successo terapeutico. Il decadimento del segnale di proliferazione porta le cellule neoplastiche (*committed*) alla attuazione inevitabile del processo di apoptosi che prosegue anche se il segnale proliferativo viene successivamente ripristinato. D'altro canto la risposta apoptotica non viene attuata se l'inattivazione dell'oncogene cruciale avviene in un lungo periodo di tempo anziché in maniera acuta. Un possibile meccanismo per cui le cellule neoplastiche diventano resistenti alla terapia con inibitori di EGFR presuppone che le cellule si adattino allo shock oncogenico e selezionino altri meccanismi di proliferazione. L'applicazione clinica di questo modello pone alcuni dubbi sull'utilizzo contemporaneo di farmaci antineoplastici convenzionali e inibitori delle tirosin-chinasi: infatti gli effetti dei farmaci classici sulla replicazione del DNA potrebbero in qualche modo attenuare lo *shock* acuto indotto dal solo utilizzo degli inibitori molecolari; inoltre l'effetto delle piccole molecole ad azione inibitoria risulterebbe essere maggiore rispetto a quello degli anticorpi monoclonali diretti contro EGFR, i quali presuppongono un tempo di azione maggiore e una più graduale attenuazione del segnale [52].

#### Determinanti genetici della sensibilità agli inibitori di EGFR nel NSCLC

Circa il 62% dei tumori del polmone non a piccole cellule iperesprimono EGFR e questo dato è correlato a bassi tassi di sopravvivenza. Molto frequentemente l'overespressione è conseguente ad una amplificazione del *locus* 7p12 (dove è localizzato EGFR); inoltre sono stati dimostrati circuiti di autoattivazione che portano ad una maggior attività del recettore. Il blocco di questo circuito di autoattivazione costituisce il razionale dell'utilizzo di anticorpi anti EGFR nella terapia del NSCLC. Inoltre sono state identificate mutazioni del dominio chinasi del recettore (esoni 18-21) che inducono cambiamenti nella conformazione terziaria della proteina codificata a livello del sito di legame dell'ATP. Queste mutazioni sono presenti in circa il 10% dei NSCLC nei Paesi Occidentali e in circa il 30-50% nei paesi dell'Estremo Oriente e si associano per il 50% ad adenocarcinomi - variante bronchiolo-alveolare - che insorgono in pazienti di sesso femminile, non fumatrici. La ridotta affinità del recettore mutato per l'ATP ne incrementa la sensibilità ai farmaci inibitori che competono con l'ATP per il legame al sito catalitico.

- Mutazioni somatiche sensibilizzanti alla terapia con Erlotinib e Gefitinib

L'analisi mutazionale di EGFR (Figura 17) in NSCLC ha individuato, in genere, mutazioni attivanti che inducono un'incrementata attività di traduzione del segnale, anche se ciò non implica direttamente l'attivazione costitutiva del recettore; il recettore può divenire costitutivamente attivo in maniera ligando-indipendente attraverso l'acquisizione, nel DNA delle cellule neoplastiche, di una seconda mutazione. L'incidenza di mutazioni in NSCLC che rispondono alla terapia con Erlotinib e Gefitinib è di circa il 77%, mentre nei tumori non responsivi l'incidenza di mutazioni è di circa il 7%. Gli esoni 18 e 21 del gene

EGFR codificano per il dominio chinasi del recettore e sono la sede delle più importanti mutazioni identificate: circa il 45% delle mutazioni di EGFR nel NSCLC sono costituite da delezioni *in frame* dell'esone 19; un'altra frequente mutazione riguarda la sostituzione L858R nell'esone 21; peraltro le delezioni dell'esone 19 si associano ad una migliore risposta alla terapia con inibitori di TK rispetto alle mutazioni dell'esone 21. Sostituzioni nucleotidiche nell'esone 18 sono descritte in circa un 5% di casi, così come inserzioni a livello dell'esone 20 [53].

La presenza di una di queste mutazioni determina una modificazione conformazionale della molecola del recettore a livello del sito di legame dell'ATP e non ha sostanziali effetti sulla stabilità della proteina; conseguentemente al riposizionamento di questi residui critici si assiste ad una stabilizzazione della interazione tra ATP e inibitore che porta da un lato ad un incremento del segnale di traduzione in risposta ad EGF e dall'altro ad una maggiore sensibilizzazione all'azione del farmaco. L'analisi mutazionale di EGFR nel NSCLC ha permesso di spiegare la mancata efficacia del Gefitinib nei gliomi, neoplasie in cui è molto frequente l'iperespressione di EGFR, ma dove questa è dovuta prevalentemente ad amplificazione genica e a riarrangiamenti che coinvolgono il dominio extracellulare e non alterano, invece, il sito di legame dell'ATP.

- Meccanismi di resistenza primaria

Studi *in vitro* hanno messo in evidenza che mutazioni attivanti EGFR, con effetto di sensibilizzazione alla terapia, promuovono la crescita cellulare mediata dallo stesso EGFR attraverso i *pathways* di segnale di RAS-RAF-MEK così che le cellule neoplastiche diventano dipendenti da questa via di segnale per la loro sopravvivenza. Circa il 15-30% di NSCLC presenta mutazioni nel codone 12 del gene KRAS. Si può genericamente ipotizzare che le mutazioni di RAS e di EGFR siano mutualmente esclusive nel NSCLC e definiscano *subsets* distinti di tumori in cui le mutazioni di EGFR appaiono più frequenti nei soggetti non fumatori, mentre le mutazioni di KRAS si associano prevalentemente a tumori insorti in soggetti fumatori. L'insorgenza di mutazioni in KRAS è stata proposta come meccanismo di resistenza alla terapia con inibitori delle TK in NSCLC portatori di EGFR *wild type* [54].

Inoltre cellule tumorali, sensibili alla terapia con Gefitinib, sono caratterizzate da un rapido decremento della attività di AKT immediatamente successivo all'inizio del trattamento: la mancata inattivazione di AKT configura insensibilità alla terapia. L'attivazione di AKT è indirettamente regolata dalla fosfatasi PTEN, che è di frequente inattivata in diversi tumori umani. Alterazioni genetiche di PTEN sono presenti in meno del 10% di NSCLC; tuttavia l'assenza di espressione di PTEN è evidente in almeno il 70% di NSCLC ed è verosimilmente conseguente ad alterazioni epigenetiche, quali ad esempio l'ipermetilazione del promotore di PTEN. In alcune linee cellulari di NSCLC il ripristino della attività di PTEN correla con la ripresa della sensibilità alla terapia con inibitori di EGFR, suggerendo che PTEN possa modulare *in vivo* la sensibilità al trattamento [55].

- Meccanismi di resistenza acquisita

In caso di risposta alla terapia con Erlotinib e Gefitinib, la persistenza di tale risposta prima della acquisizione di resistenza è generalmente breve, circa 6-12 mesi (solo occasionalmente sono state descritte risposte persistenti per più di 3 anni): in questi casi la presenza di amplificazione genica e di elevati livelli di aneuploidia (documentabili con FISH) sembrano essere predittivi di stabilizzazione di malattia dopo il trattamento [56].

Diversi studi hanno permesso di identificare mutazioni di EGFR che si associano a ripresa della malattia dopo terapia: la mutazione clinicamente più rilevante è quella che codifica per la sostituzione aminoacidica T790M; essa è situata a livello dell'esone 20 e viene identificata, in circa il 50% dei casi, come secondo sito di mutazione associato alla acquisizione di resistenza alla terapia con Erlotinib e Gefitinib [57-58]. Recentemente è stata identificata un'altra mutazione che codifica per la sostituzione aminoacidica D761Y, associata alla insorgenza di resistenza alla terapia con inibitori TK in NSCLC portatori della mutazione correlata alla sostituzione L858R [59]. Molti studi hanno dimostrato che la sostituzione T790M è presente nelle cellule neoplastiche prima dell'inizio del trattamento: ciò sembra suggerire che questa mutazione costituisce una sorta di vantaggio selettivo per le cellule portatrici una volta esposte al trattamento.

- Strategie terapeutiche alternative e terapie di combinazione

Lo sviluppo di resistenze alla terapia con inibitori delle TK determina il continuo sviluppo di strategie alternative di bersaglio di EGFR: uno dei modelli principali si basa sul disegno di inibitori in grado di by-passare l'interferenza sterica al legame del farmaco determinata dalla sostituzione T790M. A tale riguardo sembrano promettenti gli inibitori irreversibili ovvero piccole molecole che formano legami covalenti con residui cisteinici cruciali nel sito attivo dell'enzima.

Un'ulteriore strategia contro la resistenza acquisita, derivante da T790M, si basa sull'osservazione che vari mutanti EGFR spesso sono associati a particolari proteine, le *Heat Shock Protein 90* (HSP90). Questa interazione è inibita in maniera altamente specifica da alcuni farmaci, quali ad esempio la Geldanamicina, con conseguente distruzione dei cloni mutanti resistenti agli inibitori di EGFR che vengono indotti alla apoptosi [60].

Studi molto recenti hanno dimostrato che l'amplificazione dell'oncogene MET (recettore di HGF) si associa a resistenza alla terapia con Gefitinib ed Erlotinib sia in linee cellulari di NSCLC sia in campioni biotici di NSCLC divenuti resistenti alla terapia: ciò è verosimilmente dovuto alla attivazione da parte di MET del *pathway* di segnale Erbb3/PI3K [61]. Questi dati costituiscono un primo esempio di resistenza acquisita attraverso un meccanismo, l'amplificazione genica di una chinasi, che non è direttamente coinvolta nel *pathway* di segnale di EGFR. La terapia di combinazione con inibitori di MET potrebbe essere presa in considerazione, in associazione agli inibitori di EGFR, per i pazienti divenuti resistenti alla terapia con Gefitinib ed Erlotinib [62-63].

Il *pathway* di traduzione del segnale di EGFR interviene nella regolazione di due attività fondamentali della cellula:

1. la sopravvivenza (segnale mediato da PI3K-mTor, Akt e da JAK-STAT);
2. la proliferazione (segnale mediato da RAS-BRAF, ERK).

Questa considerazione è alla base del tentativo di associare, nello schema terapeutico, farmaci attivi sui diversi livelli del segnale cellulare. Studi pre-clinici e clinici con inibitori di PI3K, in linee cellulari NSCLC, hanno evidenziato un possibile incremento della sensibilità al trattamento con Gefitinib. Gli inibitori di mTOR (a valle di PI3K) - Rapamicina e analoghi - hanno mostrato una attività sinergica quando associati agli inibitori di EGFR in vitro e, attualmente, sono in corso i primi studi di fase I sulla combinazione tra Gefitinib - Erlotinib e Sirolimus - Everolimus. Nonostante i risultati pre-clinici, la monoterapia con inibitori di mTOR non ha mostrato vantaggi significativi in trias clinici: è

possibile che l'inibizione di mTOR porti alla attivazione di PI3K e alla attivazione - per feedback positivo - del segnale di sopravvivenza mediato da AKT [64-65].

Per quanto riguarda l'inibizione del *pathway* mediato da RAS, nonostante le mutazioni di RAS non sembrano coesistere con quelle di EGFR, l'inibizione di RAS-BRAF in associazione a EGFR potrebbe mostrare effetti additivi. Attualmente sono in corso studi di fase II che valutano l'utilizzo dell'inibitore di MEK, PD-3225901, per NSCLC in stadio avanzato. Tuttavia, l'attivazione del *pathway* di segnale RAS-MAPK non è correlata in modo così diretto alla risposta agli inibitori di EGFR come la via di segnale mediata da PI3K-AKT [66-67].

Ulteriori approcci terapeutici prevedono come *target* più bersagli molecolari contemporaneamente e, quelli che hanno mostrato i risultati più promettenti, prevedono di colpire non solo il tumore ma anche la componente stromale. La componente vascolare è, sotto questo profilo, particolarmente rilevante e ciò ha condotto allo sviluppo di inibitori in grado di bloccare EGFR, Erbb2 e il recettore di VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), FLT1 (*fms-like TK1*) e KDR (*Kinase Domain Region*); di conseguenza hanno mostrato risultati incoraggianti i primi studi pre-clinici che utilizzano l'inibitore di EGFR e VEGFR in linee cellulari resistenti al solo Gefitinib [68-70].

In conclusione, l'esperienza del trattamento con gli inibitori delle TK in oncologia ha dimostrato che:

- i recettori delle TK costituiscono un buon *target* terapeutico nei tumori di origine epiteliale;
- questo tipo di terapia è efficace in piccoli subset di pazienti e che l'analisi mutazionale dei recettori può essere utilizzata per l'identificazione dei pazienti suscettibili;
- la resistenza acquisita alla terapia limita in modo importante l'utilizzo di questi farmaci e che, perciò, lo sviluppo di strategie in grado di controllare i meccanismi che portano a tale resistenza costituiscono uno dei maggiori determinanti della ricerca in farmacogenomica.

## Scopo dello studio

L'applicazione di quanto finora descritto per il trattamento delle neoplasie toraciche, in particolare del NSCLC, si traduce nell'individuare, per ciascun caso diagnosticato, le vie di segnale molecolare attivate nel processo di oncogenesi polmonare. Lesioni molecolari in oncogeni e geni oncosoppressori sono da un lato responsabili del processo di tumori genesi ma dall'altro possono essere considerate potenziali bersagli terapeutici. La caratterizzazione del profilo individuale di attivazione oncogenica affiancata alle metodiche diagnostiche convenzionali anatomopatologiche e di *imaging* consente sia un più appropriato inquadramento della patologia neoplastica sia di poter attuare un blocco farmacologico realmente *targeted*, ovvero selettivo verso le cellule cancerose (Figura 18).

Questo studio quindi ha come obiettivi i seguenti punti:

1. si propone di adattare tecniche biomolecolari già validate ampiamente su pezzi operatori a campioni tumorali ottenuti da ago aspirato trans-toracico il quale, per contro, rappresenta il materiale cito-istologico su cui più frequentemente viene posta diagnosi di NSCLC. Solo recentemente queste tecniche sono state applicate alla analisi farmacogenomica di casi di NSCLC: si tratta però, a conferma delle difficoltà di processazione dei campioni, di studi condotti su casistiche numericamente limitate (Bozzetti, 2008) o derivanti dalla revisione di preparati cito-istologici di archivio (Ceppi, 2006).
2. Sono stati selezionati EGFR e KRAS come geni critici del NSCLC in quanto, come detto in precedenza, questi oncogeni sono attivati nel NSCLC prevalentemente a causa di mu-

tazioni somatiche che peraltro avvengono con mutua esclusione. La terapia anti-EGFR con piccole molecole è attualmente approvata come seconda linea in casi di NSCLC avanzato/metastatico non selezionati per la presenza di mutazioni. Diversi studi *in vitro* e *in vivo* hanno però dimostrato che solo i recettori mutati sono effettivamente sensibili al trattamento con inibitori di EGFR. L'attivazione di KRAS è inoltre correlata con la resistenza al trattamento, anche in presenza di mutazioni di EGFR: tale correlazione appare coerente con il fatto che KRAS mutato attiva comunque la via di segnale proliferativo essendo a valle del recettore EGFR, bersaglio della terapia. (Figura 19).

Risulta inoltre evidente che lo *screening* dei casi sulla base del dato anamnestico di abitudine al fumo di tabacco è rilevante per una corretta selezione dei pazienti per la diagnosi molecolare: pertanto le mutazioni di EGFR andranno ricercate in tutte le lesioni insorte in pazienti non fumatori, riservando invece l'analisi mutazionale a casi selezionati (e.g. adenocarcinoma) di cancro fumo-indotto.

3. Infine, si propone di valutare nella casistica analizzata il valore prognostico e predittivo dei marcatori genetici in studio, cioè di valutare il ruolo della interazione farmacogenotipo sull'andamento della patologia. In altre parole ci si propone di verificare se la selezione del trattamento basata sulla diagnosi molecolare comporti un effettivo miglioramento dell'*outcome* clinico dei pazienti. Marcatori genetici a valore predittivo identificano i pazienti in grado di rispondere ad uno specifico trattamento o, viceversa, di individuare a priori i soggetti resistenti che, se trattati, sarebbero esposti ai soli effetti avversi della terapia stessa. Marcatori genetici a valore prognostico hanno valore predittivo dell'andamento e della progressione della patologia, indipendentemente dal fatto che sia impostata una determinata terapia. (Figura 20).

Non sempre i marcatori genetici predittivi hanno anche valore prognostico. Molti studi sono stati fatti relativamente al ruolo di EGFR e KRAS nel NSCLCs: se il valore predittivo di risposta agli inibitori EGFR è ampiamente confermato, i risultati relativamente al valore prognostico non sono ancora del tutto chiari. Obiettivo di questo studio è, conseguentemente, quello di caratterizzare routinariamente il profilo molecolare di ciascun NSCLC diagnosticato e di seguire nel tempo l'*outcome* clinico dei pazienti, inteso come sopravvivenza (*Overall survival* - OS) e tempo di progressione (*Time To Progression* - TTP). In questa prospettiva verranno anche analizzate le eventuali associazioni significative tra profilo di attivazione oncogenica e risposta ai farmaci chemioterapici convenzionali che, ad oggi, costituiscono l'approccio di I linea al trattamento del NSCLC non aggredibile chirurgicamente.

## Materiali e Metodi

### *Definizione dello studio clinico*

#### Criteria per l'arruolamento dei pazienti

Il disegno dello studio clinico è stato approvato dal Comitato di Bioetica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo. Previa acquisizione del consenso informato sono stati inclusi nello studio i pazienti afferenti alla Clinica delle Malattie dell'Apparato Respiratorio con sospetto clinico-strumentale di NSCLC, da sottoporre ad accertamento citologico o istologico tramite biopsia trans-toracica (Figura 21).

Il tipo di studio non consente di determinare con approccio statistico, a priori, la numerosità del campione: ci si aspetta comunque di riuscire ad arruolare per il Luglio 2011, data di termine del protocollo, un campione pari ad almeno 300 pazienti.

#### Processazione dei campioni biotici tumorali

Una volta ottenuta la conferma anatomopatologica della diagnosi di NSCLC, si è proceduto alla estrazione di DNA dal citoaspirato fresco conservato a 4°C. Nei casi in cui è disponibile materiale ulteriore rispetto a quello utilizzato per la diagnostica anatomopatologica, è prevista la successiva richiesta di tale materiale con lo scopo di confermare i risultati ottenuti. I protocolli utilizzati per l'estrazione del DNA genomico da tessuto fresco e da incluso in paraffina sono descritti in dettaglio nella sezione "Estrazione del DNA genomico tumorale". I campioni di DNA ottenuti sono conservati e archiviati in appositi contenitori posti alla temperatura di -20°C collocati presso il Laboratorio di Biochimica e Genetica della Clinica delle Malattie dell'Apparato Respiratorio.

Il DNA genomico ottenuto è quindi sottoposto a reazione di amplificazione (Polimerase *Chain Reaction*-PCR) per EGFR (esoni 18-21) e K-RAS (esone 2).

Una volta purificati, i prodotti di PCR sono stati sottoposti a reazione di sequenziamento degli esoni precedentemente indicati. Le tracce degli elettroferogrammi così ottenute sono poi analizzate al fine di identificare la presenza di:

1. mutazioni (in eterozigosi e omozigosi) negli esoni 18-21 di EGFR per le quali è stata dimostrata una correlazione con effetto sensibilizzante alla terapia con Erlotinib;
2. mutazioni (più frequente T790M) correlate a resistenza alla terapia stessa;
3. mutazioni nell'esone 2 di K-RAS (frequentemente G12D) correlate in rapporto mutualmente esclusivo a mutazioni di EGFR e indicative di resistenza a terapie con inibitori di EGFR.

#### Conservazione dei campioni

Per tutelare la *privacy*, il nome e cognome di ciascun soggetto arruolato nello studio non compaiono sui campioni genetici relativi: viene pertanto utilizzato un codice casuale (numero-soggetto). Solo i medici e i biologi coinvolti nello studio sono in tal modo in grado di associare il numero-soggetto ai diversi pazienti partecipanti alla ricerca. Questo consente di ridurre il numero di persone che possono accedere alle informazioni personali dei pazienti. Questo sistema prevede comunque la possibilità di poter risalire, da parte del personale coinvolto nella ricerca, all'identità del soggetto e comunicare allo stesso i risultati della ricerca che lo riguardano.

I campioni di DNA genomico tumorale saranno conservati fino al termine dello studio e archiviati presso il Laboratorio di Biochimica e Genetica della Clinica di Malattie dell'Apparato Respiratorio. La conservazione dei campioni sarà affidata al personale del Laboratorio. I campioni eccedenti al termine della ricerca saranno distrutti o, previa informazione e consenso del paziente, resi anonimi e archiviati per un tempo non superiore a 2 anni, presso il Laboratorio di Biochimica e Genetica della Clinica delle Malattie dell'Apparato Respiratorio.

#### **Materiali e metodi**

##### Citoaspirazione ed approccio transtoracico TAC-guidato

Le procedure biotiche sono attuate presso l'Istituto di Radiologia - Ambulatorio di Tomografia Computerizzata della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia.

Per soggetti in trattamento antiaggregante e/o anticoagulante è prevista la sospensione di tale terapia per un periodo antecedente alla biopsia di 36 ore. Il radiologo raccoglie un breve raccordo anamnestico del paziente e lo informa sulla procedura che andrà ad effettuare ottenendo poi il consenso informa-

to alla esecuzione dell'esame. Il paziente è pregato di presentarsi, al momento della biopsia, con una TC diagnostica precedente. Si è stabilito che i criteri di esclusione alla procedura siano:

- la presenza di una lesione di diametro (media delle dimensioni degli assi maggiore e minore) <5 mm;
- alterazioni rilevante del sistema coagulativo;
- pneumonectomia contro laterale;
- impossibilità del paziente a mantenere il decubito clinostatico e/o a eseguire comandi verbali o visivi;
- rifiuto del paziente alla firme del modulo di consenso.

Tutte le biopsie sono state effettuate sotto guida TAC mediante tomografo spirale doppia corona, ed eseguite operativamente dallo stesso radiologo secondo protocollo *standard* (Figura 22).

Parte del materiale ottenuto è strisciato direttamente su vetrino, fissato ed inviato presso l'Istituto di Anatomia Patologica per la conferma diagnostica definitiva. La restante parte del citoaspirato è posta in provette apposite contenenti 200 µL di acqua sterile ed inviato presso il Laboratorio di Biochimica e Genetica della Clinica delle Malattie dell'Apparato Respiratorio dove sarà conservato alla temperatura di 4°C fino alla processazione per l'estrazione del DNA.

#### Estrazione DNA genomico tumorale

In caso di sezioni in paraffina l'estrazione del DNA da tumore è condotta sulla base del seguente protocollo. Le sezioni (in media 3) saranno preparate compatibilmente con la quantità di tessuto disponibile: di queste due verranno deparaffinate e colorate con ematossilina-eosina e sottoposte ad analisi morfologica. Sarà così possibile identificare con maggior sicurezza il tessuto tumorale e tali aree saranno delineate nelle diverse sezioni; si procederà quindi alla estrazione del DNA solo in tali zone, che verranno trattate secondo il seguente protocollo:

- trattamento dell'area di tessuto neoplastico con una soluzione 0.2 M NaOH/1 mM EDTA;
- *scraping* del tessuto così trattato che verrà collocato in una provetta fino ad ottenere un volume di materiale di circa 30/50 µL;
- vortexare per pochi secondi, e quindi incubare a 85°C per 20 min,
- vortexare e successivamente centrifugare per 1 min.
- aggiungere al surnatante una soluzione 40 mM Tris-TE secondo il rapporto 1:4 e proseguire con l'utilizzo del *kit*.

Per l'estrazione di DNA genomico da FNAC è utilizzato il protocollo previsto dal *kit* Invitrogen per l'estrazione da tessuto fresco (Invitrogen Carlsbad, CA).

Il DNA ottenuto è stato quindi purificato come indicato dallo stesso protocollo. Dopo quantificazione allo spettrofotometro, il DNA di ciascun campione tumorale è conservato alla temperatura di -20°C.

#### Reazione di amplificazione e di sequenziamento genico

La reazione di amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata condotta come già descritto in precedenza. I prodotti di PCR sono stati in seguito purificati con biglie magnetiche, secondo il protocollo AMPure (Agencourt Bioscience Corp., Beckman Coulter S.p.A., Milano, Italia, Figura 23).

La tabella 1 mostra le sequenze dei *primers* di amplificazione e *sequencing* utilizzati.

L'analisi dell'elettroferogramma ottenuto è stata effettuata come descritto da Bardelli A et al, 2003 utilizzando il *software* Mutation Surveyor™ (Softgenetics, PA, USA), ponendo come controllo la sequenza *wild type* di ciascun esone depositata in banche dati disponibili online, quali ad esempio *Ensemble Genome Browser* (Figura 24).

### ***Analisi statistica***

Lo studio prevede l'analisi della prevalenza per ciascuna delle lesioni genetiche tumorali sopraindicate (EGFR, KRAS) definita come rapporto tra eventi rilevati (mutazioni) nella popolazione in studio in un dato periodo di tempo (3 anni: durata prevista dello studio) e numero degli individui della popolazione stessa (totalità dei NSCLCs arruolati nello studio) (Figura 25).

Gli intervalli di confidenza della prevalenza di mutazione ottenibili con tale numerosità campionaria sono riassunti nella figura 26.

La prevalenza delle lesioni genetiche è stata calcolata tramite il confronto tra una coorte in studio, per la quale le analisi sono state condotte su campioni di cito-istologico tumorale (FNAC) ottenuto per ciascun paziente e una coorte di riferimento. Questo gruppo di controllo è rappresentato da una coorte omogenea di pazienti affetti da NSCLC e per i quali la diagnosi è stata fatta su campione di tessuto tumorale incluso in paraffina ottenuto da biopsia in broncoscopia (EBB); inoltre, nei casi in cui si è reso possibile, è stata condotta l'analisi molecolare sul DNA estratto dal materiale citoaspirato archiviato dopo l'analisi anatomopatologica convenzionale. Sono perciò state verificate le eventuali differenze nella analisi di prevalenza nelle due coorti.

Si sottolinea che, trattandosi di uno studio preliminare e avendo come riferimento i dati mutazionali su campioni ottenuti da pezzi operatori (non essendo disponibili *databases* relativi a *screening* mutazionali su campioni tumorali di dimensioni minori, quali cito-aspirati), i valori degli intervalli di confidenza ottenibili, anche se relativamente ampi, possono comunque essere considerati sufficientemente affidabili.

L'analisi statica è stata condotta sui 49 campioni finora raccolti.

### ***Endpoints dello studio***

L'*endpoint* principale di questo studio è quello di validare l'analisi molecolare dei geni candidati, EGFR e KRAS, in campioni biotipici citologici di carcinoma broncogeno non a piccole cellule rappresentati da FNAC, attualmente una delle metodiche più utilizzate nella diagnosi di adenocarcinoma polmonare (il sottotipo di NSCLC ad oggi più frequente) (Figura 27). Gli *endpoints* secondari identificati per questo studio sono i seguenti:

- caratterizzazione del profilo di attivazione molecolare di ciascun tumore classificato secondo la diagnostica anatomopatologica come NSCLC;
- studio delle correlazioni tra profilo di attivazione oncogenica e stadio della malattia alla diagnosi;
- validazione delle lesioni genetiche candidate come marcatori a valore prognostico e predittivo;
- correlazione tra *pattern* molecolare e risposta alla terapia standard.

## Risultati

### *Prevalenza delle mutazioni di EGFR e KRAS nella casistica arruolata*

L'analisi di prevalenza delle mutazioni somatiche negli oncogeni EGFR e KRAS è stata condotta sulla casistica di pazienti affetti da NSCLCs arruolati nello studio clinico, iniziato nel Gennaio 2009, presso la Clinica delle Malattie dell'Apparato Respiratorio.

Attualmente sono stati arruolati nello studio 49 pazienti e per 47 di essi il sospetto clinico-strumentale di NSCLC è stato confermato istologicamente; nei rimanenti 2 casi è stata invece posta diagnosi di carcinoma broncogeno a piccole cellule (SCLC). Le caratteristiche dei pazienti arruolati nello studio sono riportate in dettaglio nelle figure 28 e 29.

Dei 47 casi di NSCLC in esame, 23 sono risultati essere adenocarcinomi (48.9%), di cui un solo caso a variante bronchioloalveolare, 14 (29.8%) sono stati identificati come carcinomi epidermoidali e 3 (6.4%) come carcinomi a larghe cellule; nei restanti 7 casi (14.9%) non è stato possibile definire ulteriormente il quadro di carcinoma non-a-piccole cellule.

L'età media dei pazienti arruolati si aggira intorno ai 71 anni; 20 (40.8%) sono femmine e 29 (59.2%) maschi. Il 65% dei soggetti arruolati è, o è stato, fumatore (>15 persone-anno).

L'analisi di sequenziamento genico è stata comunque condotta sia sui 47 campioni di NSCLC sia sui 2 di SCLC. L'analisi di sequenziamento genico per i casi che rientrano a far parte della coorte in studio (Figura 28) è stata svolta, dove era disponibile materiale in quantità sufficiente, su campioni derivati dal FNAC, metodica utilizzata anche per la conferma diagnostica anatomo-patologica, e, dove ce n'è stata la possibilità, su campioni inclusi in paraffina (derivati da EBB) e archiviati. La coorte di riferimento (Figura 29) selezionata, rispetto a quella in studio, è invece rappresentata da un numero paragonabile (23 vs 24) di pazienti affetti da NSCLC la cui diagnosi è stata posta solamente su sezioni in paraffina di tessuto tumorale ottenuto da biopsia endobronchiale.

È stato finora generato un totale di 320 prodotti di PCR per i 4 esoni (18-21) di EGFR e per quello di KRAS (ogni esone consta di circa 300 Kb), i quali sono stati poi processati per il sequenziamento diretto.

### Analisi della prevalenza di EGFR

La prevalenza delle mutazioni di EGFR nella coorte in studio è pari a 12.5% (3 casi su 24 di NSCLC); tale risultato è identico a quello della coorte di riferimento. I valori ottenuti sono coerenti con il valore atteso che - per la popolazione caucasica - è compreso tra il 10 e il 20%.

Sul totale della casistica, in 3 pazienti è stata riscontrata la delezione dell'esone 19 (Figura 30) e in altri 3 casi è stata identificata la sostituzione L858R a carico dell'esone 21; non sono state identificate invece mutazioni a carico degli esoni 18 e 20.

Globalmente la frequenza di mutazioni di EGFR nella casistica di NSCLC analizzata è pari a 12.8% (6 casi su 47 campioni di NSCLC). I soggetti portatori delle mutazioni sono tutti non fumatori; di questi 3 sono di sesso femminile.

I due casi di SCLC analizzati sono risultati *wild type* negli esoni codificanti il dominio tirosin-chinasico del recettore.

### Analisi della prevalenza di KRAS

La prevalenza delle mutazioni somatiche di KRAS - esone 2 - nella coorte in studio è risultata essere pari al 4.2% (1 caso su 24 campioni di NSCLC); nella coorte di riferimento, invece, non si sono trovate attualmente mutazioni. La mutazione riconosciuta, in particolare, determina una sostituzione aminoacidica a livello del codone 13 (Figura 31).

Sul totale della casistica la prevalenza di mutazioni a livello dell'esone 2 di KRAS è risultata essere del 2.2% (1 caso su 45 campioni di NSCLC). Anche in questo caso tutti i valori ottenuti sono coerenti con quelli attesi. Come previsto, peraltro, nessun caso analizzato è portatore di mutazioni in entrambi gli oncogeni (mutua esclusione delle mutazioni).

I risultati ottenuti finora - anche se preliminari - convalidano il metodo di sequenziamento genico su DNA genomico estratto da cellule tumorali fresche come una procedura affidabile e utilizzabile routinariamente. Tali risultati giustificano pertanto la prosecuzione dello studio con l'estensione della casistica arruolata.

### ***Profilo mutazionale individuale: correlazione con l'outcome clinico***

La maggior parte dei pazienti (93.9%) arruolati presentava, al momento della diagnosi, uno stadio di malattia IIIA a causa del quale, comunque, era stata esclusa la possibilità di intervento chirurgico. Solo 3 pazienti presentavano malattia in stadio IIB e, dopo la diagnosi, sono stati sottoposti ad intervento di exeresi del nodulo polmonare; in altri tre casi, in considerazione delle importanti comorbidità in anamnesi, è stata scelta la terapia di supporto (BSC). Tutti i restanti casi sono andati incontro a trattamento chemioterapico con farmaci convenzionalmente utilizzati come approccio di prima linea.

La sopravvivenza globale (OS) media è stata di 16.3 mesi, tale valore è stato calcolato escludendo la sopravvivenza massima pari a 51 mesi e minima pari ad una settimana. Il *Time to Progression* (TTP) medio è pari a 8.5 mesi (dati non mostrati).

I casi mutati per EGFR hanno avuto una sopravvivenza media di 11.5 mesi con un TTP pari a 4.6 mesi; per il paziente portatore della sostituzione G13D a livello dell'esone 2 di KRAS la sopravvivenza è, attualmente, di 6 mesi.

Come evidenziato nelle figure 28 e 29, nessuno dei pazienti portatori delle mutazioni negli esoni del dominio chinasi di EGFR è stato trattato con Erlotinib o Gefitinib in prima linea.

Il disegno dello studio di cui si occupa questo lavoro di tesi esula dalla prospettiva strettamente farmacogenetica, essendo mirato piuttosto alla validazione delle tecniche di sequenziamento su campioni tumorali costituiti da poche cellule; la stessa quantità di materiale neoplastico con cui sempre più frequentemente viene posta diagnosi di NSCLC.

L'applicazione clinica conseguente sarà, evidentemente, il disegno di *trials* clinici che prevederanno la somministrazione di molecole anti-EGFR in prima linea nei pazienti portatori di mutazioni attivanti EGFR.

## **Discussione**

Il carcinoma broncogeno rappresenta la principale causa di morte per tumore solido nel mondo. Nei casi avanzati i trattamenti chemioterapici *standard* non garantiscono una sopravvivenza a 5 anni in più del 15% dei casi; ancora peggiori sono i dati se alla diagnosi il tumore è metastatico. A dispetto degli entusiasmi iniziali, l'introduzione della terapia *targeted* nel trattamento del NSCLC *unselected* non ha portato i benefici attesi. Recentemente due grandi studi clinici hanno infatti dimostrato effetti significativi della terapia anti-EGFR (utilizzata in prima linea) sulla sopravvivenza dei pazienti selezionati in base alla diagnosi molecolare delle lesioni di EGFR. Lo studio FLEX ha dimostrato un incremento significativo della *overall survival* (OS) ottenuto trattando pazienti EGFR positivi con Cetuximab [71]. Lo studio IPASS, condotto in Asia e che prevedeva l'arruolamento di pazienti non fumatori o fumatori moderati affetti da adenocarcinoma con mutazioni attivanti EGFR, ha chiaramente dimostrato un significativo incremento della sopravvivenza nei pazienti che hanno ricevuto Gefitinib come singolo farmaco *vs* pazienti trattati con la terapia standard [72-73]. In casistiche selezionate sulla base dell'espressione molecolare di EGFR, Gefitinib ed Erlotinib hanno mostrato effetti comunque positivi,

anche quando utilizzati come II e III linea [74-78]. Peraltro sono attualmente in corso alcuni *trials* mirati alla valutazione sulla sopravvivenza di farmaci anti-EGFR utilizzati con finalità adiuvante e di mantenimento dopo chirurgia. Molti sforzi vengono rivolti alla identificazione di specifici marcatori genetici che possano predire la risposta ad un dato farmaco: contrariamente all'approccio attuale, che prevede il trattamento dei pazienti non selezionati, la selezione dei pazienti *molecular-based* può realmente facilitare l'impostazione di una strategia terapeutica che consenta l'utilizzo del farmaco più appropriato per il singolo paziente. L'impostazione di una terapia individualizzata consente, inoltre, di ridurre gli effetti avversi della terapia e i costi derivati dall'utilizzo inappropriato di farmaci.

Nonostante i traguardi raggiunti dalla ricerca scientifica di base e traslazionale, i risultati della terapia *targeted* nel NSCLC - contrariamente a quanto è stato ottenuto in altri tumori solidi quali il cancro del colonretto e della mammella - rimangono ancora deludenti.

Se da un lato l'oncologia predittiva rappresenta un approccio nuovo e promettente alla patologia neoplastica, dall'altro comporta alcune implicazioni rilevanti e sotto questa prospettiva i risultati preliminari di questo studio consentono alcune osservazioni.

In primo luogo appare evidente che la classificazione anatomopatologica convenzionale del NSCLC - pur fondamentale per la stadiazione della malattia e per l'impostazione della terapia - è insufficiente per un approccio clinico e terapeutico selettivo e individualizzato, in grado cioè di garantire benefici al paziente. Il carcinoma broncogeno è una patologia complessa sia dal punto di vista istopatologico sia molecolare e la schematizzazione con cui viene inquadrata, se da un lato si è resa necessaria per una uniformità di gestione della malattia stessa, dall'altro è ragionevolmente troppo semplicistica e, pertanto, non consente l'impostazione di trattamenti realmente *targeted* per ciascun paziente.

Inoltre è importante sottolineare che non solo esistono variazioni del profilo molecolare tra pazienti affetti dallo stesso tipo istologico di tumore, ma che tale eterogeneità può riflettersi a livello molecolare in un singolo tumore. È infatti dimostrata la possibilità di coesistenza, nella stessa massa tumorale, di distinte subpopolazioni clonali fenotipicamente differenti, portatrici di lesioni molecolari diverse e differenziate a partire da multipli cloni cellulari trasformati [79].

Queste considerazioni dimostrano come il trattamento realmente *targeted* del NSCLC sia complesso e richieda ancora molti sforzi in campo scientifico.

Un altro punto rilevante nell'ambito della eterogeneità della massa tumorale è dato dalla struttura gerarchica che regola la proliferazione neoplastica. È dimostrato, infatti, che la maggior parte delle cellule differenziate in senso neoplastico conserva una capacità proliferativa relativamente limitata. Solo le cellule inizianti il tumore, note come *Cancer Stem Cells* (CSCs), possiedono le proprietà di auto-mantenimento e rigenerazione. Le CSCs non sono suscettibili ai trattamenti chemio e radioterapici e sono verosimilmente responsabili della insorgenza di recidive anche dopo la riduzione della massa neoplastica da parte dei trattamenti impostati. Le cellule staminali del cancro sono per definizione quiescenti (basso tasso di proliferazione) e presentano un fenotipo *not-oncogene-addicted*: per queste ragioni sono insensibili sia alla chemioterapia convenzionale che, probabilmente, alla *targeted therapy*. Se le CSCs esprimano le stesse lesioni molecolari delle cellule neoplastiche che da esse derivano e come sviluppare farmaci mirati a colpire queste cellule, rappresentano le sfide più attuali e impegnative della oncologia molecolare. Recentemente il gruppo di De Maria ha isolato CSCs da carcinoma broncogeno (SCLC e NSCLC). Queste cellule, ritenute staminali del cancro del polmone, sono una minuscola frazione di cellule indifferenziate che esprimono il marcatore CD133 (un antigene presente nella membrana delle cellule staminali normali e neoplastiche della linea ematopoietica, neurale, endoteliale ed epiteliale). Le cellule CD133+, isolate da carcinoma broncogeno, sono in grado di proliferare indefinitamente e di crescere come sfere in terreni privi di siero. Una volta che si differenziano, acquisiscono i marcatori propri di ciascun istotipo e, contemporaneamente, perdono l'espressione di CD133 e le proprietà tumorigeniche (Figura 32).

Un ulteriore elemento rilevante nel determinare l'eterogeneità della lesione neoplastica è dato dalle lesioni secondarie che da essa derivano ma che possono presentare caratteri molto diversi dal tumore primitivo. Le metastasi - che rappresentano la causa principale di morte nei pazienti neoplastici - derivano dalla attivazione di processi biologici che avviano la cellula neoplastica a staccarsi dalla massa primitiva, migrare attraverso i tessuti, raggiungere la circolazione vasale o linfatica e, infine, colonizzare organi secondari. In tutti questi processi la cellula metastatica sopravvive alla apoptosi, che dovrebbe essere invece indotta dal fatto di trovarsi in ambienti non appropriati (*anoikis*) [80]. Bisogna peraltro sottolineare che la sequenza cronologica della progressione neoplastica, secondo la quale l'insorgenza delle metastasi segue la crescita e lo sviluppo di una massa primaria, non è sempre rispettata: non tutti i tumori sono metastatici, così come è possibile che le metastasi si sviluppino in una fase ancora precoce dell'*onset* tumorale. Ad oggi non sono definiti quali marcatori genetici siano coinvolti nel processo di selezione della cellula metastatica e nella promozione della capacità di invasione e di resistenza all'*anoikis*. È stato anche ipotizzato che queste cellule possano derivare e differenziare direttamente dalle CSCs attraverso processi biologici relativamente indipendenti da quelli che guidano lo sviluppo della massa primitiva. È possibile che il processo di metastatizzazione non sia originato dalla attivazione di oncogeni specifici, ma derivi dalla attivazione, in cellule trasformate, di programmi che mediano la migrazione anche in condizioni fisiologiche.

In altre parole, è verosimile che le cellule tumorali originate e selezionate per la metastatizzazione a distanza esprimano marcatori di attivazione oncogenica propri che conducono alla attivazione inappropriata di fisiologici processi di motilità ed invasione; conseguentemente, i marcatori genetici individuati nella lesione primaria possano non essere presenti a livello delle lesioni secondarie e, pertanto, possono non aver alcun valore predittivo e prognostico relativamente alle lesioni secondarie. Su questa base è possibile quindi che il pattern di alterazioni molecolari presenti nelle metastasi sia indipendente rispetto all'organo sede del tumore primario e che pertanto non sia possibile identificare *targets* propri delle metastasi originate da carcinoma broncogeno.

In conclusione, l'eterogeneità delle cellule che costituiscono la massa neoplastica fornisce il razionale per quella che è stata definita *Orthogonal Cancer Therapy* [81]: la moderna terapia oncologica deve essere interpretata come un filtro che rimuove una sottopopolazione di cellule trasformate, sensibile alla terapia stessa, lasciando inalterate le altre cellule. Il meccanismo per cui alcune cellule non sono sensibili al trattamento è dovuto alla presenza di resistenza primaria o alla acquisizione di mutazioni in oncogeni e/o geni oncosoppressori (resistenza secondaria). Solo combinando in modo ortogonale più farmaci (filtri) si può minimizzare il rischio di resistenza o di ripresa di malattia (Figura 33).

Da quanto finora discusso appare evidente che la possibilità di compiere tali indagini di *routine* e in maniera minimamente invasiva costituisce un elemento fondamentale per poter caratterizzare il profilo molecolare di ciascun tumore diagnosticato e impostare un trattamento effettivamente *targeted* e in grado di garantire benefici per il paziente. L'applicazione sistematica di una terapia individualizzata rappresenta la sfida della oncologia traslazionale, soprattutto per quanto riguarda tumori solidi - come il carcinoma broncogeno - per i quali l'approccio *standard* non ha garantito sostanziali benefici. L'enorme *input* con cui vengono identificati e caratterizzati nuovi *targets* tumorali (e.g. NSCLC-CSCs), sia dal punto di vista molecolare sia funzionale, è quindi volto alla definizione di una *NSCLC signature* che possa, in ultimo, fornire dati realmente utilizzabili in un *setting* clinico.

Sotto tale prospettiva la tecnologia messa a punto nel corso di questo studio e i risultati raggiunti costituiscono uno *step* preliminare, ma di immediato impatto clinico, nell'approfondimento diagnostico e nel trattamento del NSCLC. Con la validazione delle analisi mutazionali su campioni biotipici freschi e di piccole dimensioni vengono poste le basi per l'ottenimento della diagnosi molecolare parallelamente a quella anatomopatologica così da poter impostare, già in prima linea, ovvero senza necessità di materiali e tempi aggiuntivi, il trattamento migliore per ciascun paziente.

### **Prospettive future**

I dati validati attraverso questo lavoro sperimentale ne giustificano l'approfondimento con studi futuri che prevedono di orientare le prospettive in diverse direzioni.

In primo luogo appare necessario l'ampliamento del pannello di geni candidati nel processo di oncogenesi polmonare (e.g. BRAF, PIK3CA, MET) con lo scopo di caratterizzare il *pattern* di espressione nel NSCLC. La costituzione di una più organica *NSCLC-signature* potrà consentire sia l'approfondimento dello studio dei meccanismi patogenetici del cancro polmonare sia l'applicazione - attraverso il disegno di *trials* clinici mirati - di terapie specifiche sulla base della diagnosi molecolare. Un ulteriore ambito aperto preliminarmente da questo lavoro è rappresentato dalla possibilità di ottenere, attraverso la procedura di FNAC, cellule tumorali fresche utilizzabili in coltura. La possibilità di disporre di linee cellulari primarie consente, infatti, di:

- valutare i livelli di espressione proteica delle diverse molecole di cui si conosce il profilo mutazionale così da poter passare ad un approccio genomico funzionale e non strettamente digitale.
- Inoltre, da una prospettiva più strettamente farmacogenomica, tali linee cellulari potranno essere screenate relativamente alla sensibilità/resistenza nei confronti di *libraries* costituite da farmaci utilizzabili in clinica.
- Sarà infine possibile - tramite tecnologia di *cell sorting* - l'isolamento di cellule esprimenti i marcatori di staminalità così da poterle quantificare e isolare.

La necessità di poter ottenere materiale neoplastico del paziente con tecniche sempre meno invasive e di poterlo processare con tecnologie sempre più sensibili apre la strada alla possibilità di monitorare nel tempo il profilo molecolare tumorale per ciascun paziente in modo da poterne verificare eventuali variazioni verosimilmente responsabili della insorgenza di resistenze nei confronti della terapia in atto. Studi molto recenti hanno inoltre dimostrato che è possibile isolare cellule tumorali circolanti e DNA tumorale dalla frazione *cell-free* del plasma derivato dal sangue periferico [82] (Figura 34).

I potenziali vantaggi di poter condurre l'analisi mutazionale su materiale genetico tumorale estratto dal sangue periferico sono evidentemente innumerevoli sia in termini di raggiungimento della diagnosi sia in termini di possibilità di monitoraggio costante e incruento della risposta terapeutica.

Infine la validazione di questi risultati preliminari ottenuti nel NSCLC pone le basi per l'ampliamento dello studio alle altre principali neoplasie toraciche quali carcinoma a piccole cellule (SCLC) e il mesotelioma pleurico maligno (MPM). Queste forme neoplastiche, a fronte di una incidenza significativa, sono gravate da tassi di mortalità molto elevata; peraltro appaiono sostanzialmente refrattarie ai trattamenti chemio e radioterapici convenzionalmente attuati. Sia il microcitoma che il mesotelioma pleurico possono essere definite malattie orfane, le cui basi patogenetiche non sono state ancora delucidate e per le quali non sono attualmente disponibili farmaci *targeted*. Appare evidente la rilevanza che studi di espressione molecolare possono avere sia per quanto riguarda la definizione dei meccanismi di alterazione molecolare responsabili della induzione e progressione neoplastica sia in prospettiva terapeutica.

## Tabelle e Figure

Tabella 1. Sequenze dei primers di amplificazione e sequencing utilizzati nello studio.

Gene	Esone	Forward primer	Reverse primer	Sequencing primer
EGFR	18	TGATCTGTCCCTCACAG CAG	TCAGGAAAATGCTGGCT GAC	TTCAGGGCATGAACT ACTTG
	19	GCTGAGGTGACCCTTGT CTC	ACAGCTTGCAAGGACTC TGG	TGGAGCCTCTTACAC CCAGT
	20	CCCAGTGTCCCTCACCT TC	CCACACAGCAAAGCAG AAC	GCTGGTAACATCCAC CCCAGA
	21	CCCTGTGCTAGGTCTTTT GC	AAAGGAATGTGTGTGTG CTG	CATTACATGCGTCTTC ACCTG
KRAS	2	GGTGGAGTATTTGATAG TGTATTAACC	AGAATGGTCCTGCACCA GTAA	TCATTATTTTTATTAT AAGGCTGCTG

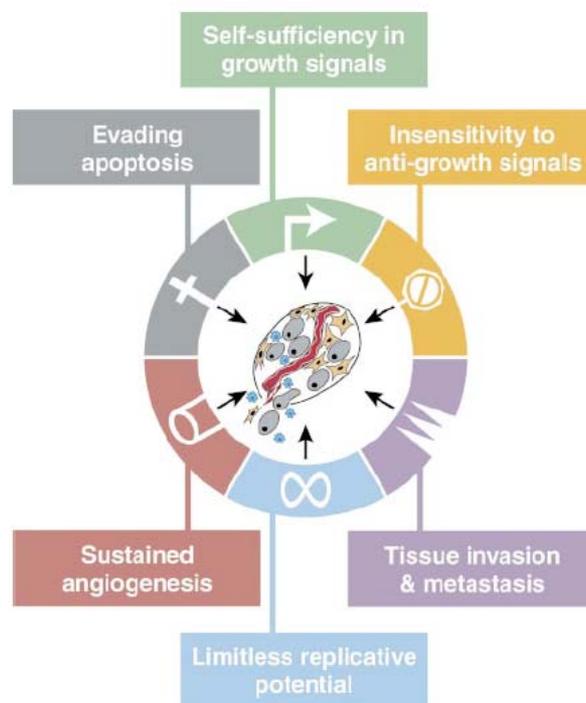


Figura 1. Proprietà delle cellula neoplastica [83].

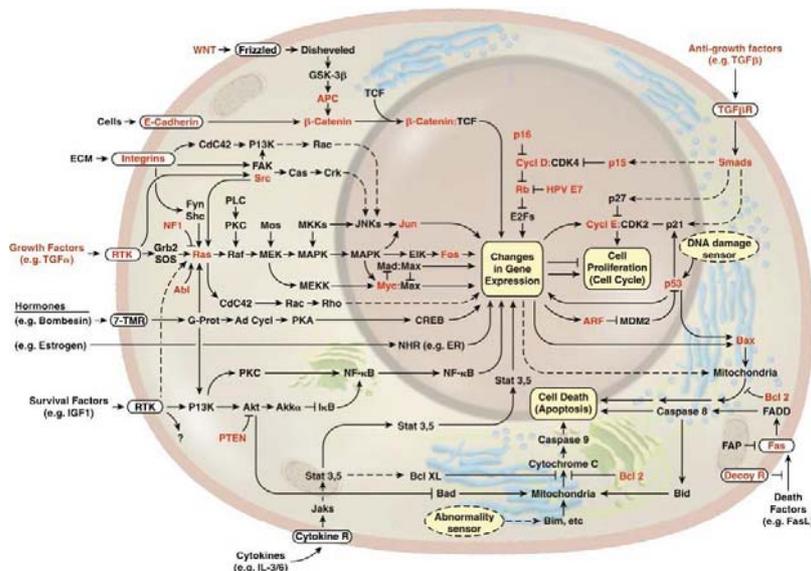


Figura 2. La complessità delle vie di segnale nella cellula trasformata. Molti geni responsabili del cancro sono attivati da mutazioni somatiche. Queste lesioni molecolari inducono l'attivazione aberrante delle vie di segnale a valle della proteina codificata dal gene mutante. Molto sovente oncogeni mutati codificano per recettori transmembrana alterati, in grado, pertanto, di trasmettere in modo costitutivo il segnale all'interno della cellula [83].

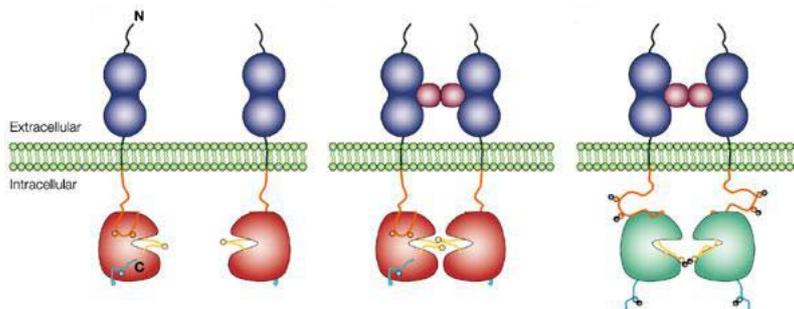


Figura 3. Attivazione dei recettori tirosin-chinasi. In condizioni fisiologiche, in assenza del ligando, il dominio tirosin-chinasi (rosso) del recettore è mantenuto ad un livello di attivazione basale; inoltre il sito attivo (giallo) è in posizione sfavorevole alla attivazione. Il legame con il ligando (rosa) induce la dimerizzazione dei domini extracellulari (blu) con conseguente giustapposizione delle regioni citoplasmatiche: questa conformazione facilita la transfosforilazione dei residui tirosinici del dominio catalitico. Una volta fosforilata la chinasi è funzionalmente attiva (verde) e promuove l'esposizione nella coda terminale dei siti di legame per i secondi messaggeri intracitoplasmatici che possono, in tal modo, essere reclutati per la trasmissione del segnale. In condizioni patologiche, come nel cancro, la presenza di mutazioni somatiche nella sequenza codificante per il recettore induce la produzione di una proteina strutturalmente alterata, in grado di attuare in modo persistente la fosforilazione dei residui tirosinici del sito attivo del dominio catalitico. Inoltre la presenza di recettori in numero maggiore sulla superficie della cellula può facilitarne la dimerizzazione e la transfosforilazione in assenza del ligando [84].

Stadio	TNM	Sopravvivenza a 5 anni (%)
IA	T1, N0, M0	>70
IB	T2, N0, M0	60
IIA	T1, N1, M0	50
IIB	T2, N1, M0 T3, N0, M0	30 40
IIIA	T1 o T2, N2, M0 T3, N1 o N2, M0	10-30
IIIB	Ogni T, N3, M0 T4, ogni N, M0	<10 <5
IV	ogni T, ogni N, M1	<2

Figura 4. Sistema di stadiazione del NSCLC e relativi tassi di sopravvivenza.

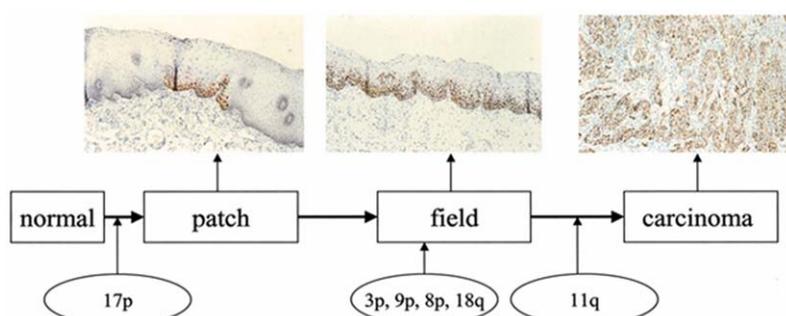


Figura 5. *Field cancerization* : sequenza di acquisizione delle lesioni molecolari che conducono allo sviluppo del cancro [85].

Abnormality	Non-Small-Cell Lung Cancer		
	Squamous-Cell Carcinoma	Adenocarcinoma	Small-Cell Lung Cancer
<b>Precursor</b>			
Lesion	Known (dysplasia)	Probable (atypical adenomatous hyperplasia)	Possible (neuroendocrine field)†
Genetic change	p53 mutation	KRAS mutation (atypical adenomatous hyperplasia in smokers), EGFR kinase domain mutation (in nonsmokers)	Overexpression of c-MET
<b>Cancer</b>			
KRAS mutation	Very rare	10 to 30%‡	Very rare
BRAF mutation	3%	2%	Very rare
<b>EGFR</b>			
Kinase domain mutation	Very rare	10 to 40%‡	Very rare
Amplification§	30%	15%	Very rare
Variant III mutation	5%¶	Very rare	Very rare
<b>HER2</b>			
Kinase domain mutation	Very rare	4%	Very rare
Amplification	2%	6%	Not known
ALK fusion]	Very rare	7%	Not known
<b>MET</b>			
Mutation	12%	14%	13%
Amplification	21%	20%	Not known
TTF-1 amplification	15%	15%	Very rare
p53 mutation	60 to 70%	50 to 70%‡	75%
LKB1 mutation	19%	34%	Very rare
<b>PIK3CA</b>			
Mutation	2%	2%	Very rare
Amplification	33%	6%	4%

Figura 6. Lesioni molecolari del carcinoma broncogeno [17].

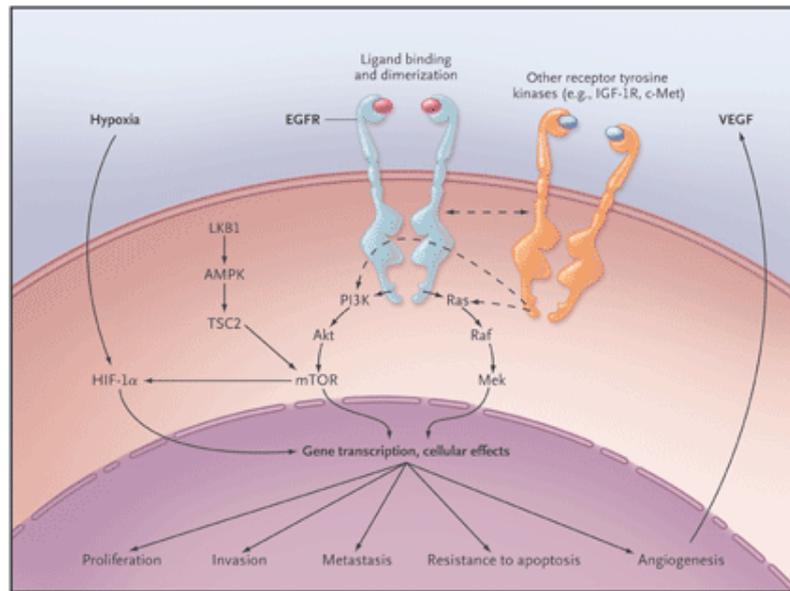


Figura 7. La via di segnale cellulare mediata da EGFR [17].

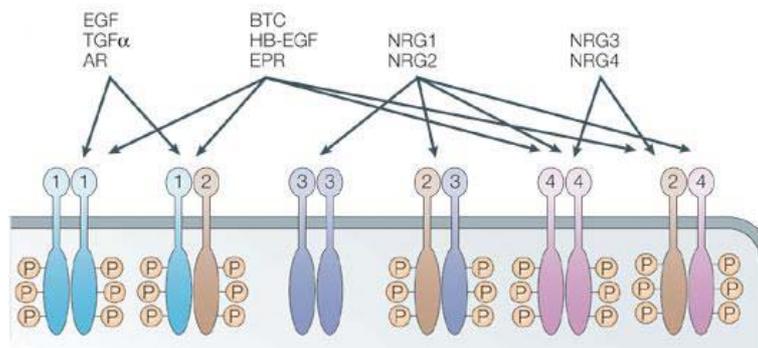


Figura 8. I recettori di EGF sono costituiti da una famiglia di 4 membri. Ciascun membro può legare ligandi specifici della famiglia di EGF. In particolare EGFR (o ErbB-1) lega EGF, TGF- $\alpha$ , AR; BTC, HB-EGF, EPR, NRGn si legano a ErbB-3 e ErbB-4; nessun ligando si lega specificamente a ErbB-2 che è, tuttavia, frequentemente coinvolto nella formazione di eterodimeri con altri membri. In particolare EGFR è stato identificato e clonato con tecniche biochimiche e mostra omologia cellulare con recettore v-erbB, oncogene retrovirale. Gli altri membri sono stati isolati con tecniche di ibridazione dei siti di omologia a partire da *libraries* di cDNA. EGFR e ErbB-2 sono espressi in differenti tipi cellulari, ErbB-3 si trova solo in cellule di derivazione epiteliale e neuro ectodermica [85].

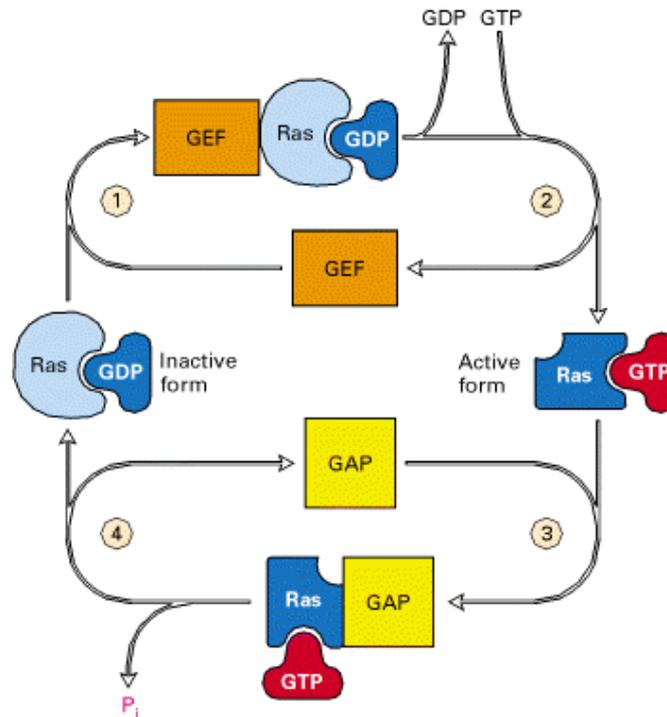


Figura 9. Ciclo di attivazione e inattivazione della proteina RAS. L'attivazione di recettori transmembrana induce la formazione del complesso attivo GTP-RAS. Il fattore GEF induce la dissociazione del GDP da RAS. E il GTP si lega spontaneamente alla proteina mentre GEF si dissocia dalla proteina ormai attivata. L'idrolisi del legame con il GTP per rigenerare la forma inattiva legata al GDP è accelerata dalla GTPasi GAP. Nelle forme mutanti la proteina è costitutivamente nella conformazione attivata e non consente l'accesso all'enzima GAP (da *Cancer Medicine* 6, online ed.).

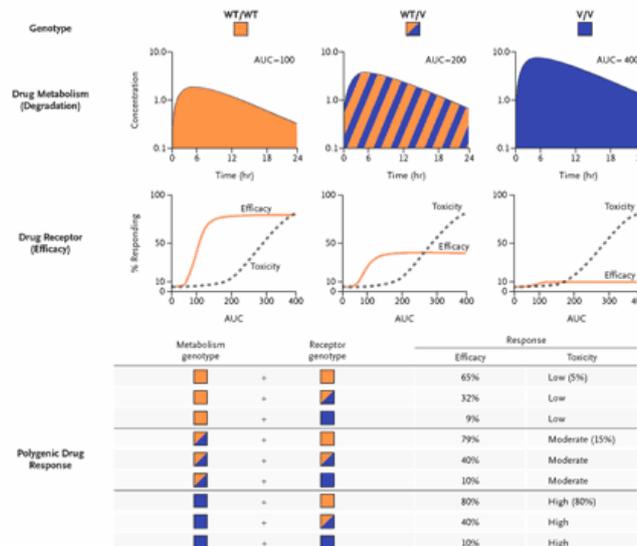
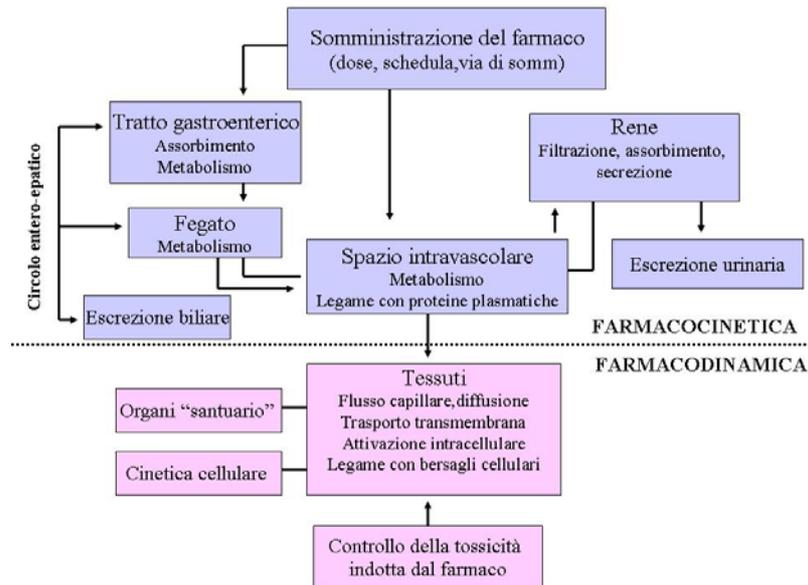
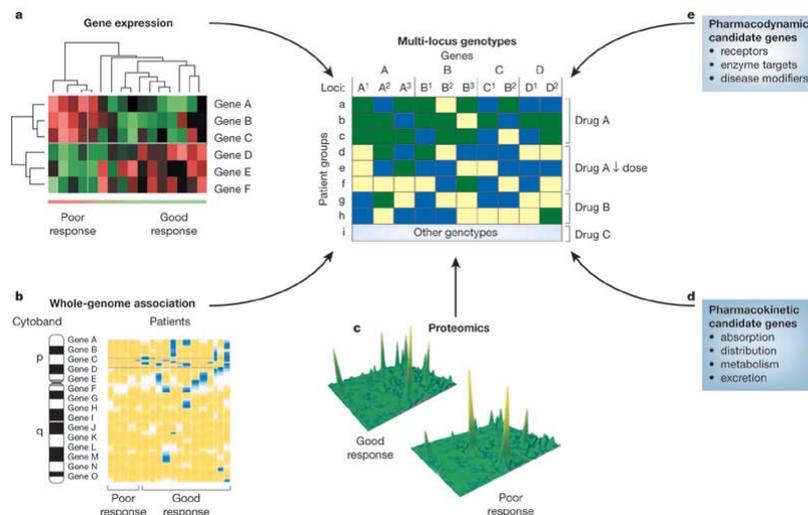


Figura 10. Determinanti poligenici della risposta ai farmaci. Possibili effetti dei polimorfismi genici nel metabolismo dei farmaci (A), nella efficacia (B) e nel determinare la risposta ad un trattamento in pazienti *wild type*, eterozigote o omozigote per una determinata variante allelica [87].



**Figura 11. Meccanismi di farmacocinetica e farmacodinamica che intervengono nel metabolismo dei farmaci. Farmacocinetica: assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione del farmaco. Farmacodinamica: meccanismi di interazione del farmaco con i tessuti bersaglio.**



**Figura 12. Strategie *high throughput* per l'impostazione della terapia sulla base del profilo farmacogenomico individuale [88].**

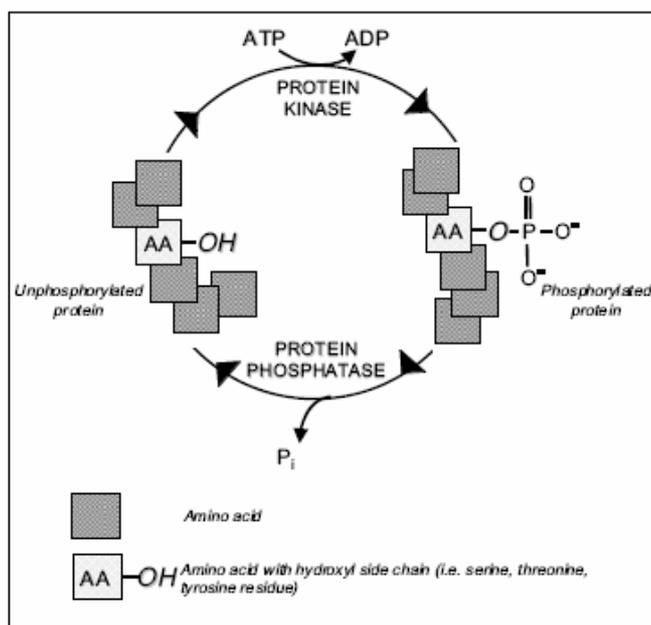


Figura 13. Reazione di fosforilazione e defosforilazione delle proteine. Le chinasi trasferiscono un gruppo fosfato da una molecola di ATP alla terminazione idrossilica di un dato aminoacido (in genere serina, treonina, tiroxina), mentre le fosfatasi rimuovono tale gruppo fosfato dalla proteina. L'attacco del gruppo fosfato che è carico negativamente può indurre modificazioni conformazionali della struttura della proteina [43].

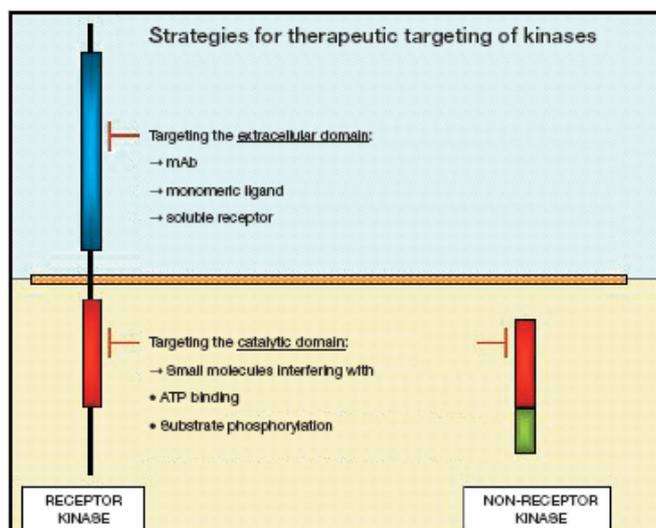


Figura 14. Strategie di bersaglio dei recettori tirosin-chinasi a localizzazione transmembranica [43].

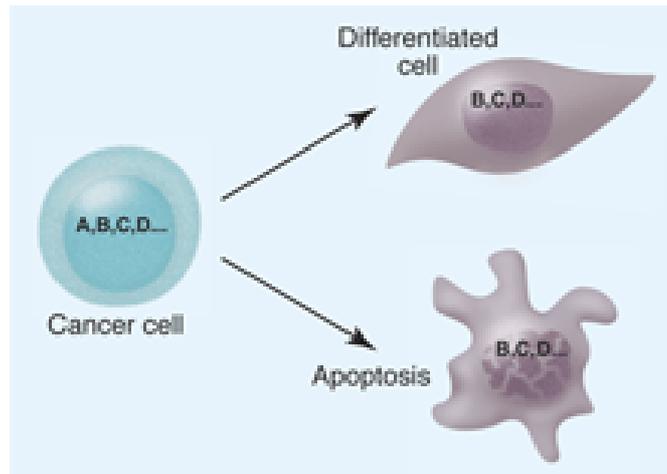


Figura 15. *Oncogenic addiction*. Le cellule tumorali acquisiscono molteplici anomalie (A, B, C, D) in diversi oncogeni e geni oncosoppressori; il silenziamento di un solo oncogene cruciale (A) può indurre le cellule neoplastiche alla differenziazione in cellule con fenotipo normale o ad attuare il programma di apoptosi. La dipendenza dal singolo oncogene per il mantenimento del fenotipo maligno, costituisce una sorta di tallone d'Achille che consente nuove prospettive terapeutiche [50].

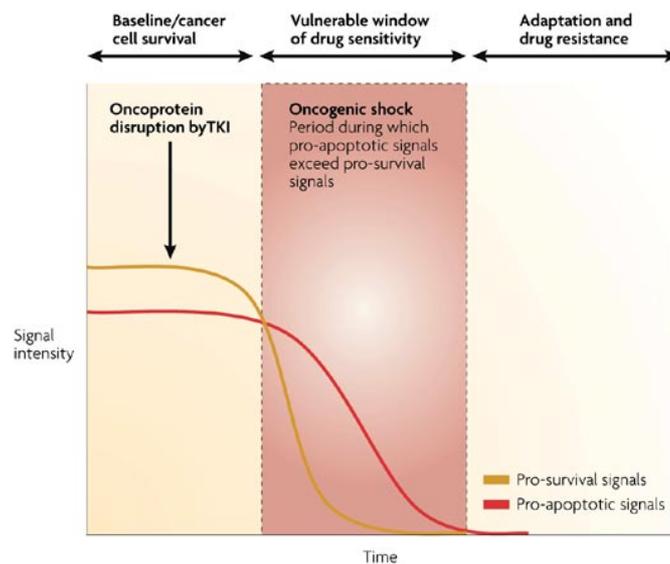


Figura 16. Differenti profili di attenuazione del segnale di proliferazione e apoptosi cellulare indotta dallo shock oncogenico. Dopo l'inibizione acuta di un oncogene cruciale, attraverso l'utilizzo di un farmaco, i segnali di proliferazione vengono rapidamente dissipati e prevalgono quelli di apoptosi. Durante questa finestra di vulnerabilità e sensibilità alla terapia, i segnali di apoptosi inducono la morte cellulare. Un possibile meccanismo di resistenza alla terapia è dovuto allo sviluppo di meccanismi di adattamento e di superamento dello shock oncogenico [21].

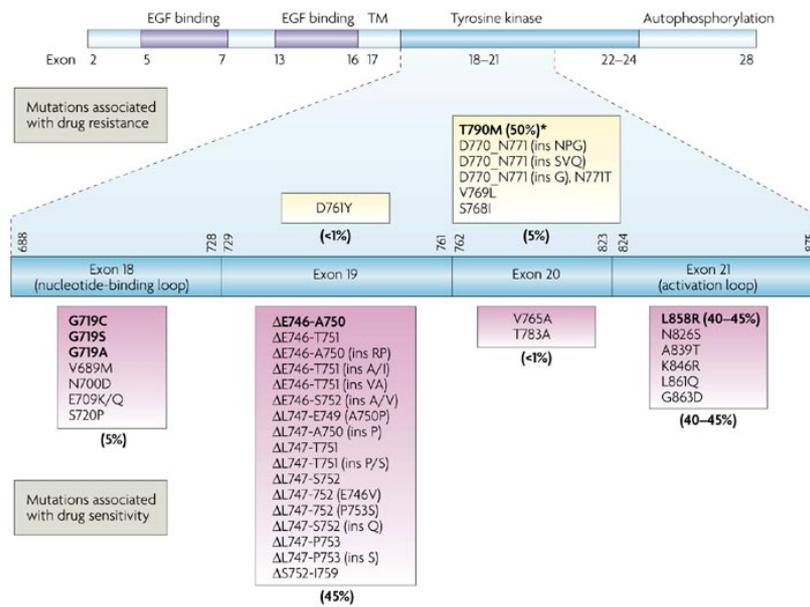


Figura 17. Mutazioni di EGFR associate a sensibilità o resistenza agli inibitori [21].

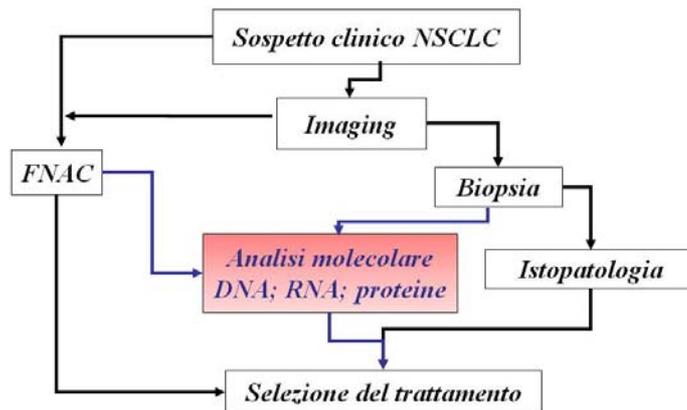


Figura 18. Ruolo della diagnosi molecolare nella impostazione della terapia antineoplastica personalizzata.

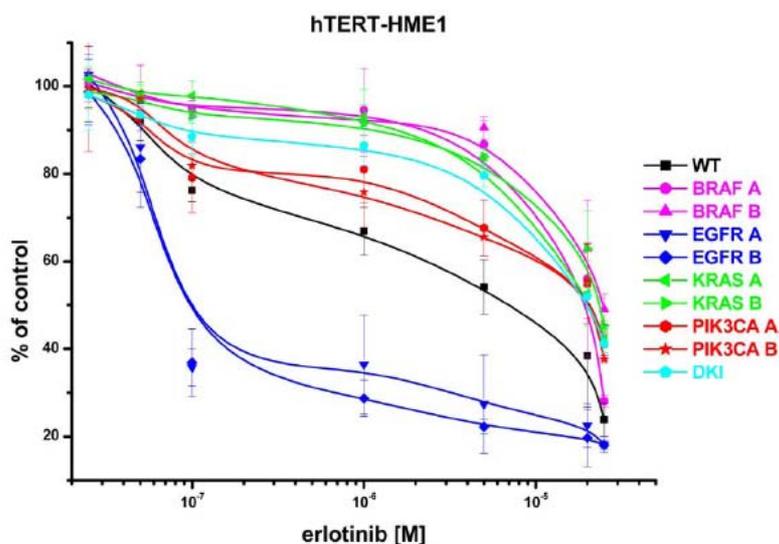


Figura 19. Effetto del trattamento con Erlotinib su linee cellulari epiteliali (*Human Mammary Epitelium* - HME). *Knock-in* per mutazioni puntiformi di differenti oncogeni (BRAF, EGFR, KRAS, PIK3CA). Sono indicati con A e B i cloni isogenici portatori della stessa mutazione. DKI: doppio *Knock In* (EGFR~~del19~~+KRASG12D). L'asse delle ascisse indica la concentrazione molare del farmaco; l'asse delle ordinate la percentuale delle cellule vive ( stima ottenuta dalla analisi del contenuto di ATP ). Solo i cloni portatori della mutazione di EGFR rispondono al trattamento; il DKI si comporta come i cloni non sensibili al farmaco [5].

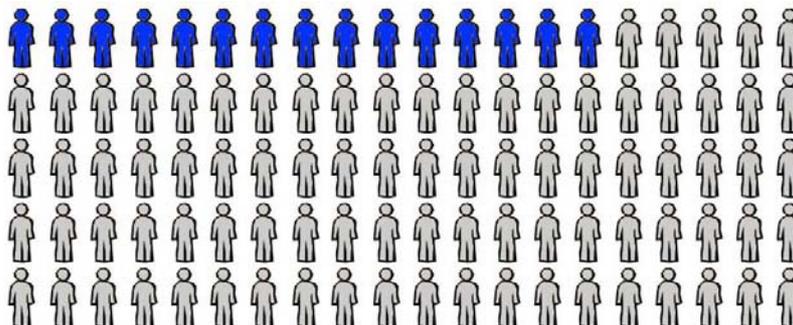


Figura 20. Interazioni farmaco-genotipo: nell'ambito di una coorte di pazienti affetti da uno stesso tipo di tumore, la diagnostica molecolare (e.g. analisi mutazionale di EGFR) è imprescindibile per l'individuazione dei soggetti *responders* (e.g. portatori di mutazioni di EGFR) ad una data terapia biologica (e.g. Erlotinib, Gefitinib).

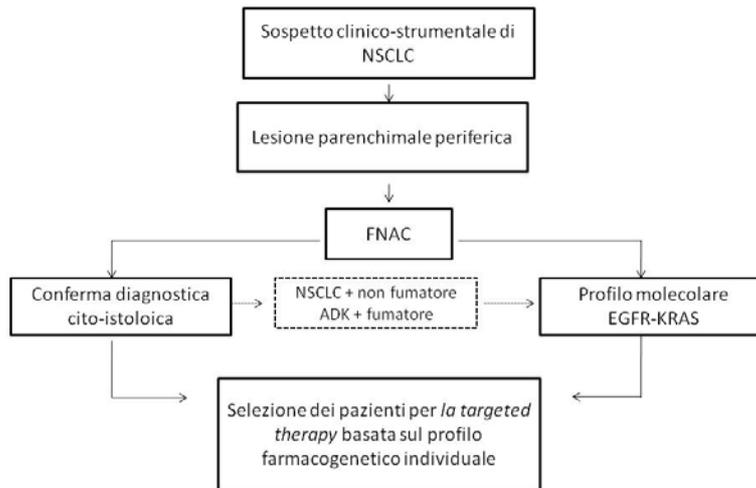


Figura 21. Criteri e modalità di arruolamento dei pazienti nello studio clinico.

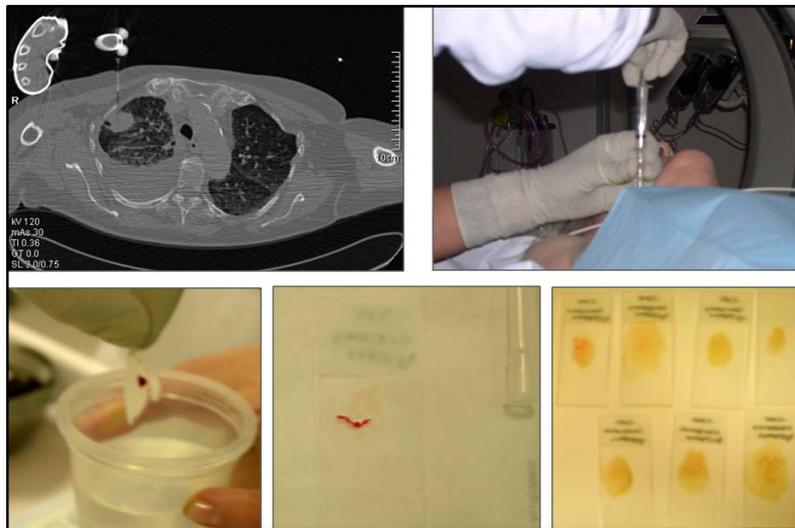


Figura 22. Procedura di citoaspirazione trans-toracica attuata in caso di sospetto clinico-strumentale di lesione polmonare espansiva.

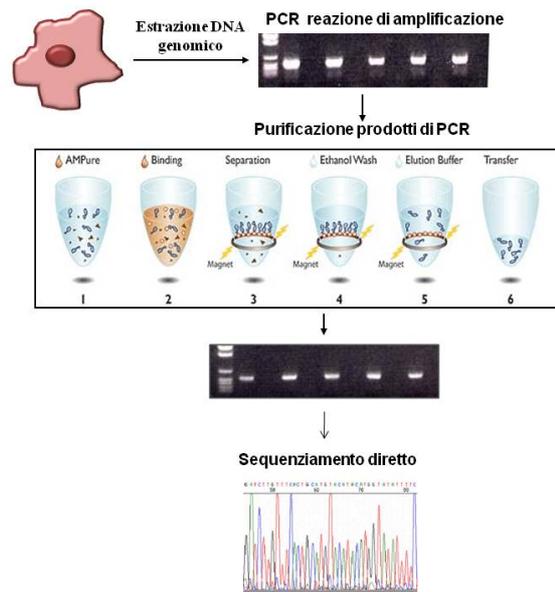


Figura 23. Procedura di amplificazione e purificazione del DNA genomico. Per il disegno dei *primers* di amplificazione e sequenziamento è stato utilizzato il programma *online* Primers3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)); i *primers* sono stati sintetizzati con tecnologia Invitrogen/Life (Paisley, England). Sono state analizzate le regioni *hot spot* degli oncogeni EGFR e KRAS, in particolare gli esoni 18,19,20,21 codificanti il dominio tirosin-chinasico di EGFR e l'esone 2 in cui si ritrova la gran parte delle mutazioni note attivanti KRAS.

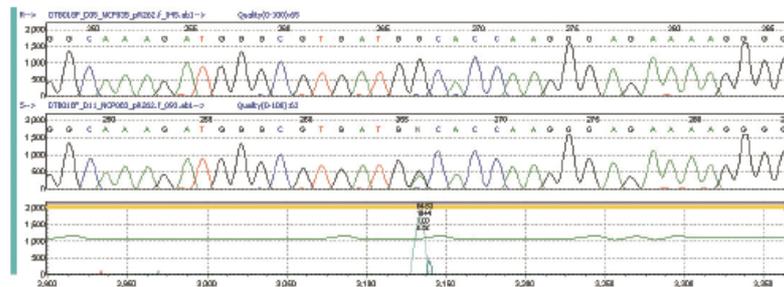


Figura 24. Analisi mutazionale. Ciascuna mutazione somatica è facilmente evidenziata dalla presenza di un picco che rappresenta la differenza nella sovrapposizione tra l'elettroferogramma in analisi (tumore) e quello di riferimento (*wild type*). La tecnologia di analisi fornita dal software utilizzato consente la detezione di mutazioni con una sensibilità del 95%.

$$P_{FNAC} = \frac{\text{NSCLCs mutati (EGFR, KRAS)}}{\text{NSCLCs arruolati (mutati + wild type)}}$$

Figura 25.

		120 pazienti
		95% CI
<b>Oncogene</b>	<b>% mutazioni nota*</b>	
<b>EGFR</b>	<b>10</b>	<b>5.2-16.8%</b>
<b>KRAS</b>	<b>15</b>	<b>9.1-22.7%</b>

Figura 26. \*dati dal Wellcome Trust Sanger Institute - Center Genome Project Database. Le percentuali indicate si riferiscono alla analisi mutazionale condotta su pezzi operatori e in linee cellulari di carcinoma broncogeno.

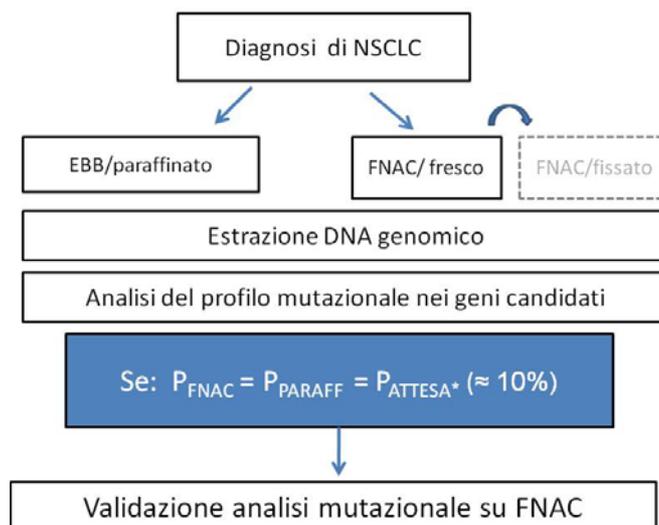


Figura 27. Algoritmo procedurale per la validazione dell'endpoint principale dello studio clinico.

ID	SEX	ETA'	DIAGNOSI	TNM	CAMPIONE	BIOPSIA	TERAPIA I linea	FOLLOW UP	SOPRAVVIVENZA (MESI)	EGFR 18	EGFR 19	EGFR 20	EGFR 21	KRAS 2
S01	F	56	ADK	T3N2M0	fresco e paraffinato	FNAC+EBB	CBDCa+GEM	VIVENTE	8	WT	WT	WT	WT	WT
S02	M	67	NSCLC	T3N1M0	fresco e paraffinato	FNAC+EBB	CBDCa+GEM	VIVENTE	15	WT	WT	WT	WT	WT
S03	M	63	ADK	T3N2M1	fresco e paraffinato	FNAC+EBB	CBDCa+GEM	VIVENTE	6	WT	WT	WT	WT	G13D
S04	M	87	ADK	T2N0M1	fresco e paraffinato	FNAC+EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	0,7	WT	DELEZ	WT	WT	WT
S05	F	85	NSCLC	T4N1M0	fresco e paraffinato	FNAC+EBB	BSC	VIVENTE	19	WT	WT	WT	WT	WT
S06	F	64	SCLC	T3N2M0	fresco e paraffinato	FNAC+EBB	CDDP+GEM	DECEDUTO	16	WT	WT	WT	WT	WT
S07	F	56	LC	T1N3M0	fresco e paraffinato	FNAC+EBB	CBDCa+GEM	VIVENTE	13	WT	WT	WT	WT	WT
S08	M	77	SCC	T3N2M0	fresco e paraffinato	FNAC+EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	18	WT	WT	WT	WT	WT
S09	M	80	SCC	T3N2M1	fresco e paraffinato	FNAC	VNR	VIVENTE	9	WT	WT	WT	WT	WT
S10	M	73	ADK	T3N1M1	fresco e paraffinato	FNAC+EBB	CDDP+GEM	VIVENTE	17	WT	WT	WT	WT	L858R
S11	F	81	SCLC	T3N2M0	fresco e paraffinato	FNAC+EBB	CDDP+GEM	VIVENTE	16	WT	WT	WT	WT	WT
S12	M	75	ADK	T3N1M1	fresco	FNAC	CDDP+GEM	DECEDUTO	4	WT	WT	WT	WT	WT
S13	M	61	ADK (BAC)	T2N0M0	fresco	FNAC	CBDCa+GEM	VIVENTE	48	WT	WT	WT	WT	WT
S14	F	75	SCC	T2N0M0	fresco	FNAC	BSC	VIVENTE	2	WT	WT	WT	WT	WT
S15	M	77	SCC	T3N1M0	fresco	FNAC	BSC	DECEDUTO	25	WT	WT	WT	WT	WT
S16	M	59	LC	T2N2M1	fresco	FNAC	VNR	VIVENTE	6	WT	WT	WT	WT	WT
S17	M	76	SCC	T3N3M1	fresco	FNAC	CDDP+GEM	VIVENTE	4	WT	WT	WT	WT	WT
S18	F	78	ADK	T2N2M1	fresco	FNAC	CDDP+GEM	DECEDUTO	16	WT	WT	WT	WT	WT
S19	M	67	NSCLC	T3N2M1	fresco	FNAC	CDDP+GEM	VIVENTE	3	WT	WT	WT	WT	WT
S20	F	69	SCC	T4N2M0	fresco	FNAC	CBDCa+GEM	VIVENTE	9	WT	WT	WT	WT	WT
S21	M	78	SCC	T3N2M1	fresco	FNAC	CDDP+GEM	VIVENTE	2	WT	WT	WT	WT	WT
S22	F	72	ADK	T3N2M1	fresco	FNAC	CDDP+GEM	VIVENTE	20	WT	WT	WT	WT	WT
S23	F	76	ADK	T3N1M0	fresco	FNAC	CDDP+GEM	VIVENTE	19	WT	WT	WT	WT	WT
S24	M	61	NSCLC	T3N0M0	fresco	FNAC	CHIRURGIA	VIVENTE	3	WT	WT	WT	WT	WT
S25	F	69	ADK	T4N2M0	fresco	FNAC	CBDCa+GEM	VIVENTE	7	WT	WT	WT	WT	WT
S26	F	80	ADK	T3N0M0	fresco	FNAC	CDDP+GEM	VIVENTE	1	WT	DELEZ	WT	WT	WT

Figura 28. Caratteristiche dei pazienti arruolati nella coorte in studio: casi per i quali l'analisi mutazionale è stata condotta su cellule tumorali (materiale fresco) e quando possibile sulle corrispondenti sezioni paraffinate (WT indica wild type).

ID	SEX	ETA'	DIAGNOSI	TNM	CAMPIONE	BIOPSIA	TERAPIA I linea	FOLLOW UP	SOPRAVVIVENZA (MESI)	EGFR 18	EGFR 19	EGFR 20	EGFR 21	KRAS 2
T01	M	85	ADK	T2N1M0	paraffinato	EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	13	WT	WT	WT	WT	WT
T02	M	78	ADK	T1N0M1	paraffinato	EBB	VNR	PERSO		WT	WT	WT	WT	WT
T03	M	79	NSCLC	T3N2M0	paraffinato	EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	27	WT	WT	WT	WT	WT
T04	F	79	ADK	T4N1M1	paraffinato	EBB	GEFITINIB	DECEDUTO	23	WT	DELEZ	WT	WT	WT
T05	M	55	SCC	T4N2M0	paraffinato	EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	16	WT	WT	WT	WT	WT
T06	M	71	ADK	T4N2M1	paraffinato	EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	4	WT	WT	WT	L858R	WT
T07	M	68	SCC	T3N2M0	paraffinato	EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	22	WT	WT	WT	WT	WT
T08	M	68	ADK	T3N2M1	paraffinato	EBB	CCDP+GEM	DECEDUTO	21	WT	WT	WT	WT	WT
T09	F	85	ADK	T3N0M0	paraffinato	EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	16	WT	WT	WT	WT	WT
T10	M	70	SCC	T2N0M0	paraffinato	EBB	SURGERY	DECEDUTO	25	WT	WT	WT	WT	WT
T11	M	74	LC	T2N2M1	paraffinato	EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	51	WT	WT	WT	WT	WT
T12	F	73	ADK	T2N2M0	paraffinato	EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	16	WT	WT	WT	WT	WT
T13	M	81	ADK	T1N2M0	paraffinato	EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	27	WT	WT	WT	WT	WT
T14	M	66	SCC	T3N0M0	paraffinato	EBB	SURGERY	DECEDUTO	50	WT	WT	WT	WT	WT
T15	M	61	NSCLC	T2N2M0	paraffinato	EBB	CBDCa+P16	DECEDUTO	17	WT	WT	WT	WT	WT
T16	F	72	ADK	T3N1M0	paraffinato	EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	14	WT	WT	WT	WT	WT
T17	M	56	SCC	T1N0M1	paraffinato	EBB	SBDCa+GEM	DECEDUTO	11	WT	WT	WT	WT	WT
T18	F	73	SCC	T3N3M0	paraffinato	EBB	CBDCa+VNR	DECEDUTO	18	WT	WT	WT	WT	WT
T19	F	68	ADK	T4N3M1	paraffinato	EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	23	WT	WT	WT	WT	WT
T20	F	56	ADK	T3N2M1	paraffinato	EBB	CBDCa+VNR	DECEDUTO	20	WT	WT	WT	WT	WT
T22	M	76	NSCLC	T2N2M1	paraffinato	EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	14	WT	WT	WT	WT	WT
T23	M	59	SCC	T3N2M0	paraffinato	EBB	CBDCa+GEM	DECEDUTO	17	WT	WT	WT	WT	WT
T24	F	58	ADK	T3N2M1	paraffinato	EBB	CBDCa+GEM	VIVENTE	22	WT	WT	WT	L858R	WT

Figura 29. Caratteristiche dei pazienti arruolati nella coorte di riferimento: casi per i quali l'analisi mutazionale è stata condotta sulle sezioni paraffinate (WT indica *wild type*).

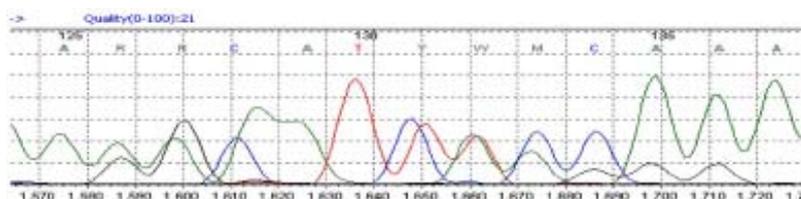


Figura 30. Elettroferogramma che si riferisce alla reazione di sequenziamento dell'esone 19 di EGFR nel caso S04: si noti la delezione dell'esone.

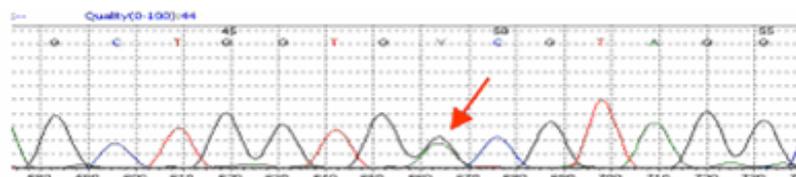


Figura 31. Elettroferogramma relativo alla reazione di sequenziamento dell'esone 2 di KRAS nel caso S03: si noti la presenza della mutazione G13D.

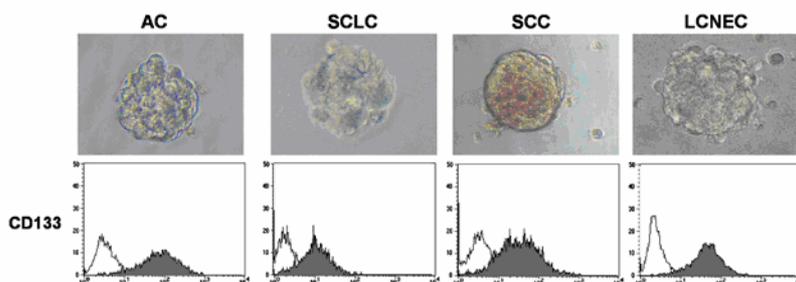


Figura 32. Cellule staminali inizianti il carcinoma broncogeno. Sfere ottenute da colture primarie dei diversi istotipi tumorali (AC: adenocarcinoma, SCLC: carcinoma a piccole cellule, SCC: carcinoma squamoso, LCNEC: carcinoma a grandi cellule variante neuroendocrina). Analisi con citometria di flusso mirata al *sort* di cellule CD133+ che dimostra la presenza di una popolazione CD133 positiva nelle stesse cellule in coltura primaria.

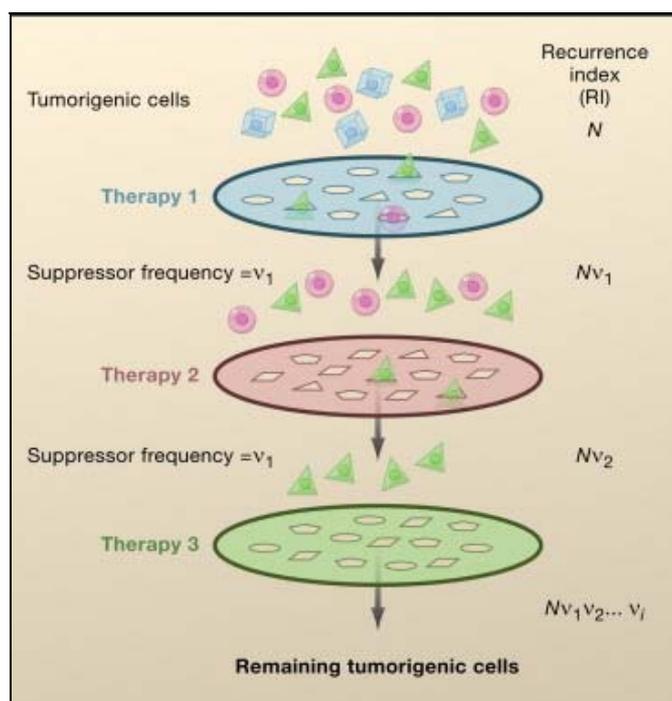


Figura 33. Terapia ortogonale: applicazione di filtri terapeutici sequenziali.

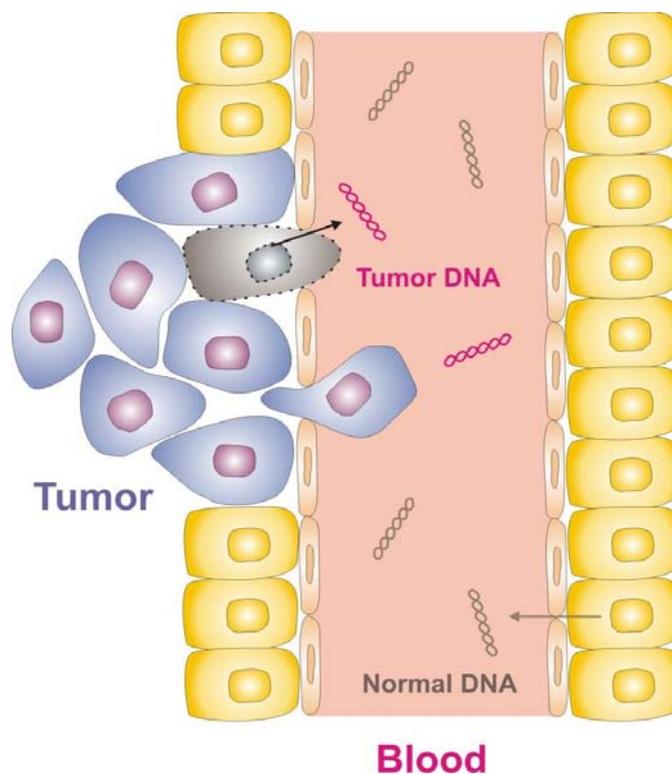


Figura 34. Nel corso della crescita e progressione neoplastica le cellule tumorali muoiono e riversano il loro contenuto nel torrente circolatorio. Inoltre alcune cellule tumorali intatte sono rilasciate in circolo: tali cellule sono definite *circulating tumor cells*.

## Bibliografia

1. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and pathways they control. *Nat Med* 2004;10(8):789-799.
2. Hopkins MM, Ibarreta D, Gaisser S, et al. Putting pharmacogenetics into practice. *Nature biotechnology* 2006;24:403-410.
3. Bardelli A, Velculescu VE. Mutational analysis of gene families in human cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15(1):5-12.
4. Sherr CJ. Cancer Cell Cycles. *Science* 1996;274(5293):1672-1677.
5. Di Nicolantonio F, Arena S, Gallicchio M, et al. Replacement of normal with mutant alleles in the genome of normal human cells unveils mutation-specific drug responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(52):20864-20869.
6. Haber DA, Settleman J. Cancer: Drivers and passengers *Nature* 2007;446:145-146.
7. Cahill DP, Kinzler KW, Lengauer C, et al. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 1999;9(12):M57-60.
8. Downward J. The ins and outs of signalling. *Nature* 2001;411:759-762.
9. [www.cancer.gov/cancerinfo/types/lung](http://www.cancer.gov/cancerinfo/types/lung)
10. Sun S. Lung cancer in never smokers - a different disease. *Nature Reviews Cancer* 2007;7:778-790.
11. Danesi R, De Braud F, Fogli S, et al. Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in NSCLC. *Pharmacol Rev* 2003;55(1):57-103.
12. Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 2008;452(7187):633-637.
13. Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 2008;452(7187):638-642.
14. Hung RJ, Christiani DC, Risch A, et al. International Lung Cancer Consortium: pooled analysis of sequence variants in DNA repair and cell cycle pathways. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2008;17(11):3081-3089.
15. Trusolino L, Comoglio PM. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2(4):289-300.
16. Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008;455(7216):1069-1075.
17. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med* 2008;359(13):1367-1380.
18. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-111.
19. Fine A. Breathing Life into the Lung Stem Cell Field. *Stem Cell* 2009;4(6):468-469.
20. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350(21):2129-2139.
21. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7(3):169-181.
22. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2005;97(9):643-655.
23. Downward J. Targeting RAS and PI3CA in lung cancer. *Nat Med* 2008;14:1315-1316.
24. Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2005;2(1):e17.
25. Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc An Thorac Soc* 2009;6(2):201-205.
26. Motoi N, Riely GJ, Szoke J, et al. Lung adenocarcinoma: modification of the 2004 WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlations between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. *Am J Surg Pathol* 2008;32(6):810-827.
27. Qiu Y, Liu X, Zou W, et al. The Farnesyltransferase Inhibitor R115777 Up-regulates the Expression of Death Receptor 5 and Enhances TRAIL-Induced Apoptosis in Human Lung Cancer Cells. *Cancer Res* 2007;67(10):4973-4980.
28. Weinshilboum R. Inheritance and Drug Response. *N Engl J Med* 2003;348:529-537.
29. EMEA/CPMP Committee for Proprietary Medicinal Products, 2002
30. Relling MV, Dervieux T. Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nature Rev Cancer* 2001;1:99-108.
31. Gurney H, Dodwell D, Thatcher N, et al. Escalating drug delivery in cancer chemotherapy: A review of concepts and practice. *Part 1 Ann Oncol* 1993;4:23-34.
32. Graeber TG, Jacks T, Osmanian C, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996;379:88-90.
33. Hopkins MM, Ibarreta D, Gaisser S, et al. Putting pharmacogenetics into practice. *Nature biotechnology* 2006;24:403-410.
34. Giaccone G, Rodriguez A. What we have learned from treatment of lung cancer. *Nature Clinical Practice Oncology* 2005;2:554-561.
35. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 2003;200(4):429-447.
36. Sessa C, Guibal A, Del Conte G, et al. Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations?. *Nature Clinical Practice Oncology* 2008;5:378-391.
37. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer Stem Cells. *N Engl J Med* 2006;355:1253-1261.

38. Goodman GJ, Gilman W. Le basi farmacologiche della terapia. *McGraw-Hill*, 2006
39. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(3):205-216.
40. Temple RJ. A regulatory authority opinion about surrogate endpoint, Clinical Measurement in Drug Evaluation. *Nimmo WS & Tucker GT*, 1995
41. Merrick BA, Bruno ME. Genomic and proteomic profiling for biomarkers and signature profiles of toxicity. *Curr Opin Mol Ther* 2004;6(6):600-607.
42. Tan AR, Yang X, Hewitt SM, et al. Evaluation of biologic end points and pharmacokinetics in patients with metastatic breast cancer after treatment with erlotinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *J Clin Oncol* 2004;22(15):3080-3090.
43. Arena S, Bardelli A, Benvenuti S. Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005;62(18):2092-2099.
44. Zhang J, Gray NS, Yang PL. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2009;9(1):28-39.
45. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. *N Engl J Med* 2005;353:172-183.
46. Bardelli A, Parsons DW, Silliman N, et al. Mutational Analysis of the Tyrosine Kinome in Colorectal Cancers. *Science* 2003;300(5621):949.
47. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348(11):994-1004.
48. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006;355(23):2408-2417.
49. Ciardiello F, Tortora G. EGFR Antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160-1174.
50. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes - the Achilles heal of cancer. *Science* 2002;297:63-64.
51. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008;358:502-511.
52. Johnson BE, Jänne PA. Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2005;65:7525-7529.
53. Linardou H, Dahabreh I, Bafaloucos DJ, et al. Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6(6):352-366.
54. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2008;9(10):962-972.
55. Sos ML, Koker M, Weir BA, et al. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res* 2009;69(8):3256-3261.
56. Varella-Garcia M, Mitsudomi T, Yatabe Y, et al. EGFR and HER2 genomic gain in recurrent non-small cell lung cancer after surgery: impact on outcome to treatment with gefitinib and association with EGFR and KRAS mutations in a Japanese cohort. *J Thorac Oncol* 2009;4(3):318-325.
57. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-1500.
58. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(6):2070-2075.
59. Toyooka S, Date H, Uchida A, et al. The epidermal growth factor receptor D761Y mutation and effect of tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2007;13(11):3431.
60. Shimamura T, Li D, Ji H, et al. Hsp90 inhibition suppresses mutant EGFR-T790M signaling and overcomes kinase inhibitor resistance. *Cancer Res* 2008;68(14):5827-5838.
61. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316(5827):1039-1043.
62. Tang Z, Du R, Jiang S, et al. Dual MET-EGFR combinatorial inhibition against T790M-EGFR-mediated erlotinib-resistant lung cancer. *Br J Cancer* 2008;99(6):911-922.
63. Cipriani NA, Abidoye OO, Vokes E, et al. MET as a target for treatment of chest tumors. *Lung Cancer* 2009;63(2):169-179.
64. Johnson BE, Jackman D, Jänne PA. Rationale for a phase I trial of erlotinib and the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) for patients with relapsed non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(15):s4628-4631.
65. Soria JC, Shepherd FA, Douillard JY, et al. Efficacy of everolimus (RAD001) in patients with advanced NSCLC previously treated with chemotherapy alone or with chemotherapy and EGFR inhibitors. *Ann Oncol* 2009;10:1093.
66. Engelman JA, Chen L, Tan X, et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med* 2008;14(12):1351-1356.
67. Mahoney CL, Choudhury B, Davies H, et al. LKB1/KRAS mutant lung cancers constitute a genetic subset of NSCLC with increased sensitivity to MAPK and mTOR signalling inhibition. *Br J Cancer* 2009;100(2):370-375.

68. Seto T, Funai H, Higashiyama M, et al. Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006;53(1):91-96.
69. Hu M, Yang JL, Teng H, et al. Anti-angiogenesis therapy based on the bone marrow-derived stromal cells genetically engineered to express sFlt-1 in mouse tumor model. *BMC Cancer* 2008;23(8):306.
70. Naumov GN, Nilsson MB, Cascone T, et al. Combined vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) blockade inhibits tumor growth in xenograft models of EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res* 2009;15(10):3484-3494.
71. Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet* 2009;373(9674):1525-1531.
72. Saijo N, Takeuchi M, Kunitoh H, et al. Reasons for response differences seen in the V15-32, INTEREST and IPASS trials. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6(5):287-294.
73. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009
74. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial). *J Clin Oncol* 2003;21(12):2237-2246.
75. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 2003;290(16):2149-2158
76. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005;353(2):123-132.
77. Lee DH, Kim SW, Suh C, et al. Phase II study of erlotinib as a salvage treatment for non-small-cell lung cancer patients after failure of gefitinib treatment. *Ann Oncol* 2008;19(12):2039-2042.
78. Spigel DR, Lin M, O'Neill V, et al. Final survival and safety results from a multicenter, open-label, phase 3b trial of erlotinib in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2008;112(12):2749-2755.
79. Raso Mg, Wistuba II. Molecular pathogenesis of early stage Non-small Cell Lung Cancer and a proposal for tissue banking to facilitate identification of new biomarkers. *J Thoracic Oncol* 2007;2(7):S128-S135.
80. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124(4):619-626.
81. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of Cancer Therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 2009;136:823-837.
82. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008;4(9):985-990.
83. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
84. Hubbard SR. Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Cell Mol Biol* 2004;5:464-470.
85. Braakhuis BJM, Kummer A, Tabor MP, et al. A Genetic Explanation of Slaughter's Concept of Field Cancerization-Evidence and Clinical Implications. *Cancer Research* 2003;63:1727-1730.
86. Hynes NE, Lane HA. ERBB Receptors and Cancer: The Complexity of Targeted Inhibitors: ERBB-Receptor Transactivation in Cancer. *Nature Rev Cancer* 2005;5(5):341-354.
87. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics - Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects. *N Engl J Med* 2003;348:538-549.
88. Evans WE, Relling MV. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* 2004;429:464-468.