

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

ONCOLOGIA, EMATOLOGIA E PATOLOGIA

Ciclo 35

Settore Concorsuale: 06/D3 - MALATTIE DEL SANGUE, ONCOLOGIA E REUMATOLOGIA

Settore Scientifico Disciplinare: MED/06 - ONCOLOGIA MEDICA

**RUOLO DELLE TECNICHE DI SEQUENZIAMENTO DI ULTIMA
GENERAZIONE NELLA GESTIONE DEI PAZIENTI CON CARCINOMA
COLORETTALE METASTATICO**

Presentata da: Laura Matteucci

Coordinatore Dottorato

Manuela Ferracin

Supervisore

Giovanni Luca Paolo Frassinetti

Co-supervisore

Maria Abbondanza Pantaleo

Esame finale anno 2023

INDICE

| | |
|---|----|
| 1 ABSTRACT..... | 3 |
| 2 INTRODUZIONE..... | 4 |
| 3 PARTE GENERALE: STORIA NATURALE E GESTIONE TERAPEUTICA DEL TUMORE DEL COLON RETTO METASTATICO..... | 6 |
| 3.1 Epidemiologia..... | 6 |
| 3.2 Fattori di rischio e screening | 10 |
| 3.3 Presentazione clinica, diagnosi e stadiazione | 12 |
| 3.4 Carcinogenesi | 12 |
| 3.5 Caratterizzazione molecolare..... | 17 |
| 3.5.1 Analisi stato mutazionale <i>KRAS</i> e <i>NRAS</i> | 20 |
| 3.5.2 Analisi stato mutazionale <i>BRAF</i> | 20 |
| 3.5.3 Analisi microsatelliti | 21 |
| 3.5.4 Potenziali biomarkers predittivi e bersagli terapeutici..... | 22 |
| 3.6 Trattamento di prima linea e linee successive..... | 22 |
| 3.6.1 Algoritmo di scelta della prima linea di trattamento | 24 |
| 3.6.2 Terapia di mantenimento e trattamenti dopo la prima linea..... | 28 |
| 4 PARTE SPERIMENTALE..... | 31 |
| 4.1 Introduzione e rationale | 31 |
| 4.2 Obiettivi | 32 |
| 4.3 Materiali e Metodi..... | 33 |
| 4.3.1 Popolazione oggetto dello studio..... | 33 |
| 4.3.2 Analisi molecolari..... | 34 |
| 4.4 Analisi statistica | 35 |
| 4.5 Risultati..... | 36 |
| 4.5.1 Caratteristiche dei pazienti | 36 |
| 4.5.2 Alterazioni molecolari..... | 42 |
| 4.5.3 Associazione tra i geni mutati e PFS | 44 |
| 4.5.4 Associazione tra i geni mutati e OS..... | 45 |
| 4.5.5 Associazione tra numero di geni mutati e PFS..... | 46 |
| 4.5.6 Associazione tra numero di geni mutati e OS..... | 46 |
| 4.5.7 Associazione tra variazione della frequenza allelica dei geni mutati e PFS..... | 47 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.5.8 | Associazione tra variazione della frequenza allelica dei geni mutati e OS..... | 48 |
| 5 | DISCUSSIONE..... | 51 |
| 6 | CONCLUSIONI..... | 53 |
| 7 | BIBLIOGRAFIA..... | 55 |

1 ABSTRACT

L'utilità clinica dell'uso routinario delle tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) nei pazienti con cancro coloretale metastatico andrebbe approfondita.

In questo studio, è stato valutato l'impatto di un pannello NGS da 52 geni utilizzato nella pratica clinica di routine. Abbiamo analizzato i risultati dei test molecolari multigenici in pazienti con carcinoma coloretale metastatico (mCRC) in uno studio osservazionale, retrospettivo e monocentrico su pazienti affetti da carcinoma coloretale metastatico consecutivamente testati presso un centro oncologico italiano tra giugno 2019 e dicembre 2020. Le analisi di sopravvivenza sono state effettuate con il metodo Kaplan-Meier, test log-rank e modello di Cox.

Complessivamente sono stati inclusi 179 pazienti con mCRC. Il follow-up mediano è stato di 33 mesi (IQR: 28,45–NR). I quattro geni più frequentemente mutati sono stati: KRAS (48,6%), PIK3CA (22,4%), BRAF (14,5%) e APC (8,4%). È stata trovata un'associazione positiva tra la sopravvivenza globale (OS) e le mutazioni KRAS con un'alta frequenza allelica variante (VAF) [HR: 2,62 (1,59-4,32), $P < 0,001$]. La mutazione BRAF era associata a OS inferiore [HR: 2,62 (1,59-4,32), $P < 0,001$]. Il pannello NGS ha consentito a otto pazienti di accedere a terapie a bersaglio molecolare non ancora registrate per il cancro coloretale.

In conclusione, i pannelli NGS in mCRC sono fattibili nella pratica clinica in laboratori di riferimento per consentire un impatto inferiore sui costi e un aggiornamento regolare. La mutazione di BRAF risulta associata a una prognosi peggiore. Le mutazioni di KRAS con un'elevata variazione di frequenza allelica erano associate a una sopravvivenza globale superiore rispetto ai pazienti KRAS non mutati. Sono necessari studi più approfonditi per analizzare meglio i fattori prognostici.

2 INTRODUZIONE

Il tumore del colon retto è una delle neoplasie più comuni, rappresentando globalmente il quarto tumore più diagnosticato nel mondo, al terzo posto per incidenza negli uomini e al secondo posto nelle donne. Il cancro coloretale è la terza causa di morte per tumore nel mondo considerando globalmente uomini e donne.

L'incidenza di nuovi casi e la mortalità sono stati costantemente in declino negli ultimi anni sia negli uomini che nelle donne a causa del miglioramento nelle procedure di screening e nelle strategie terapeutiche. Importante sottolineare come il declino globale dell'incidenza del tumore del colon retto mascheri in realtà i tassi di incidenza in incremento fra gli adulti < 65 anni.

Nel 25% circa dei casi si presenta in fase metastatica già alla diagnosi. In questo setting, i trattamenti sistemici sono considerati lo standard.

Negli ultimi dieci anni, l'introduzione di anticorpi anti-EGFR (cetuximab e panitumumab) per i pazienti con tumori RAS wild-type (WT) e agenti antiangiogenici (bevacizumab , aflibercept e ramucirumab) in associazione alla chemioterapia ha migliorato significativamente i risultati, estendendo il mOS a quasi 30 mesi. Recentemente, l'inibitore multichinasi regorafenib e la nuova fluoropirimidina orale TAS-102 hanno dimostrato efficacia nei pazienti chemiorefrattari. L'immunoterapia si è rivelata efficace nel trattamento dei tumori del colon-retto metastatici con instabilità dei microsatelliti sia in prima linea che nelle linee successive, ma complessivamente rappresentano solo circa il 5% dei casi totali. La mutazione BRAF infine, presente in circa il 10% dei pazienti con carcinoma del coloretale metastatico, è l'unica che recentemente si è dimostrata druggable. Tuttavia la prognosi dei pazienti che falliscono le terapie standard rimane tuttavia scarsa.

Da tali premesse emerge la necessità di approfondire le conoscenze di biologia molecolare relative ai carcinomi coloretali, valutando la presenza di eventuali alterazioni a carico delle numerose pathway molecolari associate alla cancerogenesi, oltre a verificare le già note alterazioni molecolari di geni quali KRAS, NRAS, BRAF. Inoltre occorre individuare strategie terapeutiche più mirate ed efficaci per i carcinomi coloretali in fase avanzata refrattari ai trattamenti standard.

Negli ultimi anni il progredire della tecnologia in ambito molecolare ha consentito lo sviluppo e diffusione di nuove piattaforme basate sul sequenziamento genico massivo di nuova generazione o Next Generation Sequencing (NGS) che ha permesso di passare da una strategia a singolo gene/test a una multi-gene/multi-test. Tuttavia, rimane ancora da definire il ruolo dell'utilizzo della tecnologia NGS nella diagnostica molecolare di routine e nella pratica clinica.

L'obiettivo principale del progetto è valutare la correlazione con i parametri di sopravvivenza (PFS sopravvivenza libera da progressione e OS sopravvivenza globale) delle alterazioni molecolari rilevate con pannello NGS Oncomine Focus Assay, applicato su tessuto tumorale di carcinoma coloretale contenuto in istologici fissati in formalina e inclusi in paraffina (presso il Laboratorio di Bioscienze IRST IRCCS sezione di Diagnostica Avanzata e Predittiva Hub Area Vasta Romagna), al fine di identificare l'eventuale significato prognostico del numero di mutazioni, dei diversi tipi di geni mutati e della variazione delle frequenze alleliche.

Obiettivo secondario è la rilevazione della prevalenza di mutazioni "druggable" o "actionable" che possano servire per lo sviluppo di strategie terapeutiche più mirate ed efficaci per i carcinomi coloretali in fase avanzata.

3 PARTE GENERALE: STORIA NATURALE E GESTIONE TERAPEUTICA DEL TUMORE DEL COLON RETTO METASTATICO

3.1 Epidemiologia

In tutto il mondo l'incidenza e la mortalità del cancro sono in rapida crescita a causa non solo dell'invecchiamento e della crescita della popolazione ma anche a causa di un incremento della prevalenza dei fattori di rischio del cancro, molti dei quali sono associati allo sviluppo socioeconomico. Il cancro è una delle principali cause di morte e un importante ostacolo all'aumento dell'aspettativa di vita in ogni paese del mondo.

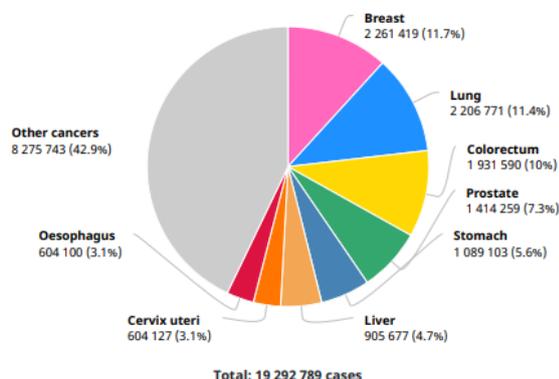
A livello globale nel 2020 sono stati diagnosticati circa 19.3 milioni nuovi casi di cancro (18.1 milioni escludendo i tumori della pelle non melanomatosi) e si sono verificati quasi 10 milioni di decessi per cancro (9.9 milioni escludendo il cancro della pelle non melanoma) secondo le stime GLOBOCAN, sulla base dei dati elaborati dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro IARC. Il tumore mammario femminile è il cancro più comunemente diagnosticato (11.7% dei casi totali), seguito dal tumore al polmone (11.4%), coloretale (10.0%), tumori della prostata (7.3%) e dello stomaco (5.6%). Complessivamente il tumore del polmone, della mammella e del colon-retto (CRC) costituiscono da soli circa un terzo dell'incidenza mondiale dei tumori. Nella popolazione maschile il tumore al polmone risulta essere sia il cancro più frequente e che la principale causa di morte per tumore, seguito per incidenza dal cancro della prostata e dal cancro del colon-retto e per mortalità dal cancro del fegato e del colon-retto. Nelle donne, il cancro al seno è il tumore più comunemente diagnosticato e la causa principale di morte per cancro, seguita dal cancro del colon-retto e del polmone per incidenza e viceversa per mortalità. Indipendentemente dal genere, il cancro coloretale è globalmente al terzo posto in termini di incidenza e al secondo per mortalità (1). [Figura 1]

Colon

Source: Globocan 2020



Number of new cases in 2020, both sexes, all ages



Number of deaths in 2020, both sexes, all ages

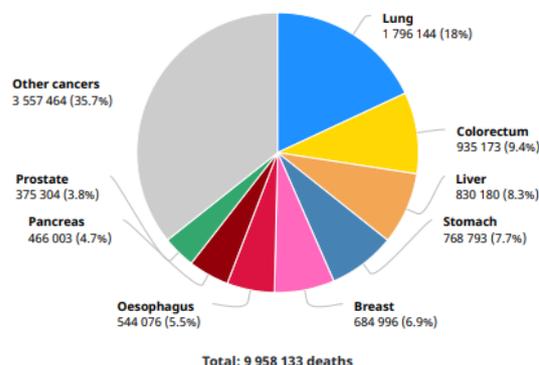


Figura 1 - Incidenza e mortalità CRC. Data source: GLOBOCAN 2020 (1)

La variabilità di incidenza e mortalità dei differenti tipi di tumore nelle diverse aree mondiali risulta influenzata dal livello socio-economico di sviluppo, dai programmi di prevenzione primaria e secondaria e dai fattori di rischio (1-5). Secondo le proiezioni demografiche GLOBOCAN sono attesi globalmente 28.4 milioni di casi di cancro nel 2040 con un aumento del 47% rispetto al 2020. L'incremento stimato è maggiore nei paesi in via di sviluppo (dal 64% al 95%) rispetto ai paesi più sviluppati (dal 32% al 56%) a causa dei cambiamenti demografici e dell'aumento dei fattori di rischio associati alla globalizzazione e alla crescita economica.

Per quanto riguarda il cancro del colon-retto, che complessivamente risulta al terzo posto in termini di incidenza e al secondo posto per mortalità, i tassi di incidenza sono circa quattro volte superiori nei paesi a basso indice di sviluppo umano (Human Development Index, HDI) rispetto ai paesi più avanzati mentre i tassi di mortalità sono simili a causa della maggiore mortalità presente nei paesi più arretrati. Il tumore coloretto può essere considerato un marker di sviluppo socio-economico, i tassi di incidenza tendono infatti ad aumentare uniformemente all'aumento

dell'indice di sviluppo umano nei paesi emergenti come ad esempio in molti paesi dell'Europa orientale e sud-orientale, in Asia centro-meridionale e Sud America. Tale incremento di incidenza probabilmente riflette, nei paesi precedentemente a basso rischio e con un indice di sviluppo umano inferiore (basso o medio HDI), cambiamenti nei fattori di rischio correlati allo stile di vita e alla dieta spostamenti verso una maggiore assunzione di alimenti di origine animale e una vita più sedentaria stile di vita, che porta a una diminuzione dell'attività fisica e una maggiore prevalenza di eccesso di peso corporeo, che sono indipendenti associato al rischio di cancro del colon-retto. Ulteriori fattori di rischio includono inoltre un consumo eccessivo di alcol, il fumo di sigaretta e il consumo di carni rosse o lavorate mentre un consumo adeguato di cereali integrali, fibre e latticini sembrano ridurre il rischio. La prevenzione primaria rimane la strategia chiave per ridurre l'aumento globale del cancro colonrettale.

Il calo dell'incidenza del cancro del colon-retto in alcuni paesi storicamente ad alta incidenza è stato attribuito all'adozione di stili di vita più sane (p. es., diminuzione del fumo) e all'attivazione su larga scala dei programmi di screening, sebbene i progressi accelerati dall'inizio degli anni 2000 siano principalmente attribuiti a aumento dello screening della colonscopia e della rimozione delle lesioni precursori.

Tuttavia in alcuni paesi sviluppati (Stati Uniti, Canada e Australia) la riduzione dei tassi di incidenza negli adulti di età ≥ 50 anni maschera l'incremento di diagnosi di carcinoma coloretale nella popolazione adulta con età < 50 anni, caratterizzata da un aumento dell'incidenza che varia dall'1% al 4% per anno. Le cause di questo incremento di incidenza nelle coorti di giovani adulti non sono ben chiare e potrebbero essere riconducibili a fattori di rischio legati allo stile di vita (abitudini voluttuarie come fumo e consumo di alcol, obesità, sedentarietà) anche se sono necessarie ulteriori ricerche per chiarire gli specifici fattori causali sottostanti. Infatti le informazioni

attualmente disponibili sui fattori di rischio si basano quasi esclusivamente sui dati ricavati dalle coorti più anziane (1).

In Europa il tumore del colon-retto rappresenta la terza neoplasia in termini di frequenza fra le neoplasie diagnosticate negli uomini rappresentando il 13.2% del totale dei tumori, preceduto dal tumore del polmone (14.8%) e della prostata (22.2%), mentre rappresenta la seconda neoplasia diagnosticata nelle donne (12.4%) dopo il tumore della mammella (27.8%). Nelle statistiche di mortalità i tumori del colon-retto risultano al secondo posto per frequenza nella popolazione maschile (12.3%), dopo il tumore del polmone (24.2%), mentre nella popolazione femminile risultano al terzo posto (13.0%), dopo il tumore della mammella(16.4%) e del polmone(14.3%).

Nell'ambito dell'Italia tutti i dati relativi alla patologia tumorale sono disponibili ad opera dei Registri dell'Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM), variamente dislocati sul territorio, con una prevalenza maggiore nelle aree settentrionali. Nella presente tesi vengono utilizzati a scopo epidemiologico descrittivo i dati relativi alle popolazioni coperte dai registri tumori italiani e standardizzate per età. Il termine "tumori del colon-retto" comprende le neoplasie del colon (ICD-9 153), e quelle del retto, della giunzione retto-sigmoidea e dell'ano (ICD-9 154).

In Italia il cancro colo-rettale (CRC) risulta complessivamente il secondo tumore per incidenza sia tra i maschi (15% di tutti i nuovi tumori) che tra le femmine (13%), preceduto rispettivamente dal tumore della prostata e della mammella. La sopravvivenza a 5 anni in Italia è pari al 66% per il colon e al 62% per il retto, senza alcuna differenza di genere. Le Regioni del Sud Italia presentano indici di sopravvivenza inferiori di circa il 6% rispetto al Centro-Nord sia nella popolazione maschile che in quella femminile (2).

3.2 Fattori di rischio e screening

La patogenesi del tumore del colon retto è altamente complessa ed è indotta da numerosi fattori di rischio. Il tumore del colon può essere sporadico (70% dei casi), a predisposizione familiare (20-25%) o legato a sindromi ereditarie (5-10%).

Nel caso del tumore sporadico l'età media alla diagnosi è superiore ai 50 anni e la sua insorgenza è più frequentemente legata a fattori ambientali e stili di vita quali: basso livello socioeconomico, sovrappeso e obesità, vita sedentaria, consumo di carni rosse/processate, diete ad alto contenuto di grassi e a basso contenuto di fibre, abuso alcolico, tabacco. Altri fattori di rischio non ereditari associati all'insorgenza del tumore del colon retto sono: età superiore ai 50 anni, malattie infiammatorie croniche intestinali, diabete mellito e insulinoresistenza, acromegalia, trapianto renale con immunosoppressione di lunga durata, terapie androgene deprivative, colecistectomia, storia personale o familiare di polipi del colon o di tumore del colon, pregressa irradiazione in regione pelvica.

Le più comuni sindromi ereditarie di tumore del colon retto sono la poliposi adenomatosa familiare (FAP) e la sindrome di Lynch (o sindrome del carcinoma colon-rettale non associato a poliposi, HNPCC) (3,4). La FAP è un disordine genetico autosomico dominante caratterizzato dallo sviluppo di centinaia fino a migliaia di polipi in epoca giovanile. Il gene responsabile di tale forma ereditaria è il gene oncosoppressore APC che codifica per una proteina la cui funzione è critica per l'integrità del citoscheletro, l'adesione e la migrazione della cellula dell'epitelio intestinale. I pazienti affetti da tale sindrome hanno una mutazione germinale in uno degli alleli del gene oncosoppressore APC che è responsabile della formazione dei polipi adenomatosi e, nel corso degli anni, mutazioni somatiche a carico dell'allele normale del gene APC determinano la trasformazione neoplastica dei polipi.

La sindrome di Lynch è una malattia autosomica dominante che si caratterizza nello stesso nucleo familiare per l'alta incidenza di carcinomi colon-rettali insorgenti in età giovanile e per l'assenza di polipi. Nei casi di sindrome di Lynch di tipo I la malattia è localizzata esclusivamente al colon destro, mentre nella sindrome di Lynch di tipo II vi è un rischio aumentato di altre neoplasie associate (carcinoma dell'endometrio, vie urinarie, mammella, stomaco e pancreas). La sindrome di Lynch è causata da una mutazione nella linea germinale in uno dei geni del complesso del Mismatch Repair (MMR) che codificano per enzimi che sono deputati alla riparazione degli errori durante la replicazione del DNA. A causa di tali mutazioni, la cellula sviluppa un fenotipo ipermutato, caratterizzato da profonda instabilità genomica che determina l'accumulo di mutazioni in sequenze di DNA definite microsatelliti (5).

Lo Screening Organizzato per il cancro del colon retto è un programma di intervento di salute pubblica sulla popolazione a rischio medio per età, che riduce la mortalità per CRC attraverso l'esecuzione di test mirati all'individuazione ed alla rimozione di polipo o alla diagnosi precoce di CRC. Esistono studi randomizzati che hanno dimostrato che la ricerca del sangue occulto fecale (RSOF) e la rettosigmoidoscopia (RSS) sono due test di provata efficacia nel ridurre la mortalità per CRC del 22% e del 28% rispettivamente, rispetto a chi non esegue il test. La RSOF è sicuramente la metodica di test più accettabile, ma dotata di bassa sensibilità e deve essere ripetuta almeno ogni due anni affinché lo screening sia efficace. Se risulta positiva, deve essere eseguita una colonscopia totale (6-10). Per quel che riguarda la colonscopia, questa metodica ha una maggiore sensibilità diagnostica rispetto alla RSS a scapito però di una ridotta accettabilità. Inoltre, le prove di una sua efficacia in termini di riduzione di mortalità per CRC sono indirette e derivano da studi osservazionali (11). In Italia gran parte del territorio è coperto da programmi di screening prevalentemente con la RSOF eseguita ogni due anni tra i 50 e i 69 anni o la RSS una sola volta nella vita tra i 55 ed i 64 anni (12-13). I soggetti ad alto rischio di CRC per patologie benigne del

colon devono seguire programmi di sorveglianza ad hoc in base a linee guida gastroenterologiche (14).

3.3 Presentazione clinica, diagnosi e stadiazione

La presentazione sintomatica riflette di solito un tumore relativamente avanzato. In questi casi i sintomi principali sono: sanguinamento rettale, dolore addominale, anemia, alterazioni dell'alvo, distensione addominale. In alcuni casi la diagnosi viene effettuata in seguito a chirurgia in urgenza per occlusione intestinale. In altri casi la diagnosi viene posta in assenza di sintomi in seguito ad esami di screening o riscontro incidentale ed è questo il caso della maggior parte dei pazienti con tumore del colon in stadio iniziale. I siti metastatici più comuni sono: i linfonodi locoregionali, il fegato, i polmoni e il peritoneo. Il sospetto diagnostico di tumore del colon retto si pone di solito in base alla presenza di uno o più sintomi sopra descritti oppure può essere formulato in pazienti asintomatici in seguito a screening di routine. La colonscopia è da ritenersi il gold standard diagnostico poiché consente di ottenere la diagnosi istologica e di localizzare e biopsiare lesioni lungo tutto il decorso dell'intestino. Una volta stabilita la diagnosi di tumore del colon retto, occorre determinare l'estensione locale e a distanza della malattia tramite l'esecuzione di TC torace addome con mdc. Il sistema di stadiazione ad oggi utilizzato è il TNM.

3.4 Carcinogenesi

Sia alterazioni genetiche che epigenetiche sono coinvolte nella regolazione della tumorigenesi del tumore del colon retto. La sequenza che prevede la trasformazione del normale epitelio del colon alla lesione precancerosa (adenoma) e infine al carcinoma invasivo attraverso un accumulo di

mutazioni genetiche o somatiche (acquisite) e/o germinali (ereditarie) fu descritta per la prima volta negli anni '80. Le evidenze cliniche hanno mostrato che il tumore del colon retto spesso origina da polipi adenomatosi che acquisiscono cambiamenti displastici in un periodo di 10-15 anni prima di sviluppare un carcinoma invasivo (15). Tuttavia, negli ultimi anni, nuove evidenze hanno dimostrato che alcuni tipi di polipi iperplastici, in assenza quindi di neoplasia intraepiteliale, sono di fatto precursori di lesioni cosiddette di tipo "serrato" che possono sfociare in trasformazione carcinomatosa (16,17). La cancerogenesi del tumore del colon è legata a tre principali meccanismi di trasformazione, ovvero l'instabilità cromosomica (CIN), l'instabilità dei microsatelliti (MSI) e l'ipermetilazione (18) [Figura 2].

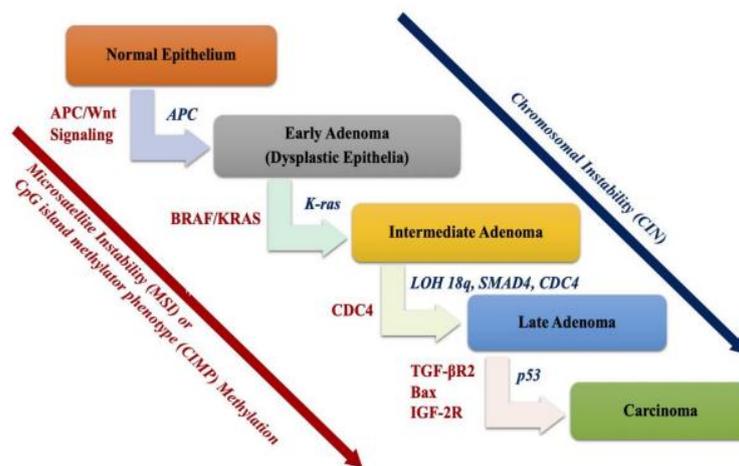


Figura 2 - Modello genetico multistep per sviluppo adenocarcinoma coloretale (18)

L'instabilità cromosomica (CIN) è la più comune instabilità genetica nel tumore del colon retto e si riferisce ad un significativo incremento nel guadagno o nella perdita o di un'intera o di una larga porzione di cromosomi. CIN è riscontrata nell'85% delle transizioni tumorali ed è caratterizzata dall'attivazione di oncogeni (es. *KRAS* e *BRAF*), dall'inattivazione di geni oncosoppressori (*APC* e *TP53*) e dalla perdita di eterozigosi del braccio lungo del cromosoma 18, eventi che promuovono la

tumorigenesi del CRC (19,20). In relazione al modello multi step definito da Fearon e Vogelstein, il primo passo nella tumorigenesi comprende il silenziamento di *APC*, seguito dalla mutazione dell'oncogene *KRAS* (nella fase di adenoma) e infine, dalla delezione del cromosoma 18 e inattivazione di *TP53* che avvengono durante la fase di transizione in malignità (15). La perdita dell'attività di *APC* porta all'attivazione del pathway di segnale Wnt e all'attivazione di geni regolati da questo pathway che sono associati alla tumorigenesi, come *MYC*, il gene cyclin D1 (*CCND1*) e i geni vascular endothelial growth factor (*VEGF*) (21).

I VEGFs (vascular endothelial growth factors) sono fattori coinvolti nell'angiogenesi, ovvero nello sviluppo di nuovi vasi sanguigni, che prende parte ai processi di iniziazione, di crescita tumorale e di metastatizzazione. Nel tumore del colon retto, i livelli di VEGF e l'attività di VEGFR sono aumentati e sono associati a prognosi peggiore. Elevati livelli di VEGF si evidenziano già negli stadi precoci di neoplasia coloretale (adenoma) e sono comunque significativamente elevati negli stadi avanzati di malattia (22,23). Il pathway di segnale Wnt è attivo in quasi tutti i tumori CIN e le mutazioni di *APC* sono identificate in circa l'80% di questi tumori. Le mutazioni di altri geni regolati dal pathway Wnt, come *AXIN1*, *AXIN2* o *CTNNB1*, possono amplificare il segnale Wnt, in assenza di mutazione di *APC* (24). Le mutazioni attivanti *KRAS* spesso originano dopo le mutazioni di *APC* e sono presenti in circa il 40% dei tumori del colon retto, giocando un ruolo significativo nella transizione da adenoma a carcinoma (25). *KRAS* è un componente di molti pathways di segnale di fattori di crescita, incluso il pathway di EGFR (epidermal growth factor receptor). L'aumentata espressione di EGFR è presente nel 25-75% dei tumori del colon retto e la sua attivazione innesca a cascata molteplici pathways di segnale intracellulare, inclusi i pathways RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT e JAK/STAT3 che regolano la crescita, la sopravvivenza e la migrazione delle cellule (26) [Figura 3].

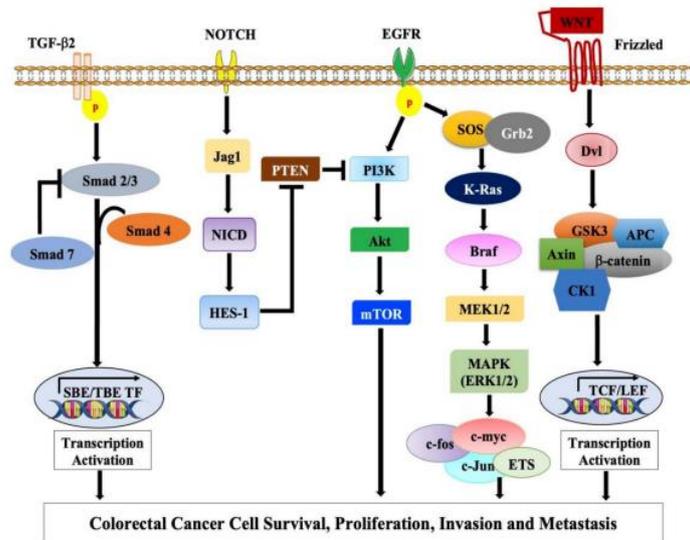


Figura 3 - Pathways coinvolti nella patogenesi del CRC (18)

Alcuni tumori del colon retto con mutazione di KRAS contengono anche mutazioni nel gene PIK3CA (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha). Le mutazioni attivanti PIK3CA insorgono tardi nella sequenza adenoma-carcinoma e si ritrovano nel 10-20% dei tumori del colon retto. Esse attivano la via AKT/MTOR che agisce promuovendo la proliferazione cellulare (27). Il gene TP53 è il gene più comunemente mutato nei tumori. Il suo prodotto, p53, regola la trascrizione dei geni che regolano la riparazione del DNA e le risposte cellulari allo stress ossidativo. Le alterazioni con perdita di funzione di p53 sono riscontrate più frequentemente nei tumori rispetto agli adenomi con foci microscopici di cancro invasivo e più frequentemente negli adenomi invasivi rispetto agli adenomi benigni, ad indicare che tale alterazione promuove lo sviluppo tumorale in una fase avanzata della tumorigenesi. Circa il 60% dei tumori CIN contiene mutazioni inattivanti di TP53 (28). I dati hanno mostrato un'associazione fra mutazioni germinali di TP53 e l'insorgenza di tumori del colon retto in giovane età (diagnosi in pazienti <50 anni), dato da tenere in considerazione in quanto i casi di tumore del colon retto in giovane età sono aumentati

notevolmente in USA, Europa e Asia, in contrasto con la riduzione di incidenza nelle altre fasce di età (29).

L'instabilità dei microsatelliti (microsatellite instability, MSI) è una caratteristica distintiva delle cellule neoplastiche. I microsatelliti, corte sequenze di DNA ripetute da 15 a 30 volte e disperse nel genoma umano, proprio per la loro natura, sono maggiormente esposti a variazioni della loro lunghezza durante la replicazione a causa dell'efficacia decrescente della DNA polimerasi. Le mutazioni dei geni del complesso del mismatch repair (MMR), ovvero *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, causano l'instabilità all'interno delle regioni microsatellitari: infatti, in assenza di mutazioni dei geni del MMR, il sistema di riparazione riconosce gli errori e li ripara prima della replicazione, mentre il mancato funzionamento del sistema di riparazione MMR impedisce la correzione di questi errori favorendo l'instabilità delle sequenze microsatellitari. Il sottogruppo di tumori con loci instabili >30% è classificato come "microsatellite instability high" (MSI-H), il sottogruppo di tumori con loci instabili tra il 10 e 29% viene definito come "microsatellite instability low" (MSI-L) e i tumori "microsatellite stable" (MSS) non presentano loci instabili (30). MSI è riscontrata in circa il 15% dei tumori del colon retto sporadici e la causa più comune del fenotipo MSI è il silenziamento epigenetico del gene *MLH1* attraverso l'ipermetilazione del promotore (31). I tumori MSI hanno un'aumentata frequenza di mutazioni di *BRAF V600E*, ma una frequenza minore di mutazioni di *APC* e *TP53* rispetto ai tumori che si sviluppano attraverso il pathway CIN. Il gene *TGFBR2* (TGFB receptor-2 gene) che codifica per una proteina che previene la proliferazione cellulare è mutato in più del 90% dei tumori del colon retto MSI (32). La regolazione epigenetica dell'espressione dei geni è definita dalla presenza di cambiamenti ereditabili in assenza di alcuna alterazione nella sequenza del DNA. Questi cambiamenti epigenetici giocano un ruolo importante nella carcinogenesi di molti tumori, incluso quello del colon retto. Le principali cause di alterazioni epigenetiche sono le modificazioni degli istoni e la metilazione del DNA. La metilazione del DNA è

l'aggiunta di un gruppo metile alla citosina nella posizione 5'. L'instabilità epigenetica nel tumore del colon retto è caratterizzata dall'ipermetilazione delle regioni promotrici dei geni (loci che contengono isole CpG), condizione che conduce all'inattivazione dei geni oncosoppressori, ed è di solito accompagnata dall'ipometilazione globale del DNA, che è associata a instabilità genomica e aberrazioni cromosomiche. Le alterazioni del pattern della metilazione possono virtualmente coinvolgere tutti i pathways di segnale, inclusi TP53, TGFbeta/SMAD, Wnt, NOTCH e i recettori tirosin chinasi coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e della trascrizione, nella stabilità del DNA, nell'apoptosi, nell'adesione cellula-cellula, nell'angiogenesi, nell'invasione cellulare e metastatizzazione (33, 34).

Questo distinto sottotipo di tumore del colon, conosciuto come fenotipo CIMP (CpG island methylator phenotype), è sotto classificato in CIMP-0, CIMP-low e CIMP-high sulla base dell'instabilità genetica ed epigenetica integrata. Diverse analisi hanno dimostrato che circa il 20% dei tumori del colon sono tumori CIMP e che, dal punto di vista clinico, questi sono significativamente correlati con età, sesso femminile e localizzazione al colon prossimale. Dal punto di vista molecolare, i tumori CIMP hanno mostrato avere una più alta prevalenza di mutazioni di *BRAF V600E* e *PIK3CA* e di avere più frequentemente uno stato MSI (35,36).

3.5 Caratterizzazione molecolare

Il carcinoma del colon retto è una malattia estremamente eterogenea dal punto di vista genetico-molecolare. Un'analisi comprensiva delle mutazioni in 276 tumori coloretali condotta dal Cancer Genome Atlas Network ha rivelato che, tra tutte le neoplasie, i tumori del colon retto sono fra quelli che hanno il più alto carico mutazionale (37). Da sottolineare come, fra tutte le mutazioni riscontrate, solo il 20% siano mutazioni driver di malattia. Molti studi hanno cercato di definire una

classificazione molecolare dei tumori del colon retto, ma nessuno di questi ha condotto ad una singola classificazione sistematica. Nello specifico, due diverse classificazioni sono state proposte: una nel 2012 dal The Cancer Genome Atlas (TCGA) e un'altra nel 2015 dal Consortium Consensus Molecular Subtype (CMS). La vecchia classificazione del TCGA suddivide i tumori del colon retto in due sottotipi caratterizzati da specifiche morfologia e alterazioni molecolari: 1) tumori ipermutati (16% dei casi): la maggior parte dei quali caratterizzati da stato MSI-H e la restante parte caratterizzata da mutazioni di polimerasi-E (POLE). 2) tumori non-ipermutati (84% dei casi): caratterizzati da MSS e da frequenti mutazioni nei geni *APC*, *TP53*, *KRAS*, *SMAD4* e *PIK3CA* (37). Nel 2015 un consorzio internazionale ha analizzato una condivisione di dati su larga scala, con l'obiettivo di stabilire una nuova classificazione molecolare universale. Questa analisi dei profili di espressione genica ha consentito di individuare quattro sottotipi molecolari di carcinoma del colon retto (CMS1, CMS2, CMS3 e CMS4) con differenti caratteristiche genetico-molecolari e, soprattutto, diversa prognosi (38).

1) CMS1 (sottotipo immune MSI, 14%): quasi tutti i pazienti con MSI sono raggruppati in questo gruppo caratterizzato da un profilo ipermutato, soprattutto nel gene *MLH1*, e alti livelli di mutazioni di *BRAF*. I pazienti nel gruppo CMS1 sono caratterizzati da una maggiore espressione di geni associati ad un infiltrato immunitario diffuso. Dal punto di vista clinico, il sottotipo CMS1 è stato riscontrato essere più comune nelle donne, associato a gradi di differenziazione istologica più elevati e a lesioni del colon destro.

2) CMS2 (sottotipo canonico, 37%): questo gruppo include pazienti con più alta instabilità cromosomica (CIN) e frequenti alterazioni del numero di copie di oncogeni e oncosoppressori. In questo sottogruppo vi è una forte up-regolazione del pathway di Wnt e i tumori CMS2 sono più frequentemente localizzati nel colon sinistro.

3) CMS3 (sottotipo metabolico, 13%): questo gruppo è caratterizzato dalla disregolazione di molti pathways metabolici, CIN con minori alterazioni del numero di copie, più alta prevalenza di fenotipo CIMP-low e più alto numero di mutazioni di KRAS in confronto agli altri sottotipi.

4) CMS4 (sottotipo mesenchimale, 23%): questo gruppo è caratterizzato da alta instabilità cromosomica e incrementati livelli di alterazioni del numero di copie, con forte espressione dei geni coinvolti nella transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e attivazione del pathway di TGFbeta. I tumori CMS4 molto frequentemente iperesprimono proteine che sono implicate nell'infiltrazione stromale e nell'angiogenesi. Questo sottotipo è spesso diagnostico nelle fasi avanzate di malattia rispetto agli altri sottotipi (38, 39).

La caratterizzazione molecolare ha un ruolo fondamentale nella programmazione terapeutica dei pazienti con malattia metastatica. Infatti, in tutti i pazienti con neoplasia del colon retto metastatica, al momento di intraprendere un trattamento di prima linea, deve essere effettuata la valutazione dello stato mutazionale dei geni *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* e dello stato dei microsatelliti al fine di definire la migliore strategia terapeutica. Le analisi molecolari vengono effettuate da pratica clinica sul tessuto tumorale e, in considerazione dell'alta concordanza tra le mutazioni riscontrate, la determinazione dello status mutazionale può essere effettuata indifferentemente su tessuto tumorale primitivo o metastasi (40,41). Negli ultimi anni il progredire della tecnologia in ambito molecolare ha consentito lo sviluppo e diffusione di nuove piattaforme basate sul sequenziamento genico massivo di nuova generazione o Next Generation Sequencing (NGS) che ha permesso di passare da una strategia a singolo gene/test a una multi-gene/multi-test. Tuttavia, rimane ancora da definire il ruolo dell'utilizzo della tecnologia NGS nella diagnostica molecolare di routine e nella pratica clinica.

3.5.1 Analisi stato mutazionale *KRAS* e *NRAS*

È noto ormai da tempo che la presenza di mutazioni somatiche nei geni *KRAS* e *NRAS* è presente in circa il 60% dei carcinomi del colon retto e rappresenta un meccanismo di resistenza ai farmaci anti-EGFR (42). Questa ipotesi è stata confermata in una serie di studi clinici dapprima limitatamente alla mutazione dell'esone 2 di *KRAS* (codoni 12 e 13): in questi studi è stato dimostrato il vantaggio della somministrazione di farmaci anti-EGFR in associazione alla chemioterapia solo nei casi *KRAS* wild type (43-45). Successivamente, altri studi hanno valutato l'impatto delle altre mutazioni meno frequenti di *KRAS* (esoni 3 e 4) e di *NRAS* (esoni 2,3 e 4) sulla efficacia delle terapie anti-EGFR (46-52). Una metanalisi di questi studi ha dimostrato che il trattamento con anti-EGFR determina una migliore PFS e OS in pazienti senza mutazioni di *RAS* rispetto a quelli con mutazioni "rare" dei geni *RAS* (53). Non è stata evidenziata alcuna differenza tra l'utilizzo di diversi farmaci anti-EGFR, tra le differenti linee di terapia e i diversi chemioterapici utilizzati in combinazione. Sulla base di tali dati, EMA ed AIFA hanno ristretto l'utilizzo degli anti-EGFR, Cetuximab e Panitumumab, ai soli pazienti con carcinoma del colon retto *RAS* wild type (ovvero pazienti che non hanno mutazioni negli esoni 2,3 e 4 di *KRAS* e *NRAS*).

3.5.2 Analisi stato mutazionale *BRAF*

Le mutazioni di *BRAF* sono presenti in circa il 10% dei pazienti con tumore del colon retto metastatico. La maggior parte delle mutazioni di *BRAF* coinvolge il dominio chinasi e di queste, il 98,4% coinvolge il codone 600. Tra le mutazioni del codone 600, la mutazione *V600E* è la più frequente (97,8% dei casi). Mutazioni non-*V600E* di *BRAF* sono riscontrate in circa il 2% dei casi. Le mutazioni di *BRAF* sono identificate in circa il 40% dei tumori MSI-H e nel 4% dei tumori MSI-L. Dal punto di vista clinico, la presenza di mutazione di *BRAF* è spesso associata a localizzazione al colon destro, istotipo mucinoso e alla presenza di metastasi linfonodali e peritoneali (54). Gli studi

sono concordi nel definire la mutazione di *BRAF V600E* quale fattore prognostico sfavorevole in pazienti con carcinoma del colon retto metastatico (55,56). L'analisi della mutazione di *BRAF* può quindi fornire informazioni prognostiche e fornire l'opportunità di utilizzare farmaci target nei pazienti con tumore del colon retto metastatico.

3.5.3 Analisi microsatelliti

L'instabilità dei microsatelliti costituisce un marcatore fenotipico e molecolare del deficit del sistema di riparazione del DNA mismatch repair (dMMR). La presenza di instabilità dei microsatelliti può essere identificata mediante PCR (determinazione status di MSI, MSS, MSI-H) oppure mediante immunohistochimica tramite la diagnosi di mancata espressione delle proteine codificate da uno dei quattro principali geni del complesso del MMR (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2). I tumori del colon retto con instabilità dei microsatelliti sono più frequentemente associati a localizzazione al colon destro, giovane età, stadio più precoce, istotipo mucinoso e scarsa differenziazione. Sono inoltre associati con la mutazione di *BRAF* nel 15-20% dei casi (57). Numerosi studi hanno dimostrato che la presenza di MSI è associata ad una migliore prognosi in pazienti con tumore del colon retto resecabile. Nei pazienti operati in stadio II, infatti, la determinazione di MSI può anche essere di ausilio nella decisione di effettuare o meno la terapia adiuvante, vista la prognosi estremamente favorevole. Per tale ragione, ad oggi, in molti centri le Anatomie Patologiche determinano lo stato di MSI/MMR tramite IHC in tutti i pazienti operati per neoplasia del colon retto. La presenza di MSI nello stadio avanzato è invece associata a chemio-resistenza e quindi a prognosi sfavorevole. È stato tuttavia evidenziato come la presenza di MSI sia legata ad una potenziata risposta immunitaria endogena e quindi ad una maggiore sensibilità all'immunoterapia, tanto che il ruolo predittivo di MSI come marcatore di risposta agli inibitori dei checkpoint

immunologici nel carcinoma del colon retto è ormai un dato assodato (58). In base a tali dati, sono stati approvati l'impiego di diversi immunoterapici in pazienti con tumore del colon retto con MSI.

3.5.4 Potenziali biomarkers predittivi e bersagli terapeutici

Alterazioni genetiche di *ERBB2* (HER2) sono state individuate in pazienti con carcinoma del colon retto. Nel 3-5% dei casi si riscontrano amplificazioni, in percentuale minori mutazioni. In letteratura ci sono dati contrastanti sul possibile ruolo prognostico e predittivo delle alterazioni di *ERBB2*, mentre sono incoraggianti i dati che suggeriscono che l'amplificazione di *ERBB2* possa essere un potenziale target dei farmaci anti-HER2 nei tumori *RAS* wt. Gli studi hanno mostrato dei buoni tassi di risposte obiettive; tuttavia, ad oggi questi farmaci non sono utilizzabili nella pratica clinica ma solo all'interno di trials clinici (59,60). Ulteriori alterazioni molecolari sono descritte quali potenziali bersagli terapeutici nel tumore del colon retto. Fra questi, merita sicuramente menzione la presenza di fusione del gene *NTRK* che è presente in meno dell'1% di tumori del colon retto. I farmaci inibitori di *NTRK* hanno dimostrato attività clinica in pazienti con riarrangiamenti genici che determinano fusioni di *NTRK*, tanto che per la prima volta EMA ha approvato un marcatore agnostico, indipendentemente dall'istologia, per una terapia target (61).

3.6 Trattamento di prima linea e linee successive

Il trattamento del tumore del colon metastatico è notevolmente cambiato negli ultimi vent'anni e la prognosi dei pazienti affetti è passata da circa 12 mesi, quando l'unico farmaco a disposizione era il 5-Fluorouracile, ai circa 30 mesi attuali, grazie non solo alla disponibilità di nuovi farmaci, ma anche all'integrazione dei trattamenti sistemici con quelli locoregionali. Ad oggi, tra gli agenti disponibili capaci di incidere sulla storia naturale della malattia, abbiamo: - Chemioterapici: Fluoropirimidine (5-Fluorouracile, Capecitabina e TAS-102), Oxaliplatino, Irinotecan, Mitomicina C

e Raltitrexed; - Farmaci antiangiogenetici: Bevacizumab, Afibercept, Ramucirumab e Regorafenib;
- Anticorpi monoclonali anti-EGFR: Cetuximab e Panitumumab.

Nei pazienti con tumore del colon retto metastatico è indicato iniziare un trattamento chemioterapico alla diagnosi, anche in assenza di sintomi (62).

Vista la tolleranza generalmente buona e la discreta maneggevolezza, associazioni di Fluorouracile (preferibilmente endovenoso) e Acido Folinico con Oxaliplatino e/o Irinotecan dovrebbero essere impiegate in prima linea in tutti i pazienti in condizioni di fare una polichemioterapia, preferibilmente in associazione con un farmaco biologico (45,49,63,64). Le doppiette hanno infatti dimostrato, se confrontate con la monoterapia, di aumentare i tassi di risposta e di migliorare PFS e OS. Così come la tripletta si è dimostrata superiore in termini di percentuale di risposta e OS rispetto alla doppietta (65). D'altra parte, l'utilizzo dei farmaci biologici ha dimostrato di poter incrementare i risultati ottenuti con la chemioterapia. L'utilizzo della monochemioterapia in prima linea è riservato a pazienti anziani e/o in condizioni generali che non permettono un approccio terapeutico più intensivo (66).

Bevacizumab è primo farmaco a bersaglio molecolare affermatosi nel trattamento di prima linea del tumore del colon retto metastatico fu Bevacizumab, un anticorpo monoclonale diretto contro il fattore pro-angiogenetico VEGF-A, promotore chiave nella formazione della rete di nuovi vasi sanguigni e quindi nella progressione tumorale. Mentre Bevacizumab non è attivo come singolo agente, la sua associazione a schemi di chemioterapia si è dimostrata sicura ed efficace. Tutti gli studi condotti sull'utilizzo di Bevacizumab in associazione alla chemioterapia di prima linea sono inclusi in una metanalisi i cui risultati non hanno mostrato nessun vantaggio in OS nei regimi contenenti Bevacizumab, mentre l'aggiunta di Bevacizumab alla chemioterapia ha migliorato la PFS in maniera significativa (67,68). In assenza di condizioni che ne controindichino l'utilizzo,

Bevacizumab dovrebbe quindi essere utilizzato in associazione alla chemioterapia di prima linea, fino a progressione o tossicità inaccettabile.

Gli anti-EGFR: Cetuximab e Panitumumab rappresentano l'altra classe di agenti a bersaglio molecolare attivi nel tumore del colon metastatico sono gli anticorpi monoclonali diretti verso EGFR (epidermal growth factor receptor). Diversamente da Bevacizumab, gli anti-EGFR sono attivi anche come agenti singoli, mostrando capacità citotossiche anche senza l'associazione della chemioterapia. Come già detto sopra, le mutazioni a carico dei geni KRAS e NRAS sono riconosciute come biomarcatori predittivi di resistenza e pertanto gli anti-EGFR sono indicati per il trattamento di pazienti con tumore RAS wild type. L'aggiunta di un anti-EGFR a doppiette di chemioterapia comprendenti 5-Fluorouracile si è dimostrata vantaggiosa in diversi studi di fase II e III. Ad oggi nella pratica clinica, Cetuximab e Panitumumab sono prescrivibili come trattamento di prima linea in associazione a FOLFOX o FOLFIRI (45,48,49), mentre l'aggiunta dell'anti-EGFR a schemi chemioterapici a tre farmaci è ancora in corso di validazione.

3.6.1 Algoritmo di scelta della prima linea di trattamento

Le molteplici opzioni terapeutiche disponibili per il trattamento di prima linea del tumore del colon metastatico consentono di modulare la scelta in ogni singolo paziente. I fattori da tenere in considerazione per la scelta sono ovviamente legati al quadro di malattia (numero di lesioni metastatiche, organi colpiti, sintomaticità, rischio di insufficienza d'organo) e al paziente (ECOG performance status, età, comorbidità). L'analisi delle condizioni generali del paziente per valutare l'idoneità a ricevere trattamenti chemioterapici di combinazione si colloca all'apice dell'algoritmo decisionale della terapia di prima linea (Figura 4).

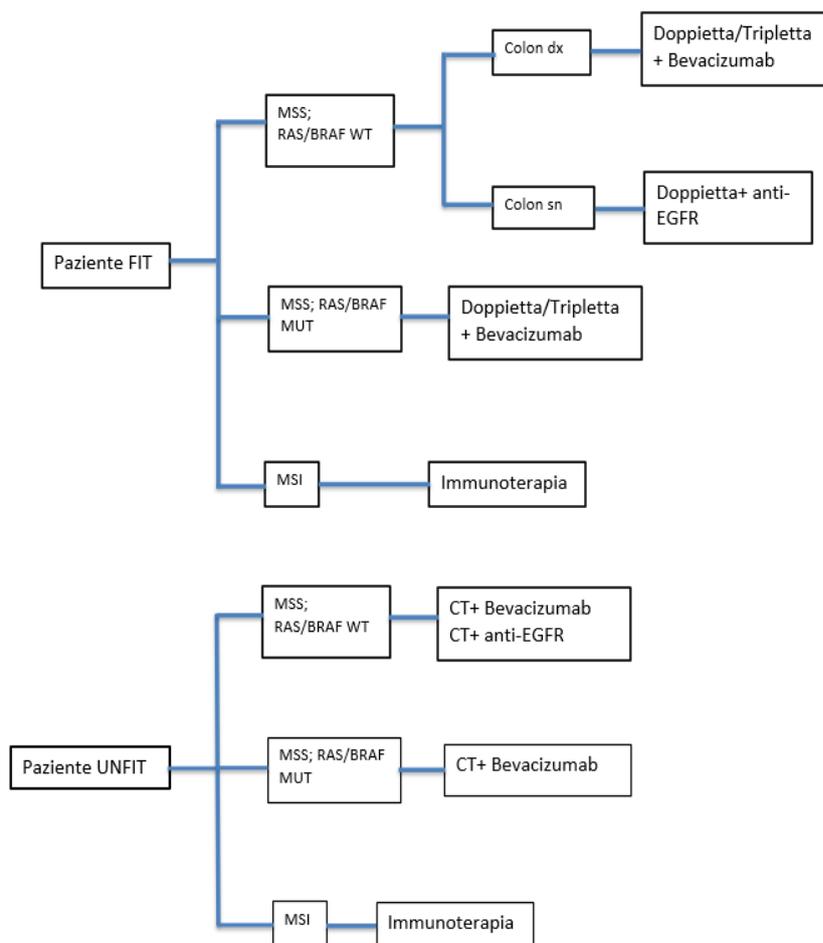


Figura 4- Algoritmo di scelta trattamento di prima linea mCRC

Nei pazienti anziani e/o unfit per una chemioterapia intensiva, infatti, l'opzione terapeutica preferibile è la Fluoropirimidina in monoterapia, preferibilmente associata a Bevacizumab (66). Nei pazienti fit con tumore del colon *RAS* mutato, il trattamento di scelta nella pratica clinica quotidiana prevede la combinazione di doppiette FOLFOX o FOLFIRI (o tripletta in casi selezionati) in associazione a Bevacizumab. Nei pazienti fit con tumore del colon *RAS* wild type si pone il quesito della scelta tra l'antiangiogenetico e l'anti-EGFR. Gli studi di confronto non hanno evidenziato un vincitore in termini di sopravvivenza globale e libera da progressione, evidenziando tuttavia un beneficio in termini di attività, ovvero di capacità di indurre una rilevante citoriduzione, per l'anti-EGFR. Di conseguenza, questo potrebbe essere utilizzato in situazioni in cui sia

importante ottenere una rilevante e rapida riduzione volumetrica della malattia (69). Evidenze più recenti hanno portato all'attenzione come la diversa sede del tumore primitivo possa essere correlata a diversa prognosi e a diversa sensibilità ai trattamenti. Nello specifico, i tumori che originano dal colon destro mostrano prognosi peggiore e limitato beneficio dai trattamenti standard, essendo peraltro perlopiù resistenti agli anti-EGFR anche se *RAS* wt. D'altro canto, nei tumori che originano a sinistra è stato evidenziato un chiaro vantaggio a favore degli anti-EGFR (69). Pertanto, l'algoritmo terapeutico prevede che nei pz fit con tumore del colon destro *RAS* wt, il trattamento di prima linea di prima scelta sia l'impiego di Bevacizumab rispetto ad anti-EGFR in associazione a doppietta (o tripletta) chemioterapica. Nei pz fit con tumore del colon sinistro *RAS* wt, il trattamento di prima linea standard prevede invece l'impiego di anti-EGFR rispetto a Bevacizumab in associazione alla doppietta. Nei pazienti fit (con età <70 anni o età compresa tra i 71 e 75 con PS ECOG 0) con tumore del colon retto metastatico, indipendentemente dallo stato mutazionale, l'utilizzo della tripletta FOLFOXIRI associata a Bevacizumab può essere considerata un'opzione di trattamento di prima linea, soprattutto in situazioni in cui sia necessaria un'intensificazione del trattamento.

Gli studi di fase III TRIBE e TRIBE2 hanno infatti dimostrato come, in pazienti con tumore del colon retto metastatico mai trattati e non precedentemente trattati con terapia adiuvante a base di Oxaliplatino, vi sia un vantaggio a favore della tripletta rispetto alla doppietta in associazione a Bevacizumab in termini di mPFS, OS e ORR (65,70).

Come già precedentemente descritto, anche nel tumore del colon retto metastatico esiste uno spazio per l'immunoterapia, rappresentato dal sottogruppo di pazienti con instabilità dei microsatelliti (MSI) che costituiscono complessivamente circa il 5% di tutti i casi. Gli anti-PD1 Nivolumab e Pembrolizumab hanno riportato in pazienti con tumori MSI-H già pretrattati con chemioterapia risultati molto interessanti in termini di controllo di malattia e durata del beneficio

clinico. Sulla base dei dati degli studi clinici KEYNOTE 164 e CHECKMATE 142, è stato approvato l'utilizzo di questi due immunoterapici per il trattamento del tumore del colon metastatico MSI pretrattato con terapia standard (71,72). Nel 2020 è stato pubblicato lo studio KEYNOTE 177 che ha segnato una rivoluzione nella pratica clinica. Questo studio di fase III ha sancito la superiorità dell'immunoterapia (Pembrolizumab) rispetto allo standard of care rappresentato dalla chemioterapia (doppiette associate a Bevacizumab o Cetuximab) in pazienti con MSI-H mai trattati precedentemente (73). Ad oggi quindi in Italia è possibile richiedere Pembrolizumab ad uso nominale in pazienti con tumore del colon metastatico MSI-H/dMMR in prima linea di trattamento. Infine, ha da poco ricevuto l'approvazione la combinazione Nivolumab e Ipilimumab per il trattamento del tumore del colon-retto metastatico con deficit di riparazione del mismatch (dMMR) o elevata instabilità dei microsatelliti (MSI-H) dopo una precedente chemioterapia di combinazione a base di fluoropirimidine, sulla base dei risultati dello studio clinico di Fase 2 CheckMate -142 che mostra come circa due terzi dei pazienti abbiano risposto alla associazione di nivolumab e ipilimumab con risposte durature (74).

La malattia *BRAF* mutata occorre in circa il 10% dei casi di tumore del colon ed è correlata ad una prognosi peggiore. Ad oggi in tutte le linee guida, lo standard terapeutico di prima linea per i pazienti *BRAF* mutati è FOLFOXIRI+Bevacizumab. Questo deriva dai dati dell'analisi di sottogruppo dello studio TRIBE in cui nei pazienti *BRAF* mutati è stato evidenziato un vantaggio a favore della tripletta rispetto alla doppietta in PFS e OS (65). Tuttavia, questi dati non sono stati confermati da studi successivi, per cui ad oggi nella pratica clinica per scegliere tra l'utilizzo della tripletta o della doppietta ci basiamo principalmente sulle condizioni cliniche del paziente (70, 75). Dal momento che *BRAF* è una proteina di segnale del pathway MAPK EGFR-mediato, l'eventuale efficacia dei farmaci anti-EGFR è stata studiata nei pazienti con mutazione di *BRAF*: recenti metanalisi hanno tuttavia mostrato uno scarso o nullo beneficio dall'utilizzo di questi farmaci nella popolazione

BRAF mutata (76). In diversi studi è stata quindi valutata l'associazione di diverse terapie target che agiscono inducendo più blocchi lungo la via di segnale di *BRAF*. È questo il principio dello studio BEACON in cui è stata valutata l'efficacia dell'associazione di Encorafenib (inibitore di *BRAF*) e Binimetinib (inibitore selettivo di MEK) con l'anti-EGFR Cetuximab. Sulla scorta dei risultati dello studio BEACON, che hanno mostrato un vantaggio in OS e PFS per il braccio sperimentale rispetto allo standard FOLFIRI+Cetuximab, è disponibile la combinazione di Encorafenib e Cetuximab per il trattamento dei pazienti con tumore del colon retto metastatico con mutazione di *BRAF V600E* in progressione dopo una o due linee di trattamento standard (77). Questi dati hanno sicuramente modificato la pratica clinica e ad oggi in Italia questa associazione terapeutica può essere richiesta ad uso compassionevole per i pazienti con tumore del colon metastatico *BRAF V600E* mutato in seconda e terza linea di trattamento. È attualmente in corso lo studio di fase II ANCHOR che ha l'obiettivo di valutare l'efficacia di Encorafenib, Binimetinib e Cetuximab in pazienti con tumore del colon retto metastatico e mutazione di *BRAF V600E* in prima linea.

3.6.2 Terapia di mantenimento e trattamenti dopo la prima linea

Sebbene tutti i regimi chemioterapici utilizzabili in prima linea si siano affermati sulla base di studi clinici che ne raccomandava la prosecuzione fino all'evidenza di progressione di malattia, tale approccio è difficilmente percorribile nella pratica clinica per il frequente verificarsi di eventi avversi. In questo senso, sono state valutate diverse strategie di depotenziamento del trattamento in periodi cosiddetti "di mantenimento", con l'obiettivo di consolidare i risultati ottenuti con la terapia di induzione senza gravare in termini di tossicità sulla qualità di vita del paziente. In linea generale, dopo un periodo di trattamento di induzione di 4-6 mesi, è oggi prassi comune depotenziare il trattamento passando ad una terapia di mantenimento. Sulla base dei

dati di studi clinici randomizzati, dopo una chemioterapia con Bevacizumab, è strategia di prima scelta proseguire il trattamento con una Fluoropirimidina associata a Bevacizumab, piuttosto che con solo Bevacizumab (78,79). È invece tuttora in corso di valutazione la definizione della migliore strategia di mantenimento dopo chemioterapia e anti-EGFR. In questi pazienti, dopo 4-6 mesi, può essere considerata una terapia di mantenimento con Fluoropirimidina e anti-EGFR, mentre la monoterapia con solo anti-EGFR come trattamento di mantenimento necessita ancora di validazione in studi clinici che sono tuttora in corso (80-81).

Il trattamento al momento della progressione di malattia verrà scelto sulla base delle caratteristiche cliniche e molecolari già descritte per la prima linea, considerando in aggiunta il beneficio ottenuto dalla terapia effettuata in prima battuta e l'intervallo temporale intercorso tra l'avvio della prima linea e la progressione. Per quel che riguarda la chemioterapia, infatti, se il comportamento comune è quello di switchare da FOLFOX a FOLFIRI (o viceversa) al momento della progressione, in caso di intervalli temporali prolungati tra la fine della chemioterapia di combinazione di induzione e la progressione è anche proponibile riproporre lo stesso regime chemioterapico adottato in prima linea. Quanto alla scelta del farmaco biologico, dopo progressione ad una prima linea contenente Bevacizumab, diversi studi hanno dimostrato l'efficacia di una protratta strategia antiangiogenetica (82,83).

Fra queste opzioni vi sono o la prosecuzione di Bevacizumab oltre la progressione o l'utilizzo dell'antiangiogenetico Afibercept, utilizzabile solo in associazione a FOLFIRI in pazienti precedentemente trattati con Oxaliplatino (84). Anche gli anticorpi anti-EGFR sono prescrivibili in seconda linea, ovviamente nei pazienti RAS wt che non li abbiano ricevuti in precedenza. Tuttavia, visto l'impatto di questa classe di farmaci in prima linea in pazienti ben selezionati, l'uso degli anti-EGFR è perlopiù da riservarsi in prima linea, oppure, qualora si sia voluto investire in una strategia antiangiogenetica, questa viene generalmente proseguita dopo la progressione, lasciando l'utilizzo

degli anti-EGFR ad una linea ancora successiva. Dopo progressione ad una prima linea di chemioterapia associata ad anti-EGFR, la scelta più comune è l'utilizzo degli antiangiogenetici Bevacizumab o Afibercept (quest'ultimo solo in associazione a FOLFIRI). Diversi studi hanno inoltre valutato la strategia di rechallenge in terza linea degli anti-EGFR. Anche se le evidenze derivano da studi retrospettivi e di fase II con pochi pazienti, Cetuximab può essere utilizzato in monoterapia o in associazione ad Irinotecan in III linea in pazienti già in risposta a trattamento di prima linea con anti-EGFR (85,86). Similmente, Panitumumab può essere impiegato in monoterapia in pazienti con tumore del colon retto metastatico *RAS* wt sottoposti a precedenti trattamenti chemioterapici che non abbiano precedentemente utilizzato Cetuximab, o che lo abbiano sospeso in assenza di progressione (86).

Esistono infine due opzioni di trattamento per pazienti pretrattati, in cui abbiano fallito i chemioterapici convenzionali, Bevacizumab e gli anti-EGFR o considerati non candidabili a tali terapie: Regorafenib e TAS-102. Entrambi i farmaci, negli studi registrativi, hanno consentito di osservare vantaggi statisticamente significativi, anche se piuttosto modesti in termini assoluti, in OS globale e PFS rispetto a placebo, senza però incrementare i tassi di risposte obiettive (87,88). La restrizione del trattamento a soggetti in buone condizioni cliniche è probabilmente oggi l'unica arma per ottimizzare il rapporto rischio/beneficio di queste terapie, al fine di evitare tossicità inutili a fronte di un'efficacia limitata in un setting esclusivamente palliativo.

4 PARTE SPERIMENTALE

4.1 Introduzione e razionale

Il tumore del colon retto è una delle neoplasie più comuni, rappresentando globalmente il quarto tumore più diagnosticato nel mondo, al terzo posto per incidenza negli uomini e al secondo posto nelle donne. Il CRC è la terza causa di morte per tumore nel mondo considerando globalmente uomini e donne.

L'incidenza di nuovi casi e la mortalità sono stati costantemente in declino negli ultimi anni sia negli uomini che nelle donne a causa del miglioramento nelle procedure di screening e nelle strategie terapeutiche. Importante sottolineare come il declino globale dell'incidenza del tumore del colon retto mascheri in realtà i tassi di incidenza in incremento fra gli adulti < 65 anni.

Nel 25% circa dei casi si presenta in fase metastatica già alla diagnosi. In questo setting, i trattamenti sistemici sono considerati lo standard.

Negli ultimi dieci anni, l'introduzione di anticorpi anti-EGFR (cetuximab e panitumumab) per i pazienti con tumori RAS wild-type (WT) e agenti antiangiogenici (bevacizumab , aflibercept e ramucirumab) in associazione alla chemioterapia ha migliorato significativamente i risultati, estendendo il mOS a quasi 30 mesi. Recentemente, l'inibitore multichinasi regorafenib e la nuova fluoropirimidina orale TAS-102 hanno dimostrato efficacia nei pazienti chemiorefrattari. L'immunoterapia si è rivelata efficace nel trattamento dei tumori del colon-retto metastatici con instabilità dei microsatelliti sia in prima linea che nelle linee successive, ma complessivamente rappresentano solo circa il 5% dei casi totali. La mutazione BRAF infine, presente in circa il 10% dei pazienti con carcinoma del coloretto metastatico, è l'unica che recentemente si è dimostrata

druggable. Tuttavia la prognosi dei pazienti che falliscono le terapie standard rimane tuttavia scarsa.

Da tali premesse emerge la necessità di approfondire le conoscenze di biologia molecolare relative ai carcinomi coloretali, valutando la presenza di eventuali alterazioni a carico delle numerose pathway molecolari associate alla cancerogenesi, oltre a verificare le già note alterazioni molecolari di geni quali KRAS, NRAS, BRAF. Inoltre occorre individuare strategie terapeutiche più mirate ed efficaci per i carcinomi coloretali in fase avanzata refrattari ai trattamenti standard.

Negli ultimi anni il progredire della tecnologia in ambito molecolare ha consentito lo sviluppo e diffusione di nuove piattaforme basate sul sequenziamento genico massivo di nuova generazione o Next Generation Sequencing (NGS) che ha permesso di passare da una strategia a singolo gene/test a una multi-gene/multi-test. Tuttavia, rimane ancora da definire il ruolo dell'utilizzo della tecnologia NGS nella diagnostica molecolare di routine e nella pratica clinica.

4.2 Obiettivi

Studio osservazionale retrospettivo con l'obiettivo principale di valutare la correlazione dei parametri di sopravvivenza (PFS sopravvivenza libera da progressione e OS sopravvivenza globale) con le alterazioni molecolari rilevate nella pratica clinica di routine con pannello NGS OncoPrint Focus Assay, applicato su tessuto tumorale di carcinoma coloretale contenuto in istologici fissati in formalina e inclusi in paraffina (presso il Laboratorio di Bioscienze IRST IRCCS sezione di Diagnostica Avanzata e Predittiva Hub Area Vasta Romagna), al fine di identificare l'eventuale significato prognostico del numero di mutazioni, dei diversi tipi di geni mutati e della variazione delle frequenze alleliche.

Obiettivo secondario è la rilevazione della prevalenza di mutazioni "druggable" o "actionable" che possano servire per lo sviluppo di strategie terapeutiche più mirate ed efficaci per i carcinomi coloretali in fase avanzata.

4.3 Materiali e Metodi

4.3.1 Popolazione oggetto dello studio

Studio osservazionale retrospettivo condotto su preparati istologici fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) di carcinoma del colon-retto primitivo o metastatico ottenuti da pezzi operatori o biopsia, disponibili presso gli archivi delle UUOO di Anatomia Patologica dell'Area Vasta Romagna (sedi di Forlì, Cesena, Ravenna e Rimini) afferenti all'IRST IRCCS di Meldola, sui quali sono state effettuate analisi di alterazioni molecolari (mutazioni, amplificazioni e geni di fusione) in 52 geni mediante metodica NGS (Next Generation Sequencing) Oncomine Focus Assay.

Il campione è stato selezionato partendo dalle informazioni contenute nell'archivio informatizzato del Laboratorio di Bioscienze dell'IRST IRCCS di Meldola e nella cartella clinica elettronica Log80. Di ogni paziente sono stati analizzati il report di diagnostica molecolare e la storia medica al fine di discriminare i soggetti reclutabili sulla base dei seguenti criteri:

- Pazienti di età superiore ai 18 anni;
- Pazienti viventi e deceduti affetti da carcinoma coloretale metastatico;
- Pazienti sottoposti a caratterizzazione molecolare con tecnologia NGS-multigene mediante il test Focus Oncomine Assay da giugno 2019 a dicembre 2020 presso il Laboratorio di Bioscienze dell'IRST e presenti nel database dei report di diagnostica molecolare.

I pazienti con un'altra neoplasia metastatica concomitante o con carcinoma coloretale localizzato sono stati esclusi. Per ognuno dei pazienti inclusi nel campione sono poi state riportate le seguenti variabili: sesso (M/F), Performance Status (ECOG) e marcatori tumorali (CEA, CA 19.9) alla diagnosi di malattia metastatica, numero di siti metastatici e loro sede, numero di linee terapeutiche effettuate, chirurgia e trattamenti locoregionali delle metastasi, numero di alterazioni molecolari rilevate con test Focus Oncomine Assay, geni coinvolti e variazioni delle frequenze alleliche.

Le informazioni sono state ottenute dalle cartelle cliniche elettroniche dei pazienti secondo rigidi standard di privacy e i dati sono stati registrati in un database con Excel, creato ad hoc in un formato anonimo. Tutte le indagini dettagliate sono state condotte in conformità con la Good Clinical Practice.

4.3.2 Analisi molecolari

Per l'analisi mutazionale NGS dei carcinomi coloretali è stato utilizzato il pannello multigenico Oncomine Focus Assay che utilizza DNA ed RNA estratti da tessuto paraffinato per l'analisi molecolare di mutazioni "hot-spot", mutazioni puntiformi (SNVs), piccole delezioni e inserzioni (indels), Copy Number Variations (CNVs) e fusioni geniche di 52 geni di rilevanza clinica.

Il flusso di lavoro per le analisi molecolari in NGS segue uno schema molto conservato:

- 1) CAMPIONAMENTO del materiale istologico ed ESTRAZIONE degli acidi nucleici

Il materiale istologico paraffinato viene valutato dall' anatomico-patologo dell'Istituto IRST che stabilisce l'adeguatezza del campione per l'analisi ed il contenuto di cellule tumorali (numero o percentuale) e che successivamente effettua la macro-dissezione sui vetrini.

2) Preparazione delle LIBRERIE NGS di DNA e RNA e del TEMPLATO NGS

Una libreria NGS consiste in un set di frammenti di acidi nucleici coniugati con adattatori, sequenze oligonucleotidiche sintetizzate chimicamente e specifici per ogni tecnologia NGS, che possono essere legati alle estremità di altre molecole di DNA o RNA e sottoposti ad amplificazione clonale mediante real time PCR. Il template NGS è costituito da molecole di DNA stampo a singolo strand (ssDNA), amplificate con la PCR dai frammenti che costituiscono la libreria, e che successivamente vengono sottoposte a sequenziamento.

3) SEQUENZIAMENTO

viene eseguito sulla piattaforma di Next Generation Sequencing (NGS) IonTorrent S5 (ThermoFisher). In ogni ciclo di sequenziamento, quando vengono incorporati i singoli nucleotidi nella catena nascente di DNA, immediatamente viene rilasciato come sottoprodotto uno ione idrogeno creando una variazione di pH registrata da un pH-metro che trasforma l'informazione da chimica a digitale, registrandola come dato di sequenza. Le basi azotate vengono dispensate una per volta, e la quantità di protoni rilasciati è proporzionale al numero di basi presenti.

4) ANALISI DATI

Le analisi di sequenziamento vengono eseguite tramite software Ion Reporter v. 5.12 (Thermo Fisher Scientific).

4.4 Analisi statistica

E' stato creato un database specifico per raccogliere in modo retrospettivo dati anagrafici, clinici, istologici e dati di trattamento.

Le caratteristiche dei pazienti sono state riassunte utilizzando mediana e range per le variabili continue e frequenze e percentuali per le variabili categoriali.

Le analisi statistiche sono state eseguite con il software SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). L'associazione tra le variabili categoriali è stata valutata utilizzando il test Chi-quadrato o il test esatto di Fisher, a seconda dei casi. La sopravvivenza libera da progressione (PFS) è stata calcolata come tempo dalla data di diagnosi di tumore metastatico a progressione o morte per tutte le cause in base al primo evento che si verificava. Nel caso di pazienti vivi in assenza di progressione, è stata considerata la data di ultimo follow-up. La sopravvivenza globale (OS) è stata calcolata come tempo dalla data di diagnosi di tumore metastatico a morte per tutte le cause o alla data di ultimo follow-up. Le curve di sopravvivenza sono state stimate con il metodo di Kaplan-Meier e i confronti sono stati effettuati utilizzando il test di log-rank. La significatività statistica è stata fissata a $p=0.05$ per test a due code. Sono stati utilizzati modelli di regressione univariata di Cox per stimare gli hazard ratio (HR) e il loro intervallo di confidenza al 95% (CI).

4.5 Risultati

4.5.1 Caratteristiche dei pazienti

Nella Tabella 1 sono riassunte le caratteristiche dei pazienti. Complessivamente sono stati raccolti e analizzati i dati di 179 pazienti con carcinoma colorettaie metastatico e report NGS eseguito da giugno 2019 a dicembre 2020 presso il Laboratorio di Bioscienze dell'IRST, trattati sia presso l'IRST IRCCS che presso le UO di Oncologia dell'Area Vasta Romagna. I dati clinici erano accessibili sulla cartella clinica elettronica Log80.

Il campione è quindi formato da 179 pazienti, 74 femmine (41%) e 105 maschi (59%), con età mediana di 68 anni (range 30-90 anni). La valutazione del performance status secondo ECOG al momento della diagnosi di malattia metastatica è stata possibile in 160 pazienti (89.3%), nei restanti 19 casi (10.7%) la cartella clinica non riportava il dato. Nella maggior parte dei pazienti sono state riscontrate buone condizioni cliniche generali (n=140, 78.2%) con ECOG PS 0 e 1, mentre in 20 pazienti (11.1%) è stato rilevato un ECOG PS \geq 2.

Il follow-up mediano è risultato essere di 33 mesi (95% IC: 28.45 – Non raggiunto), la sopravvivenza libera da progressione (PFS) mediana di 10.3 mesi (95%CI 8.8-12.3) e la sopravvivenza globale (OS) mediana di 32.7 mesi (95%CI 24.8-39.2).

Il 63.1 % dei casi presenta metastasi sincrone (n=113) e il 36.9% metacrone (n=66). Per quanto riguarda i siti metastatici in 115 pazienti è stato riscontrato un solo sito metastatico (64.3%) mentre due o più siti metastatici in 64 pazienti (35.7%). Circa il 28% della casistica è stato sottoposto a resezione chirurgica di metastasi come primo trattamento (n=50, 27.9%). Le resezioni chirurgiche epatiche sono state in assoluto le più frequenti (n=15, 30%), seguite dalle metastasectomie polmonari (n=9, 18%). Si precisa che 64 pazienti (35.7%) presentano esclusivamente metastasi epatiche alla diagnosi di malattia avanzata. Complessivamente 149 pazienti (83.2%) sono stati sottoposti a una chemioterapia di prima linea, il 51.9% della casistica (n=93) ha eseguito almeno due linee di trattamenti. Infine, 8 pazienti con alterazioni “druggable” rilevate da NGS hanno avuto accesso a una targeted therapy. Sei pazienti con mutazione di BRAF hanno ricevuto l’associazione di Encorafenib (BRAF inibitore) e Cetuximab (anti-EGFR) inibitore, mentre due pazienti sono stati trattati con un inibitore di PI3K.

Tabella 1 - Caratteristiche dei pazienti

| Variabile | Numero | Mediana (IQR) / % |
|---|---------------|--------------------------------|
| Follow-up mediano (mesi) | | 33 (95% IC: 28.45 – NR) |
| Genere | | |
| Femmina | 74 | 41% |
| Maschio | 105 | 59% |
| Età mediana alla diagnosi di stadio IV | | 68 (30-90) |
| ECOG PS alla diagnosi di stadio IV | | |
| 0 | 109 | 60.9% |
| 1 | 31 | 17.3% |
| 2 – 3 | 20 | 11.2% |
| NA | 19 | 10.6% |
| Sede primaria del tumore | | |
| Destra | 64 | 35.7% |
| Sinistra | 68 | 38% |
| Retto | 46 | 25.7% |
| Sincroni primitivi multipli | 1 | 0.6% |
| Presentazione delle metastasi | | |

| | | |
|---|-----|-------|
| Sincrone | 113 | 63.1% |
| Metacrone | 66 | 36.9% |
| Numero di sedi metastatiche alla diagnosi di stadio IV | | |
| 1 | 115 | 64.2% |
| >1 | 64 | 35.8% |
| Sedi Metastatiche | | |
| Fegato | 127 | 70.9% |
| Polmone | 50 | 27.9% |
| Linfonodi extraregionali | 34 | 18.9% |
| Peritoneo | 44 | 24.5% |
| Osso | 6 | 3.3% |
| Recidiva pelvica | 6 | 3.3% |
| Recidiva pelvica | 2 | 1.1% |
| Altro | 16 | 8.9% |
| Resezione chirurgica di metastasi | | |
| Sì | 50 | 27.9% |
| No | 129 | 72.1% |

| | | |
|---|-----|-------|
| Tipo di intervento chirurgico up-front metastasi | | |
| Resezione wedge epatica | 9 | 18.0% |
| Resezione wedge polmonare | 9 | 18.0% |
| Epatectomia parziale | 6 | 12.0% |
| Citoriduzione e HIPEC | 10 | 20.0% |
| Resezione di altra sede metastatica | 9 | 18.0% |
| Asportazione di metastasi peritoneale/omentale | 7 | 14.0% |
| Chemioterapia sistemica | | |
| Sì | 149 | 83.2% |
| No | 30 | 16.8% |
| Schema chemioterapico di prima linea | | |
| FOLFOXIRI + Mab anti-VEGF (Bevacizumab) | 13 | 8.8% |
| FOLFOXIRI + Mab anti-EGFR (Panitumumab) | 3 | 2.0% |
| FOLFOX/XELOX + Mab anti-VEGF (Bevacizumab) | 34 | 22.8% |
| FOLFIRI + Mab anti-VEGF (Bevacizumab) | 19 | 12.7% |

| | | |
|---|----|-------|
| FOLFOX + Mab anti-EGFR (Cetuximab o Panitumumab) | 21 | 14.1% |
| FOLFIRI + Mab anti-EGFR (Cetuximab o Panitumumab) | 13 | 8.8% |
| Doppietta(FOLFOX/XELOX/FOLFIRI) senza Mab anti-VEGF o anti-EGFR | 20 | 13.4% |
| Monochemioterapia + Mab anti-VEGF o anti-EGFR | 15 | 10% |
| Monochemioterapia senza Mab anti-VEGF o anti-EGFR | 11 | 7.4% |
| Numero di linee terapeutiche | | |
| 1 | 54 | 36.2% |
| 2 | 40 | 26.9% |
| 3 | 33 | 22.1% |
| 4 | 16 | 10.8% |
| ≥ 5 | 6 | 4.0% |
| Targeted Therapy basata sui risultati dell'analisi NGS | | |
| Rimborsate | 6 | 3.3% |
| Uso terapeutico | 2 | 1.1% |

4.5.2 Alterazioni molecolari

Nella Tabella 2 si riporta la distribuzione nella popolazione esaminata delle alterazioni molecolari. Si precisa che non sono state rilevate amplificazioni o fusioni ma solo mutazioni (Single-Nucleotide Variants SNVs e inserzioni-delezioni INDELS). Per quanto riguarda il numero di mutazioni, nessuna è stata rilevata in 39 pazienti (21.8%), una mutazione in 83 pazienti (46.4%) e un numero di mutazioni ≥ 2 mutazioni in 57 pazienti (31.8%). Il gene KRAS è risultato mutato in 87 pazienti (48,6%), PIK3CA in 40 pazienti (22,4%), BRAF in 26 pazienti (14,5%), APC in 15 pazienti (8,4%) e NRAS in 8 pazienti (4.5%). La mutazione del gene ERBB2 è stata rilevata in 5 pazienti (2.8%), del gene SMO in 4 pazienti (2.2%) mentre 3 pazienti presentano una mutazione a carico di CTNNB1, MYC e MAP2K1 (1,7%). In due pazienti (1,1%) è stata riscontrata la mutazione di ERBB3, RAF1, MTOR, JAK1 ed FGFR2. Infine una sola mutazione (0.6%) è stata rilevata a carico dei seguenti geni: CDK4, MET, FGFR3, GNA11, EGFR, ALK, ROS1, DDR2, KIT. Per ogni gene mutato è inoltre riportata la variazione della frequenza allelica riportata nel referto NGS. Per ciascuno dei geni più frequentemente mutati (KRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS e APC) è stato calcolato il valore mediano delle variazioni delle frequenze alleliche (VAF). Non sono state infine osservate mutazioni in 28 geni del pannello Oncomine Focus.

Per quanto riguarda l'obiettivo secondario la prevalenza di mutazioni "druggable" è risultata la seguente: BRAF 14.5% (n=26), PIK3CA 22.4% (n=40), KRAS G12C 2.8% (n=5) e MET 0.6% (n=1).

Tabella 2 - Alterazioni molecolari

| Variabile | N(%) | | | | |
|---|---|------------|------------|----------|--|
| Alterazione molecolare su pannello NGS (N=140) | N (%) | | | | |
| Mutazioni geniche | KRAS | 87 (48,6%) | MTOR | 2 (1.1%) | |
| | PIK3CA | 40 (22,4%) | JAK1 | 2 (1.1%) | |
| | BRAF | 26 (14,5%) | FGFR2 | 2 (1.1%) | |
| | APC | 15 (8,4%) | CDK4 | 1 (0.6%) | |
| | NRAS | 8 (4.5%) | MET | 1 (0.6%) | |
| | ERBB2 | 5 (2.8%) | FGFR3 | 1 (0.6%) | |
| | SMO | 4 (2.2%) | GNA11 | 1 (0.6%) | |
| | CTNNB1 | 3 (1,7%) | EGFR | 1 (0.6%) | |
| | MYC | 3 (1,7%) | ALK | 1 (0.6%) | |
| | MAP2K1 | 3 (1,7%) | ROS1 | 1 (0.6%) | |
| | ERBB3 | 2 (1.1%) | DDR2 | 1 (0.6%) | |
| | RAF1 | 2 (1.1%) | KIT | 1 (0.6%) | |
| | Numero di mutazioni geniche per paziente | 0 | 39 (21.8%) | | |
| | | 1 | 83 (46.4%) | | |
| ≥ 2 | | 57 (31.8%) | | | |

4.5.3 Associazione tra i geni mutati e PFS

Nello studio è stata valutata l'eventuale correlazione tra PFS con i diversi geni mutati. Data la bassissima se non nulla frequenza di mutazione per alcuni geni, vengono riportati solo quelli con una frequenza di mutazione di almeno il 5%.

- KRAS mutati 10.41 mesi vs 10.05 mesi nei KRAS wild type ($p=0.737$; HR 0.95, 95%CI 0.69 – 1.29).
- PIK3CA mutati 10.74 mesi vs 10.02 mesi nei PIK3CA wild type ($p=0.942$; HR 1.01, 95%CI 0.70 – 1.47);
- BRAF mutati 5.2 mesi vs 10.7 mesi nei BRAF wild type ($p=0.06$; HR 1.54, 95%CI 0.98 – 2.40);
- APC mutati 9.00 mesi vs 10.32 mesi nei PIK3CA wild type ($p=0.330$; HR 1.33, 95%CI 0.75 – 2.35);

La sopravvivenza libera da malattia PFS è risultata inferiore nei pazienti BRAF mutati ma senza raggiungere la significatività statistica: 5.2 mesi vs 10.7 mesi ($p=0.06$; HR 1.54, 95%CI 0.98 – 2.40) (Figura 5).

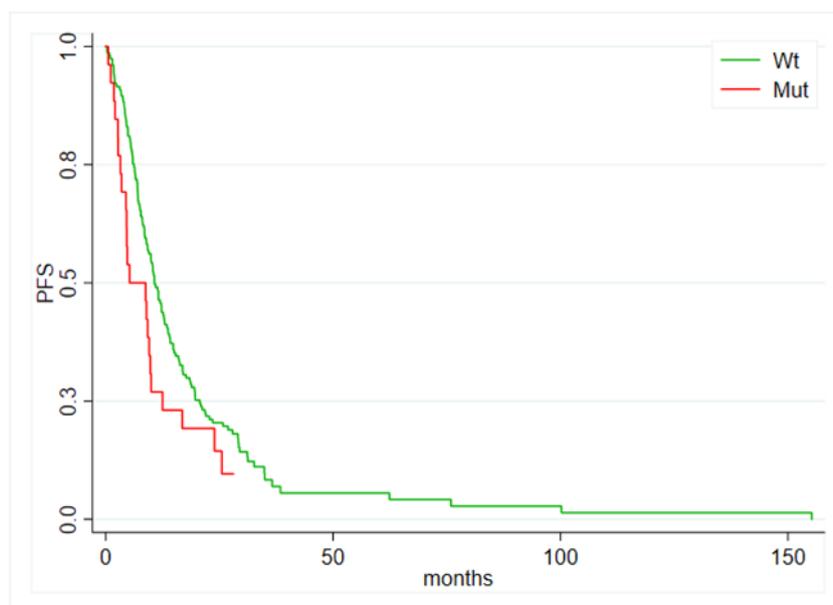


Figura 5 - Correlazione mutazione di BRAF e PFS

4.5.4 Associazione tra i geni mutati e OS

Nel presente studio è stata valutata anche l'eventuale correlazione tra OS ed i geni più frequentemente mutati:

- KRAS mutati 34.92 mesi vs 26.91 mesi nei KRAS wild type ($p=0.084$; HR 0.71, 95%CI 0.48 – 1.05).
- PIK3CA mutati 35.84 mesi vs 30.22 mesi nei PIK3CA wild type ($p=0.270$; HR 0.76, 95%CI 0.47 – 1.24);
- BRAF mutati 13.9 mesi vs 35.8 mesi nei BRAF wild type ($p<0.001$; HR 2.62, 95%CI 1.59 – 4.32);
- APC mutati 24.84 mesi vs 32.79 mesi nei PIK3CA wild type ($p=0.354$; HR 1.36, 95%CI 0.71 – 2.62);

Fra i geni con frequenza di mutazione superiore al 5%, solo per quanto riguarda i pazienti BRAF mutati la sopravvivenza globale OS è risultata significativamente inferiore rispetto ai pazienti non mutati: 13.9 mesi vs 35.8 mesi nei BRAF wild type ($p<0.001$; HR 2.62, 95%CI 1.59 – 4.32) (Figura 6).

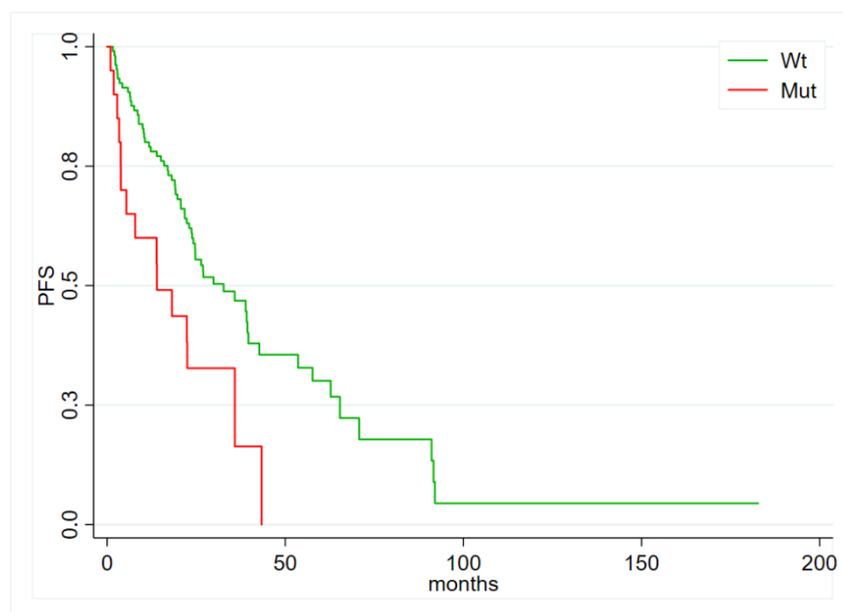


Figura 6 - Correlazione mutazione di BRAF e OS

Da notare che è stata rilevata una riduzione statisticamente significativa sia di PFS che di OS nei pazienti con mutazione del gene CTNNB1:

- PFS nei pazienti CTNNB1 mutati 1.81 mesi vs 10.41 mesi nei CTNNB1 wild type ($p=0.001$; HR 6.85, 95%CI 2.13 – 22.03).

- OS nei pazienti CTNNB1 mutati 2.14 mesi vs 32.79 mesi nei CTNNB1 wild type ($p<0.001$; HR 9.82, 95%CI 3.00 – 32.12).

Tuttavia in considerazione dell'esiguo numero di pazienti portatori di tale mutazione, anche se il p value risulta significativo il dato non risulta attendibile

4.5.5 Associazione tra numero di geni mutati e PFS

Non è stata trovata un'associazione significativa fra PFS e il numero di geni mutati. La PFS mediana dei pazienti senza mutazioni è infatti risultata di 11,63 mesi contro 9.49 mesi di pazienti con una mutazione ($p=0,360$; HR 1,21, 95% CI 0,80-1,82) e 10.55 mesi di quelli con 2 o più mutazioni ($p=0,407$; HR 1,21, 95% CI 0,77-1.88).

4.5.6 Associazione tra numero di geni mutati e OS

Nessuna differenza statisticamente significativa nella sopravvivenza è stata rilevata tra i pazienti con diverso numero di mutazioni. L'OS mediana dei pazienti senza mutazioni è di 34.59 mesi vs 30,22 mesi di pazienti con una mutazione ($p=0,734$; HR 0.92,95% CI 0,57-31.49) e 32,06 mesi di quelli con 2 o più mutazioni ($p=0,931$; HR 0.98, 95% CI 0,58-1.64). Tuttavia sembra che i pazienti con almeno una mutazione abbiano una prognosi peggiore.

4.5.7 Associazione tra variazione della frequenza allelica dei geni mutati e PFS

Per ciascuno dei geni più frequentemente mutati (KRAS, BRAF, PIK3CA e APC) è stato calcolato il valore mediano delle variazioni delle frequenze alleliche (VAF) e sono state effettuate analisi di correlazione fra il valori superiori o inferiori a quello mediano (cut-off) con i parametri di sopravvivenza. Di seguito i risultati ottenuti effettuando la correlazione con PFS:

- KRAS mutati con VAF < al valore mediano 8.11 mesi (p=0.813; HR 1.05, 95%CI 0.71 – 1.54) vs 10.74 mesi nei KRAS mutati con VAF ≥ il valore mediano (p=0.467; HR 0.87, 95%CI 0.59 – 1.27);
- PIK3CA mutati con VAF < al valore mediano 10.41 mesi (p=0.967; HR 1.01, 95%CI 0.61 – 1.68) vs 11.47 mesi nei PIK3CA mutati con VAF ≥ il valore mediano (p=0.946; HR 1.02, 95%CI 0.63 – 1.65);
- BRAF mutati con VAF < al valore mediano 5.29 mesi (p=0.037; HR 1.84, 95%CI 1.04 – 3.26) vs 9.00 mesi nei BRAF mutati con VAF ≥ il valore mediano (p=0.477; HR 1.26, 95%CI 0.66 – 2.41);
- APC mutati con VAF < al valore mediano 7.06 mesi (p=0.527; HR 1.30, 95%CI 0.57 – 2.95) vs 9.00 mesi nei pazienti APC mutati con VAF ≥ il valore mediano (p=0.440; HR 1.35, 95%CI 0.63 – 2.89).

E' stata trovata una riduzione statisticamente significativa della sopravvivenza libera da progressione (PFS) nei pazienti con mutazione del gene BRAF e variazione della frequenza allelica inferiore al valore mediano (Figura 7).

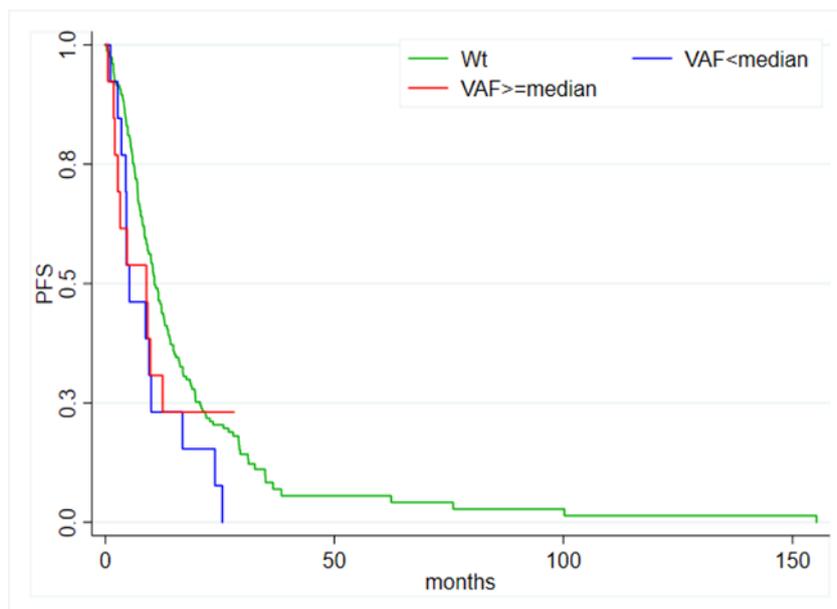


Figura 7 - Correlazione variazione della frequenza allelica VAF dei BRAF mutati e PFS

4.5.8 Associazione tra variazione della frequenza allelica dei geni mutati e OS

Nel nostro studio si è valutato l'eventuale correlazione tra la OS e variazione della frequenza allelica nei geni mutati maggiormente rappresentati (KRAS, BRAF, PIK3CA e APC). Per ciascuno di questi geni è stato calcolato il valore mediano delle variazioni delle frequenze alleliche (VAF) e sono state effettuate analisi di correlazione fra la sopravvivenza globale OS e valori di VAF superiori o inferiori a quello mediano (cut-off).

- KRAS mutati con VAF < al valore mediano 35.81 mesi (p=0.459; HR 0.84, 95%CI 0.52 – 1.34) vs 34.92 mesi nei KRAS mutati con VAF ≥ il valore mediano (p=0.047; HR 0.60, 95%CI 0.36 – 0.99);

- PIK3CA mutati con VAF < al valore mediano 65.6 mesi (p=0.190; HR 0.61, 95%CI 0.30 – 1.27) vs 32.06 mesi nei PIK3CA mutati con VAF ≥ il valore mediano (p=0.738; HR 0.90, 95%CI 0.49 – 1.65);

- BRAF mutati con VAF < al valore mediano 13.9 mesi (p=0.001; HR 2.81, 95%CI 1.52 – 5.18) vs 13.99 mesi nei BRAF mutati con VAF ≥ il valore mediano (p=0.021; HR 2.38, 95%CI 1.14 – 4.97);
- APC mutati con VAF < al valore mediano 24.67 mesi (p=0.789; HR 1.15, 95%CI 0.42 – 3.13) vs 24.87 mesi nei pazienti APC mutati con VAF ≥ il valore mediano (p=0.294; HR 1.56, 95%CI 0.68 – 3.66).

La sopravvivenza globale mediana nei pazienti KRAS mutati con un valore di VAF superiore a quello mediano è risultata essere 34.92 mesi, significativamente superiore rispetto a quella dei pazienti KRAS non mutati risultata invece 26.91 mesi (p=0.047; HR 0.60, 95%CI 0.36 – 0.99).

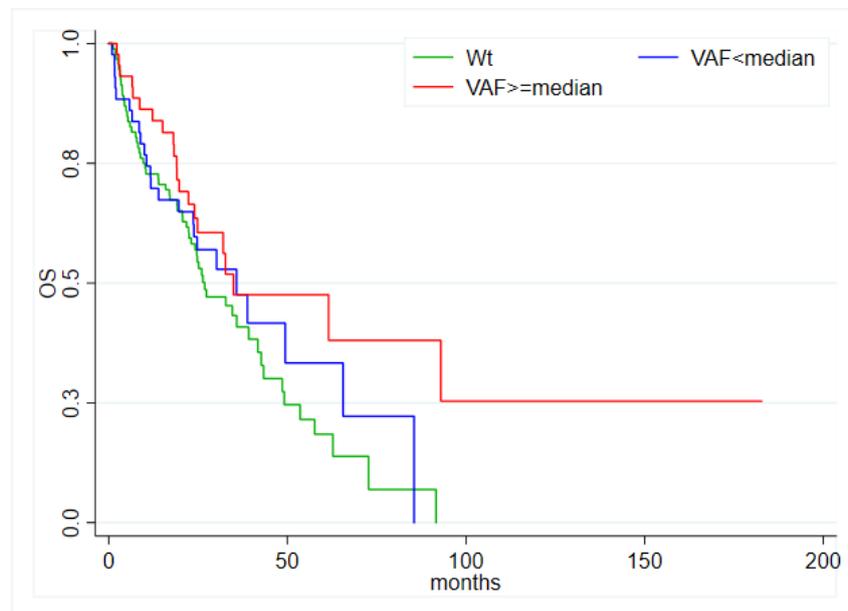


Figura 8 - Correlazione variazione della frequenza allelica VAF dei KRAS mutati e OS

Nel sottogruppo dei pazienti BRAF mutati le mediane di sopravvivenza globale sono risultate significativamente inferiori indipendentemente dal valore della variazione della frequenza allelica. Infatti la sopravvivenza globale mediana nei pazienti BRAF mutati con un valore di VAF superiore a quello mediano è risultata essere 13.9 mesi ($p= 0.021$; HR 2.38, 95%CI 1.14-4.97) e uguale a quella dei pazienti BRAF mutati con un valore di VAF inferiore a quello mediano (13.9 mesi con $p= 0.001$; HR 2.81, 95%CI 1.52- 5.18).

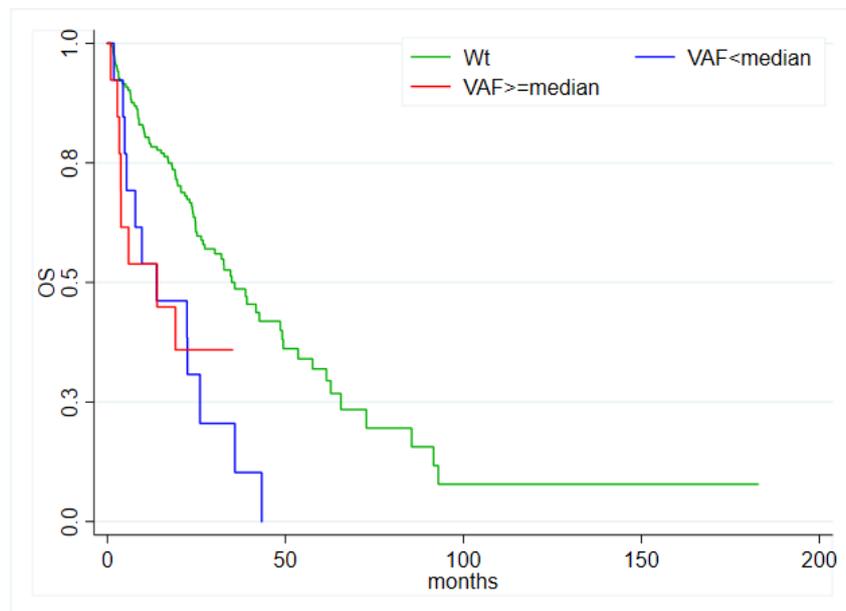


Figura 9 - Correlazione variazione della frequenza allelica VAF dei BRAF mutati e OS

5 Discussione

Ad oggi non ci sono studi di “Real World Evidence” (RWE), basati su dati raccolti di routine durante la normale pratica clinica, che esaminino l'impatto di NGS su un'ampia serie di pazienti con cancro colorettales metastatico. Uno dei maggiori interessi di questo studio è stato quello di esaminare il valore clinico della profilazione genomica con tecniche sequenziamento mirato di ultima generazione in un campione di pazienti trattati e afferiti in maniera sequenziale nelle unità di oncologia romagnole.

Non sono stati identificati nuovi fattori prognostici genomici con questo pannello NGS e la mutazione di BRAF si conferma essere un fattore prognostico negativo come già riportato in letteratura (89,90,91,92). Una possibile causa di ciò è che l'analisi molecolare è stata eseguita sul tumore primario o sulla metastasi senza tener conto come da pratica clinica dell'eterogeneità molecolare e clinica dei pazienti. I tumori hanno diversi profili molecolari e diverse co-alterazioni e la popolazione dello studio non è abbastanza grande da testare tutti i sottogruppi. I pazienti hanno anche storie di malattia diverse, alcuni erano naïve a qualsiasi trattamento e alcuni sono stati pesantemente pretrattati. Sarebbe interessante condurre studi più approfonditi con più pazienti e analizzare meglio i fattori predittivi e prognostici che potrebbero essere scoperti da un accurato pannello NGS.

I limiti di questo studio sono inoltre correlati al pannello NGS ristretto a 52 geni. Pannelli più ampi con possibilità di analisi di centinaia di geni possono infatti individuare un maggior numero di alterazioni molecolari druggable, definire il carico mutazionale del tumore (Tumor Mutational Burden MTB) e rilevare mutazioni sempre più specifiche come quella di POLE predittiva di sensibilità agli immunoterapici.

È stata inoltre rilevata una associazione statisticamente significativa ($p=0.047$; HR 0.60, 95%CI 0.36 – 0.99) fra sopravvivenza globale mediana e mutazioni di KRAS con elevato valore di variazione di frequenza allelica. Questo risultato si discosta dai dati della letteratura che riportano invece un ruolo prognostico negativo delle mutazioni di KRAS nel cancro coloretale metastatico (93, 94, 95, 96, 97), tuttavia non ci sono altri studi clinici che abbiano analizzato tale ruolo prognostico in relazione al valore di variazione della frequenza allelica. La correlazione positiva tra elevata variazione della frequenza allelica delle mutazioni di KRAS e sopravvivenza globale può suggerire una maggiore sensibilità di questo sottogruppo di pazienti ai farmaci chemioterapici e antiangiogenici. Occorre anche precisare che circa la metà dei pazienti con mutazione di KRAS e variazione di frequenza allelica superiore a quello mediano è stata sottoposta a resezioni metastatiche. Quindi il riscontro di mutazioni di KRAS non limita il beneficio né dei trattamenti farmacologici né delle resezioni chirurgiche delle metastasi, in particolare di quelle epatiche che sono le più frequenti.

La definizione della strategia terapeutica delle prime linee di trattamento non è stata modificata dai risultati NGS. Infatti, nella pratica quotidiana la profilazione genomica non ha avuto alcun impatto sullo standard di cura raccomandato che si basa sullo stato mutazionale di KRAS e BRAF e sulla instabilità dei microsatelliti. Pertanto i dati NGS sono stati considerati soprattutto successivamente durante la progressione del cancro al fallimento dei trattamenti standard, in modo da proporre eventualmente l'arruolamento in una sperimentazione clinica o l'utilizzo di una terapia off-label o ad uso terapeutico in pazienti ancora in buone condizioni generali e candidabili a trattamenti farmacologici. Sfortunatamente, molti di questi pazienti pesantemente pretrattati non erano abbastanza idonei per ricevere una nuova linea di trattamento. Questo può spiegare il basso numero di casi di pazienti trattati con terapie a bersaglio molecolare, dato che peraltro riflette la realtà clinica.

4 CONCLUSIONI

La presenza della mutazione del gene BRAF si conferma essere associata a una prognosi peggiore, specificatamente in questa analisi indipendentemente dai valori di variazione della frequenza allelica. I risultati di questo studio non hanno mostrato differenze significative in termini di sopravvivenza tra pazienti con diverso numero di mutazioni, ma sembra che quelli con almeno una mutazione abbiano una prognosi peggiore. Sembra inoltre che le mutazioni del gene KRAS, soprattutto quelle con elevata variazione della frequenza allelica, non limitino il beneficio dei trattamenti farmacologici e delle resezioni metastatiche.

Probabilmente sono necessari sia una dimensione del campione più ampia sia pannelli genici NGS più potenti, che analizzano un maggior numero di geni, per esplorare il valore aggiunto del test di mutazione somatica mediante NGS nei pazienti con carcinoma colorettales metastatico.

La profilazione genomica con pannelli NGS migliora la caratterizzazione molecolare del cancro colorettales e permette di rilevare mutazioni “actionable” o “druggable” in modo da selezionare il farmaco a bersaglio molecolare più efficace. Tali analisi molecolari sono fattibili nella pratica di routine in laboratori di riferimento ad alto volume di attività in modo da ridurre i costi e ampliare il numero di pazienti che possono avere accesso a questi test ad alta processività per la caratterizzazione molecolare dei tumori.

La terapia a bersaglio molecolare nelle forme avanzate di tumore del colon-retto sta diventando un nuovo approccio opzionale sempre più diffuso grazie alla disponibilità di farmaci inibitori selettivi di BRAF , PIK3CA , KRAS G12C, ERBB2 e MET. Si è assistito in questi anni a un grande sviluppo dell’Oncologia di precisione che, attraverso l’identificazione di alterazioni molecolari coinvolte nello sviluppo delle neoplasie, ha permesso di tracciare il profilo genetico-molecolare

delle varie forme tumorali al fine di trattare i pazienti con terapie personalizzate rimborsate, disponibili con sperimentazione clinica, con uso terapeutico nominale oppure disponibili ma non registrate per la specifica indicazione (off-label).

Si rende sempre più necessario quindi centralizzare la profilazione genomica NGS in laboratori di riferimento (HUB) e istituire gruppi di professionisti in grado di valutare ed interpretare i risultati dei test molecolari complessi (Molecular Tumor Board) per identificare alterazioni molecolari che conferiscono sensibilità a specifiche terapie a bersaglio molecolare in sottopopolazioni di pazienti altrimenti difficilmente trattabili.

7 BIBLIOGRAFIA

- 1) Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660
- 2) Carmine Pinto e AIRTUM Working Group Oncologia Medica, Arcispedale S. Maria Nuova – IRCCS di Reggio Emilia). *I Numeri Del Cancro in Italia, 2020.*
- 3) Ahmed, M. Colon Cancer: A Clinician’s Perspective in 2019. *Gastroenterol Res.* 2020; 13 (1): 1-10.
- 4) Bogaert, J.; Prenen, H. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann. Gastroenterol.* 2014, 27, 9-14.
- 5) Wells, K.; Wise Paul E. Hereditary colorectal cancer syndromes. *Surg Clin N Am* 97 (2017) 605-625.
- 6) Kronborg, O.; Fenger, C.; Olsen J. et al. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* 1996; 348 (9040): 1467-71.
- 7) Lindholm, E.; Brevinge, H; Haglind, E. Survival benefit in a randomized clinical trial of faecal occult blood screening for colorectal cancer. *Br J Surg* 2008; 95 (8): 1029-36.
- 8) Atkin, WS.; Edwards, R.; Kralj-Hans, I. et al. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 375 (9726): 1624-33.

- 9) Segnan, N.; Armaroli, P.; Bonelli, L. et al. Once-only sigmoidoscopy in colorectal cancer screening: follow-up findings of the Italian Randomized Controlled Trial--SCORE. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103 (17): 1310-22.
- 10) Schoen, RE.; Pinsky, PF.; Weissfeld, JL. et al. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. *N Eng J Med* 2012; 366: 2345-57.
- 11) Rex, DK.; Boland, CR.; Dornitz, JA. et al. Colorectal Cancer Screening: recommendations for physicians and patients from the US Multi-Society Task force on colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2017; 112 (7): 1016-30.
- 12) Osservatorio nazionale screening: www.osservatorionazionale screening.it
- 13) Gruppo Italiano Screening Coloretale: www.giscor.it
- 14) Gupta, S.; Lieberman, D.; Anderson, JC. et al. Recommendations for follow-up after colonoscopy and polypectomy: A consensus update by the US multi-society task force on colorectal cancer. *Gastroenterology* 2020; 158 (4): 816-7.
- 15) Fearon, ER.; Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990, 61, 759-767.
- 16) Grady, W.M. Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 2005, 33, 684-688.
- 17) Grady, W.M.; Markowitz, SD. Genetic and Epigenetic Alterations in Colon Cancer. *Ann. Rev. Genom. Hum. Genet.* 2002, 3, 101.
- 18) Malki, A.; ElRuz, R.A., Gupta, I.; Allouch, A.; Vranic, S.; Al Moustafa, A-E. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 130.

- 19) Pino, M.S.; Chung, D.C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010, 138, 2059-2072.
- 20) Markowitz, S.D.; Bertagnolli, M.M. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Eng J Med* 2009, 361, 2449-2460.
- 21) Mann, B.; Gelos, M.; Siedow, A. et al. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1603-8.
- 22) Guba, M.; Seeliger, H.; Kleespies, A.; Jauch, K.W.; Bruns, C. Vascular endothelial growth factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2004, 19, 510-517.
- 23) Amelio, I.; Melino, G. The p53 family and the hypoxia-inducible factors (HIFs): Determinants of cancer progression. *Trends Biochem. Sci.* 2015, 40, 425-434.
- 24) Salahshor, S.; Woodgett, JR. The links between axin and carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2005; 58: 225-36.
- 25) Al-Sohaily, S.; Biankin, A.; Leong, R.; Kohonen-Corish, M.; Warusavitarne, J. Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2012 Vol. 27 n. 9 pp. 1423-1431.
- 26) Roskoski, R. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. *Pharmacolog. Res.* 2019, 139, 395-411.
- 27) Liao, X.; Morikawa, T.; Lochhead, P. et al. Prognostic role of PIK3CA mutation in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 2257-68.

- 28) Russo, A.; Bazan, V.; Iacopetta, B. et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7518-28.
- 29) Yurgelun, MB.; Masciari, S.; Joshi, VA. et al. Germline TP53 mutations in patients with early-onset colorectal cancer in the Colon Cancer Family Registry. *JAMA Oncol* 2015; 1: 214-21.
- 30) Geiersbach, KB.; Samowitz, WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med* 2011, 135, 1269-1277.
- 31) Boland, CR.; Goel, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010. Vol 138, n. 6, pp 2073-2087.
- 32) Rajagopalan, H.; Bardelli, A.; Lengauer, C. et al. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002; 418: 934.
- 33) Magzoub, MM.; Prunello, M.; Brennan, K.; Gevaert, O. The impact of DNA methylation on the cancer proteome. *PLoS Comput. Biol.* 2019, 15, 1-19.
- 34) Hesson, L.B.; Wilson, R.; Morton, D.; Adams, C.; Walker, M.; Maher, E.R.; Latif, F. CpG island promoter hypermethylation of a novel Ras-effector gene RASSF2A is an early event in colon carcinogenesis and correlates inversely with K-ras mutations. *Oncogene* 2005, 24, 3987- 3994.
- 35) Kwon HJ, Kim JH, Bae JM, Cho NY, Kim TY, Kang GH. DNA methylation changes in ex-adenoma carcinoma of the large intestine. *Virchows Arch* 2010;457:433-441.
- 36) Rhee, Y.-Y.; Kim, K.-J.; Kang, G.H. CpG island methylator phenotype-high colorectal cancers and their prognostic implications and relationships with the serrated neoplasia pathway. *Gut Liver*, 2017 vol.11, n.1, pp. 38-46

- 37) Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487: 330-7.
- 38) Guinney, J.; Dienstmann, X.; Wang, X. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, 2015; 21: 1350-1356.
- 39) El Bali, M.; Bakkach, J.; Mechita, M.B. Colorectal Cancer: from genetic landscape to targeted therapy. *J Oncol* 2021: 9918116.
- 40) Artale, S.; Sartore-Bianchi, A.; Veronese, SM. et al. Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4217-9.
- 41) Knijn, N.; Mekenkamp, L.J.; Klomp, M. et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer*, 2011; 104: 1020-6.
- 42) Normanno, N.; Tejpar, S.; Morgillo, F. et al. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 519-27.
- 43) Amado, RG.; Wolf, M.; Peeters, M. et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1626-34.
- 44) Karapetis, CS.; Khambata-Ford, S.; Jonker, DJ. et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Eng J Med*. 2008; 359: 1757-65.
- 45) Van Cutsem, E.; Kohne, CH.; Hitre, E. et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Eng J Med*. 2009; 360: 1408-17.
- 46) Bokemeyer, C.; Bondarenko, I.; Hartmann, JT. et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol* 2011; 22:1535-46.

- 47) Maughan, TS.; Adams, RA.; Smith, CG. et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet* 2011; 377:2103-14.
- 48) Van Cutsem, E.; Lenz, HJ.; Khone, CH. et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33: 692-700.
- 49) Douillard, JY.; Siena, S.; Cassidy, J. et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4697-4705.
- 50) Seymour, MT.; Brown, SR.; Middleton, G. et al. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial. *Lancet Oncol.* 2013; 14: 749- 59.
- 51) Stintzing, S.; Modest, DP.; Rossius, L. et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17: 1426-34.
- 52) Schwartzberg, LS.; Rivera, F.; Karthaus, M. et al. PEAK: a randomized, multicenter phase III study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2014; 32:2240-47.
- 53) Sorich, MJ.; Wiese, MD.; Rowland, A. et al. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol* 2015; 26: 13-21.

- 54) Tran, B.; Kopetz, S.; Tie, J. et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011; 117: 4623-32.
- 55) Yokota, T.; Ura, T.; Shibata, N. et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2011; 104:856-62.
- 56) Tol, J.; Nagtegaal ID.; Punt, CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. *N Eng J Med* 2009; 361: 98-9.
- 57) Evrard, C.; Tachon, G.; Randrian, V.; Karayan-Tapon, L.; Tougeron, D. Microsatellite instability: diagnosis, heterogeneity, discordance and clinical impact in colorectal cancer. *Cancers* 2019, 11: 1567.
- 58) Ganesh, K.; Stadler, ZK.; Cercek, A. et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019; 16 (6):361-75.
- 59) Sartore-Bianchi, A.; Trusolino, L.; Martino, C. et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/12 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17:738-46.
- 60) Meric-Bernstam, F.; Hurwitz, H.; Raghav, KPS. et al. Pertuzumab plus trastuzumab for HER2-amplified metastatic colorectal cancer (MyPathway): an updated report from a multicentre, open-label, phase 2a, multiple basket study. *Lancet Oncol*, 2019; 20(4):518-30.
- 61) Cocco, E.; Scaltrini, M.; Drilon, A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018; 15(12): 731-47.

- 62) Glimelius, B.; Pahlman, L.; Graf, W. et al. Expectancy of primary chemotherapy in patients with advanced asymptomatic colorectal cancer: a randomized trial. *JCO* 1992; 10:904-11.
- 63) Hurwitz, H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W. et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Eng J Med* 2004; 350:2335-42.
- 64) Saltz, LB.; Clarke, S.; Diaz-Rubio, E. et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 2008; 26:2013-9.
- 65) Loupakis, F.; Cremolini, C.; Masi, G. et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Eng J Med* 2014; 371:1609-18.
- 66) Cunningham, D.; Lang, I.; Marcuello, E. et al. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013; 14:1077-85.
- 67) Chen, Y.; Yan, Q.; Kuang, J. et al. Efficacy of adding bevacizumab in the first-line chemotherapy of metastatic colorectal cancer: evidence from seven randomized clinical trials. *Gastroenterol Res Pract.* 2014; 594930.
- 68) Passardi A, Nanni O, Tassinari D, Turci D, Cavanna L, Fontana A, Ruscelli S, Mucciarini C, Lorusso V, Ragazzini A, Frassinetti G L, Amadori D. Effectiveness of bevacizumab added to standard chemotherapy in metastatic colorectal cancer: final results for first-line treatment from the ITACa randomized clinical trial. *Ann Oncol.* 2015 Jun;26(6):1201-1207. doi: 10.1093/annonc/mdv130. Epub 2015 Mar 3.

- 69) Holch, J.; Ricard, L.; Stintzing, S. et al. The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of first-line clinical trials. *Eur J Cancer* 2017; 70:87-98.
- 70) Cremolini, C.; Antoniotti, C.; Rossini, D.; Lonardi, S.; Loupakis, F.; Pietrantonio, F. et al. Upfront FOLFOXIRI plus bevacizumab and reintroduction after progression versus mFOLFOX6 plus bevacizumab followed by FOLFIRI plus bevacizumab in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer (TRIBE2): a multicentre, open-label, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol* 2020; 21(4):497-507.
- 71) Le, DT.; Kim, TW.; Van Cutsem, E.; Geva, R. et al. Phase II open-label study of pembrolizumab in treatment-refractory, microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer: KEYNOTE-164. *J Clin Oncol.* 2020; 38(1):11-19.
- 72) Overman, MJ.; McDermott, R.; Leach, JL.; Lonardi, S. et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2017;18(9):1182- 1191.
- 73) André, T.; Shiu, KK.; Kim, TW.; Jensen, BV. et al. Pembrolizumab in microsatellite-instability-high advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2020;383(23):2207-2218.
- 74) Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, et al. Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair-deficient/ microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36:773-779.
- 75) Cremolini, C.; Antoniotti, C.; Stein, A.; Bendell, J.; Gruenberger, T. et al. Individual patient data meta-analysis of FOLFOXIRI plus bevacizumab versus doublets plus bevacizumab as initial therapy of unresectable metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2020 20: JCO2001225.

- 76) Pietrantonio, F.; Cremolini, C.; Petrelli, F.; Di Bartolomeo, M.; Loupakis, F.; Maggi, C.; Antoniotti, C.; de Braud, F.; Falcone, A.; Iacovelli, R. First-line anti-EGFR monoclonal antibodies in panRAS wild-type metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015;96(1):156-66.
- 77) Kopetz, S.; Grothey, A.; Yaeger, R.; Van Cutsem, E.; Desai, J.; Yoshino, T. et al. Encorafenib, binimetinib, and cetuximab in BRAF-V600E mutated-colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(17):1632-1643.
- 78) Simkens, L.; Tinteren, H.; May, A. et al. Maintenance treatment with capecitabine and bevacizumab in metastatic colorectal cancer (CAIRO3): a phase 3 randomised controlled trial of the Dutch colorectal cancer group. *Lancet* 2015; 385:1843-52.
- 79) Hegewish-Becker, S.; Graeven, U.; Lerchenmuller, CA. et al. maintenance strategies after first-line oxaliplatin plus fluoropyrimidine plus bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer (AIO 0207): a randomised, non-inferiority, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(13):1355-69.
- 80) Aranda, E.; Garcia-Alfonso, P.; Benavides, M. et al. First-line mFOLFOX plus cetuximab followed by mFOLFOX plus cetuximab or single-agent cetuximab as maintenance therapy in patients with metastatic colorectal cancer: phase II randomised MACRO2 TTD study. *Eur J Cancer* 2018; 101:263-72.
- 81) Pietrantonio, F.; Morano, F.; Corallo, S. et al. Maintenance therapy with panitumumab alone vs panitumumab plus fluorouracil-leucovorin in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer: a phase 2 randomized clinical trial. *JAMA* 2019. 1467.

- 82) Bennouna, J.; Sastre, J.; Arnold, D. et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013; 14 (1):29-37.
- 83) Masi, G.; Salvatore, L.; Boni, L. et al. Continuation or reintroduction of bevacizumab beyond progression to first-line therapy in metastatic colorectal cancer: final results of the randomized BEBYP trial. *Ann Oncol* 2015; 26:724-30.
- 84) Van Cutsem, E.; Tabernero, J.; Lakomy, R. et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol* 2012; 30(28):3499-506.
- 85) Cremolini, C.; Rossini, D.; Dell'Aquila, E. et al. Rechallenge for patients with RAS and BRAF wild-type metastatic colorectal cancer with acquired resistance to first-line cetuximab and irinotecan. *JAMA Oncology* 2019; 5(3):343-50.
- 86) Van Cutsem, E.; Peeters, M.; Siena, S. et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(13):1658-64.
- 87) Grothey, A.; Van Cutsem, E.; Sobrero, A. et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicenter, randomized, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013; 381:303-312.
- 88) Mayer, R.J.; Van Cutsem, E.; Falcone, A. et al. Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. *N Eng J Med* 2015; 372:1909-19.

- 89) Grothey, A.; Fakhri, M.; Tabernero, J. Management of BRAF-mutant metastatic colorectal cancer: a review of treatment options and evidence-based guidelines. *Ann Oncol* 2021; 32:959-67.
- 90) Morris, V.; Overman, MJ.; Jiang, Z-Q. et al. Progression-free survival remains poor over sequential lines of systemic therapy in patients with BRAF-mutated colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2014;13: 164-71.
- 91) Tran, B.; Kopetz, S.; Tie, J. et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011;117:4623-32.
- 92) Clarke, CN.; Kopetz, ES. BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. *J Gastrointest Oncol* 2015;6: 660-7.
- 93) Modest, DP.; Ricard, I.; Heinemann, V. et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol.* 2016;27(9):1746-1753.
- 94) Vincenzi, B.; Cremolini, C.; Sartore-Bianchi, A. et al. Prognostic significance of K-Ras mutation rate in metastatic colorectal cancer patients. *Oncotarget* 2015; 6: 31604–31612.
- 95) Tosi, F.; Magni, E.; Siena, S. et al. Effect of KRAS and BRAF Mutations on Survival of Metastatic Colorectal Cancer After Liver Resection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Colorectal Cancer.* 2017;16(3):e153-e163.
- 96) Imamura, Y.; Morikawa, T.; Liao, X.; Lochhead, P.; Kuchiba, A.; Yamauchi, M. et al. Specific mutations in KRAS codons 12 and 13, and patient prognosis in 1075 BRAF wild-type colorectal cancers. *Clin Cancer Res.* 2012;18:4753–63.

97) Passiglia, F.; Bronte, G.; Bazan. V.; Galvano, A.; Vincenzi, B.; Russo, A. Can KRAS and BRAF mutations limit the benefit of liver resection in metastatic colorectal cancer patients? A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol*. 2016; 99:150-157.