



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**L'EVOLUZIONE DELL'ONCOLOGIA DI PRECISIONE:
LA TERAPIA AGNOSTICA**

Relatrice:
Chiar.Ma Prof Adriana Chilin

Laureanda:
Camilla de Stanchina
Matricola 1167065

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

SOMMARIO

RIASSUNTO	1
INTRODUZIONE.....	2
DEFICIT DI RIPARAZIONE DEL MISMATCH DEL DNA E ALTA INSTABILITÀ DEI MICROSATELLITI	3
<i>1.1. Definizione di microsatelliti, instabilità dei microsatelliti, sistema mismatch repair e deficienza del mismatch repair.</i>	<i>4</i>
<i>1.2. Pembrolizumab</i>	<i>6</i>
<i>1.3. Nivolumab</i>	<i>9</i>
<i>1.4. Diagnosi dMMR/MSI-H.....</i>	<i>11</i>
TUMOR MUTATIONAL BURDEN (TMB)	16
<i>2.1. Pembrolizumab</i>	<i>17</i>
<i>2.2. Relazione tra MSI e TMB.....</i>	<i>18</i>
NTRK	20
<i>3.1. Fusione del gene NTRK.....</i>	<i>21</i>
<i>3.2. Larotrectinib.....</i>	<i>23</i>
<i>3.3. Entrectinib.....</i>	<i>25</i>
<i>3.4. Diagnosi</i>	<i>27</i>
RET.....	29
<i>4.1. Riarrangiamenti di RET.....</i>	<i>30</i>
<i>4.2. Le mutazioni di RET.....</i>	<i>30</i>
<i>4.3. Pralsetinib</i>	<i>31</i>
<i>4.4. Selpercatinib.....</i>	<i>36</i>
<i>4.5. Diagnosi</i>	<i>40</i>
MOLECULAR TUMOR BOARD	42
<i>5.1. Componenti del MTB.....</i>	<i>43</i>
<i>5.2. Selezione dei pazienti candidati alla valutazione del profilo molecolare da sottoporre al MTB.....</i>	<i>45</i>
<i>5.3. Scelta del campione biologico.....</i>	<i>47</i>
<i>5.4. Test di profilazione genomica.....</i>	<i>47</i>
<i>5.5. Classificazione delle mutazioni ESCAT.....</i>	<i>49</i>
<i>5.6. Trattamento dei dati e coinvolgimento dei pazienti</i>	<i>51</i>

CONCLUSIONI	53
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	54

RIASSUNTO

La terapia agnostica si basa sullo studio delle alterazioni genetiche superando il classico modello istologico che, invece, si basa sulla localizzazione del tumore. I farmaci con approvazione agnostica sono studiati per agire su una specifica mutazione indipendentemente da quale sia la sede del tumore, dall'età o dal sesso del paziente e vengono valutati come terapia per i pazienti con tumori rari oppure in quelli che hanno esaurito i trattamenti disponibili. L'obiettivo principale di queste terapie di precisione è il miglioramento dell'outcome clinico e minimizzare gli effetti collaterali. Attraverso tecniche di profilazione genomica avanzata si possono identificare le alterazioni molecolari responsabili della neoplasia che permettono di individuarne le caratteristiche e di personalizzare la terapia. L'interpretazione del profilo genomico del tumore e la conseguente scelta della terapia sono l'obiettivo principale del Molecular Tumor Board (MTB), un team multidisciplinare che coinvolge più figure professionali che collaborano insieme per individuare il trattamento ottimale per un paziente sulla base delle conoscenze scientifiche più avanzate.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, il progresso della medicina di precisione ha modificato l'approccio terapeutico contro il cancro. L'oncologia di precisione si basa sulle caratteristiche del singolo paziente a partire da una precisa diagnosi fino ad arrivare ad una terapia personalizzata che agisca in modo efficace contro il tumore e migliori la condizione del paziente, aumentandone l'aspettativa di vita.

Fino ad ora, la scelta delle strategie terapeutiche avveniva sulla base delle caratteristiche clinico-patologiche del paziente, della caratterizzazione istologica del tumore, degli studi clinici condotti su ampie popolazioni non selezionate e dell'esperienza dei clinici.

Lo sviluppo di metodologie diagnostiche all'avanguardia in campo genetico, come la *next generation sequencing*, permettono di individuare nei tumori le alterazioni molecolari responsabili della malattia. Queste alterazioni rappresentano il target per le terapie mirate, portando alla ricerca e allo sviluppo di farmaci specifici, selezionando i pazienti con maggiore probabilità di trarre beneficio da esse prevenendo le recidive.¹

Oggi, si preferisce trattare i tumori con un approccio di tipo *agnostico*, indipendentemente dall'origine e dalla sede di essi, ma basandosi sulle alterazioni genetiche individuate in sede di sequenziamento; da questo, deriva la definizione di *terapia agnostica*.

I biomarcatori agnostici sono il deficit di riparazione del mismatch repair del DNA, l'alta instabilità dei microsatelliti, l'elevato carico mutazionale, le fusioni del gene NTRK e le fusioni e le mutazioni a carico di RET. Sulla base di queste alterazioni sono stati sviluppati numerosi farmaci e la ricerca è in continua evoluzione per individuare nuovi target e i corrispondenti farmaci efficaci.

I farmaci con indicazione agnostica approvati fino ad ora sono Pembrolizumab, Nivolumab, Larotrectinib, Entrectinib, Pralsetinib e Selpercatinib.

CAPITOLO I
DEFICIT DI RIPARAZIONE DEL MISMATCH DEL DNA E ALTA
INSTABILITÀ DEI MICROSATELLITI

L'immuno-oncologia ha dato inizio a una nuova era nel trattamento dei tumori, basandosi sul potenziamento della risposta immunitaria nei pazienti andando ad agire in modo mirato ed efficace contro uno specifico tipo di cancro ottenendo benefici clinici significativi.²

L'applicazione clinica dei trattamenti immunoterapici è limitata ad alcuni tipi di tumori solidi; in altri tipi di tumori in cui si hanno bassi tassi di risposta l'efficacia risulta bassa. L'utilizzo di biomarcatori diventa necessario per distinguere i pazienti sensibili e prevedere la risposta terapeutica. Alcuni biomarcatori predittivi di risposta sono:

- l'espressione del recettore o del suo ligando di morte programmato 1 (PD-1/PD-L1),
- il carico mutazionale del tumore (TMB),
- il numero di linfociti infiltranti il tumore (TIL),
- la conta dei linfociti nel sangue periferico,
- il deficit di riparazione (dMMR),
- l'alta instabilità dei microsatelliti (MSI-H).

Tumori con alti livelli di dMMR o MSI-H sembrerebbero essere sensibili all'immunoterapia, infatti i relativi biomarcatori mostrano vantaggi unici, indipendentemente dalla sede di origine e dal tipo di tumore.³

L'elemento chiave, per l'importante sviluppo dell'immunoterapia, è stata la scoperta degli inibitori del checkpoint immunitario (immune checkpoint inhibitors, ICI), molecole coinvolte nei meccanismi che consentono alle cellule tumorali di evadere il controllo del sistema immunitario. Queste molecole possono diventare bersaglio di anticorpi monoclonali che inibiscono i checkpoint immunitari e riattivano la risposta antitumorale.²

Gli inibitori del checkpoint non uccidono direttamente le cellule tumorali ma forniscono un aiuto al sistema immunitario per trovare e attaccare le cellule tumorali. Essi si possono legare selettivamente al recettore posto sulle cellule T oppure al ligando presente sulla cellula cancerosa.⁴

Nella figura 1 è rappresentata l'attivazione della risposta antitumorale indotta dalle alterazioni molecolari a livello del sistema MMR in diversi tumori solidi che provoca la formazione ed esposizione dei neoantigeni sulla superficie cellulare.

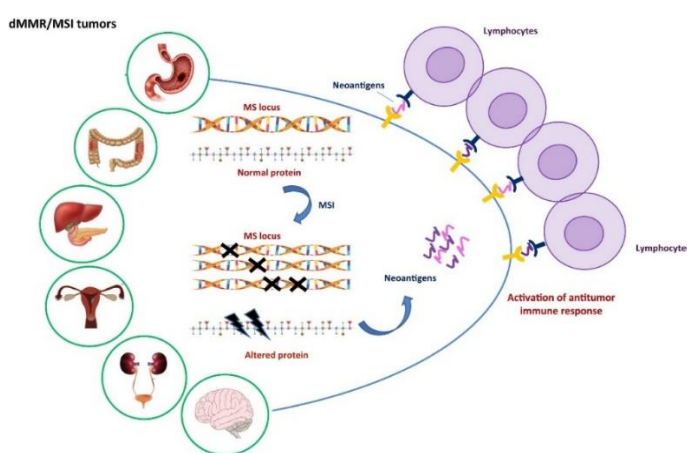


Figura 1. Attivazione della risposta immunitaria

Fanale, D.; Corsini, L. R.; Scalia, R.; Brando, C.; Cucinella, A.; Madonia, G.; Dimino, A.; Filorizzo, C.; Barraco, N.; Bono, M.; et al. Can the tumor-agnostic evaluation of MSI/MMR status be the common denominator for the immunotherapy treatment of patients with several solid tumors? *Crit Rev Oncol Hematol* 2022, 170, 103597. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2022.103597

1.1. Definizione di microsatelliti, instabilità dei microsatelliti, sistema mismatch repair e deficienza del mismatch repair.

Le “raccomandazioni ESMO sui test di instabilità dei microsatelliti per l’immunoterapia nel cancro e la sua relazione con l’espressione di PD-1/PD-L1 e il carico mutazionale del tumore” sono basate su di una revisione sistematica eseguita dal gruppo di lavoro per la ricerca traslazionale e la medicina di precisione dell’ESMO (European Society for Medical Oncology) con l’obiettivo di definire le migliori pratiche per implementare il rilevamento di tumori dMMR nella pratica clinica. Queste raccomandazioni forniscono delle definizioni relative al concetto di

MSI e dMMR, sui metodi da utilizzare per l'analisi di MSI e dMMR e sulle relazioni di espressione tra MSI, TMB e PD-1/PD-L1.

Secondo queste raccomandazioni, la definizione standardizzata di microsatelliti risulta essere: *“i microsatelliti, chiamati anche brevi ripetizioni tandem, sono sequenze di DNA ripetitive che sono distribuite lungo il genoma, sia nelle regioni codificanti che non codificanti. I microsatelliti sono sequenze ripetitive, composte da ripetizioni di una sequenza che varia in lunghezza da una a sei basi. Sebbene siano altamente polimorfici tra soggetti diversi (il numero di ripetizioni della sequenza varia da individuo a individuo), i microsatelliti hanno tipicamente la stessa lunghezza nel DNA germinale del paziente e nel DNA somatico del loro tumore. La loro natura ripetitiva li rende particolarmente sensibili agli errori di mismatching del DNA, che possono verificarsi durante la replicazione del DNA o il danno iatrogeno”*.

L'instabilità microsatellitare (MSI) viene così definita: *“un MSI è una condizione di ipermutabilità genetica risultante da un MMR del DNA difettoso. È caratterizzato dal raggruppamento di mutazioni nei microsatelliti tipicamente costituiti da alterazioni della lunghezza della ripetizione. La presenza di MSI rappresenta un'evidenza fenotipica che l'MMR non funziona normalmente”*.

Si definisce mismatch repair del DNA come segue: *“il DNA MMR è un meccanismo altamente conservato utilizzato per ripristinare l'integrità del DNA dopo il verificarsi di errori di mancata corrispondenza, inclusi disallineamenti di singole basi o brevi inserimenti ed eliminazioni. Quattro geni che svolgono un ruolo fondamentale in questo processo includono: MLH1 (mutL omologo 1), MSH2 (mutS omologo 2), MSH6 (mutS omologo 6) e PMS2 (segregazione postmeiotica aumentata 2). Le quattro proteine omonime MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 codificate da questi geni funzionano negli eterodimeri, vale a dire MLH1-PMS2 e MSH2-MSH6. L'inattivazione di uno di questi geni, che può verificarsi a causa di mutazioni germinali e/o somatiche o per silenziamento epigenetico, determina un meccanismo MMR difettoso (dMMR)”*.

PMS2 può formare un eterodimero solo con MLH1, MSH6 può formare un eterodimero solo con MSH2, mentre MLH1 e MSH2, essendo partner obbligatori

degli eterodimeri, possono formare eterodimeri con altre proteine MMR: MSH3, MLH3 e PMS1.

In generale, le mutazioni in MLH1 e MSH2 provocano una successiva degradazione proteolitica della proteina mutata e del suo partner secondario, rispettivamente PMS2 e MSH6. Al contrario, le mutazioni in PMS2 e MSH6 potrebbero non provocare la degradazione proteolitica del suo partner primario, poiché MSH6 può essere sostituito nell'eterodimero da MSH3 e PMS2 può essere sostituito nell'eterodimero da PMS1 o MLH3.

Le raccomandazioni ESMO hanno inoltre identificato una definizione per i tumori con MSI o dMMR: *“Un tumore dMMR è un tumore che accumula migliaia di mutazioni, particolarmente raggruppate nei microsatelliti e consistenti in alterazioni della lunghezza ripetuta, con conseguente MSI. Pertanto, MSI è un marker di dMMR e caratterizza uno stato ipermutabile delle cellule.”*⁵

1.2. Pembrolizumab

Nel 2017 la Food and Drug Administration (FDA) ha concesso un'approvazione accelerata per il farmaco Keytruda, contenente il principio attivo *pembrolizumab*. Pembrolizumab è il primo principio attivo approvato con indicazione agnostica per pazienti adulti e pediatrici con tumori solidi non resecabili o metastatici con alta instabilità dei microsatelliti (MSI-H) o con deficit di riparazione (dMMR), progrediti dopo un precedente trattamento e privi di opzioni terapeutiche alternative soddisfacenti e in pazienti con carcinoma del colon-retto MSI-H o dMMR progredito a seguito del trattamento con fluoropirimidina, oxaliplatino ed irinotecano.³ Si tratta di un anticorpo monoclonale che inibisce il legame tra il recettore PD-1 (programmed death 1) e il suo ligando PD-L1, aumentando così la risposta antitumorale da parte delle cellule T. La proteina PD-L1 viene prodotta da alcuni tipi tumori e si lega al recettore PD-1 posto sulla cellula T per spegnerne l'attività, quindi bloccare il sistema immunitario impedendo la risposta antitumorale. Pembrolizumab si lega al recettore PD-1 impedendo il legame della

cellula tumorale al linfocita T, attivando la risposta immunitaria.⁶ Nella figura 2 viene illustrato il meccanismo d'azione di Pembrolizumab come ICI.

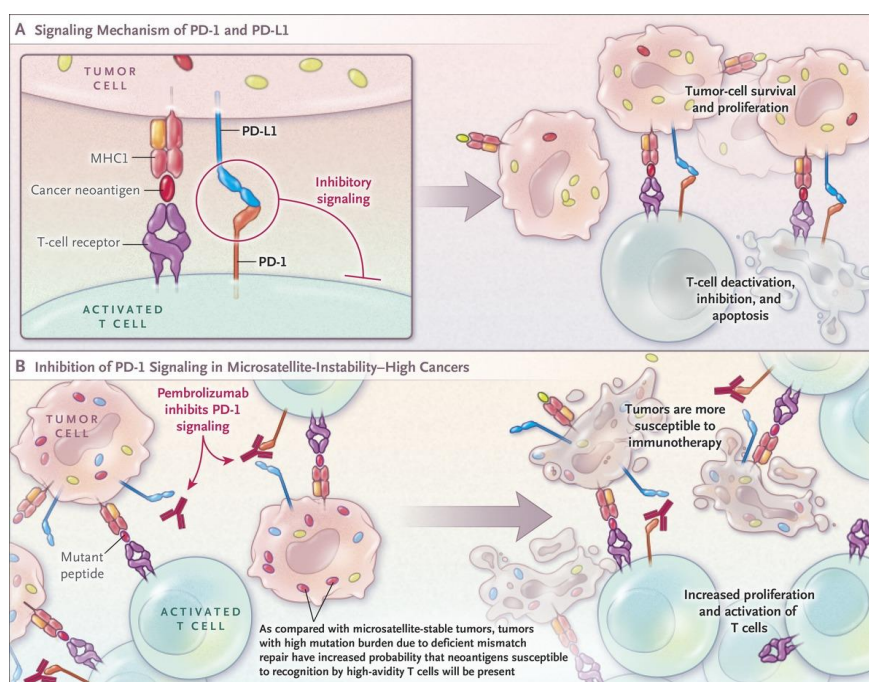


Figura 2. Meccanismo d'azione degli inibitori di PD-1 nei tumori con MSI

Lemery, S.; Keegan, P.; Pazdur, R. First FDA Approval Agnostic of Cancer Site - When a Biomarker Defines the Indication. *N Engl J Med* **2017**, 377 (15), 1409-1412. DOI: 10.1056/NEJMp1709968.

Le cellule tumorali carenti di mismatch repair (dMMR) contengono un numero elevato di mutazioni che determinano la formazione di neoantigeni sulla superficie di esse. La presenza di questi neoantigeni può essere rilevata dai linfociti infiltranti il tumore (TIL), che riconoscono specificamente questi epitopi e innescano risposte immunitarie specifiche contro il tumore. Il riconoscimento dell'antigene tumorale da parte dei TIL porta ad un aumento dei livelli di espressione di PD-L1 sulle cellule tumorali, migliorando la risposta agli inibitori del checkpoint immunitario, come pembrolizumab.¹

L'efficacia del farmaco Keytruda e la conseguente approvazione da parte della FDA si basava sullo studio di pazienti con tumori solidi MSI-H o dMMR arruolati in uno dei cinque studi clinici randomizzati, aperti, multi-coorte, multicentrici, a singolo braccio. La somministrazione di pembrolizumab prevedeva un dosaggio di 200 mg ogni 3 settimane o 10 mg/kg ogni 2 settimane.⁷

Il trattamento è continuato fino tossicità accettabile o progressione della malattia.³
 La durata massima del trattamento è stata di 24 mesi. In tabella 1 sono riassunti i 5 studi clinici presi in considerazione per l'approvazione di questo farmaco.⁷

Study	Design and Patient Population	Number of Patients	MSI-H/dMMR Testing	Dosage	Prior Therapy
KEYNOTE-016 NCT01876511	<ul style="list-style-type: none"> prospective, investigator-initiated 6 sites patients with CRC and other tumors 	28 CRC 30 non-CRC	local PCR or IHC	10 mg/kg every 2 weeks	<ul style="list-style-type: none"> CRC: ≥ 2 prior regimens Non-CRC: ≥ 1 prior regimen
KEYNOTE-164 NCT02460198	<ul style="list-style-type: none"> prospective international multi-center CRC 	61	local PCR or IHC	200 mg every 3 weeks	Prior fluoropyrimidine, oxaliplatin, and irinotecan +/- anti-VEGF/EGFR mAb
KEYNOTE-012 NCT01848834	<ul style="list-style-type: none"> retrospectively identified patients with PD-L1-positive gastric, bladder, or triple-negative breast cancer 	6	central PCR	10 mg/kg every 2 weeks	≥ 1 prior regimen
KEYNOTE-028 NCT02054806	<ul style="list-style-type: none"> retrospectively identified patients with PD-L1-positive esophageal, biliary, breast, endometrial, or CRC 	5	central PCR	10 mg/kg every 2 weeks	≥ 1 prior regimen
KEYNOTE-158 NCT02626067	<ul style="list-style-type: none"> prospective international multi-center enrollment of patients with MSI-H/dMMR non-CRC retrospectively identified patients who were enrolled in specific rare tumor non-CRC cohorts 	19	local PCR or IHC (central PCR for patients in rare tumor non-CRC cohorts)	200 mg every 3 weeks	≥ 1 prior regimen
Total		149			

CRC = colorectal cancer
 PCR = polymerase chain reaction
 IHC = immunohistochemistry

Tabella 1. Studi clinici MSI-H

Keytruda (pembrolizumab) highlights of prescribing information. FDA. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/125514s121s122lbl.pdf

L'approvazione si basava sui dati di 149 pazienti con tumori MSI-H o dMMR arruolati nei 5 studi clinici: 90 pazienti avevano un carcinoma del colon-retto e 59 pazienti avevano diversi tipi di tumore; come riportato in tabella 2.³

	N	Objective Response Rate n (%)	95% CI	Duration of Response range (months)
CRC	90	32 (36%)	(26%, 46%)	(1.6+, 22.7+)
Non-CRC	59	27 (46%)	(33%, 59%)	(1.9+, 22.1+)
Endometrial cancer	14	5 (36%)	(13%, 65%)	(4.2+, 17.3+)
Biliary cancer	11	3 (27%)	(6%, 61%)	(11.6+, 19.6+)
Gastric or GE junction cancer	9	5 (56%)	(21%, 86%)	(5.8+, 22.1+)
Pancreatic cancer	6	5 (83%)	(36%, 100%)	(2.6+, 9.2+)
Small intestinal cancer	8	3 (38%)	(9%, 76%)	(1.9+, 9.1+)
Breast cancer	2	PR, PR		(7.6, 15.9)
Prostate cancer	2	PR, SD		9.8+
Bladder cancer	1	NE		
Esophageal cancer	1	PR		18.2+
Sarcoma	1	PD		
Thyroid cancer	1	NE		
Retroperitoneal adenocarcinoma	1	PR		7.5+
Small cell lung cancer	1	CR		8.9+
Renal cell cancer	1	PD		

CR = complete response
 PR = partial response
 SD = stable disease
 PD = progressive disease
 NE = not evaluable

Tabella 2. Risposta in base al tipo di tumore

Keytruda (pembrolizumab) highlights of prescribing information. FDA. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/125514s121s122lbl.pdf

L'ORR è stato del 39,6% (IC al 95%: 31,7, 47,9); la durata di risposta è stata uguale o superiore ai 6 mesi per il 78% dei pazienti. Le risposte complete sono il 7,4% che corrisponde ad 11 pazienti mentre le risposte parziali sono state il 32,2% cioè 48. I risultati sono riportati in tabella 3.⁷

Endpoint	KEYTRUDA n=149
Objective Response Rate	
ORR (95% CI)	39.6% (31.7, 47.9)
Complete response rate	7.4%
Partial response rate	32.2%
Duration of Response	
Median in months (range)	NR (1.6+, 22.7+)
% with duration ≥6 months	78%

NR = not reached

Tabella 3. Risultati dei pazienti con tumori MSI-H/dMMR

Keytruda (pembrolizumab) highlights of prescribing information. FDA. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/125514s121s122lbl.pdf

La prescrizione di pembrolizumab prevede una limitazione: non è concessa nei pazienti pediatrici con tumori del sistema nervoso centrale MSI-H dove la sicurezza e l'efficacia del farmaco non è stata stabilita.³

Pembrolizumab ha ricevuto un'indicazione agnostica ai tessuti anni dopo aver ottenuto l'iniziale indicazione tessuto-specifica nel melanoma. Attraverso continui studi clinici l'approvazione si è estesa ad altre apporvazioni specifiche in base al tipo di cancro fino ad arrivare a quella agnostica con l'identificazione di MSI-H/dMMR come un biomarcatore di risposta.⁸

1.3. Nivolumab

Nel 2017 la FDA ha concesso l'approvazione accelerata anche Opdivo, contenente il principio attivo *nivolumab*, anticorpo monoclonale che ha lo stesso meccanismo d'azione di pembrolizumab in quanto agisce anch'esso sul recettore PD-1. Opdivo, come singolo agente, è indicato per il trattamento di pazienti adulti e pediatrici con un'età pari o superiore a 12 anni con carcinoma coloretale metastatico (CRC) con alta instabilità dei microsatelliti (MSI-H) o deficit del mismatch repair (dMMR)

che è progredito in seguito al trattamento con fluoropirimidina, oxaliplatino ed irinotecano.⁹

L'approvazione si è basata sui dati dello studio CHECKMATE 142 (NCT02060188), uno studio multicentrico, non randomizzato, a più coorti parallele, in aperto condotto in 53 pazienti con carcinoma del colon-retto metastatico con dMMR o MSI-H progrediti alla chemioterapia standard.³

La dose di nivolumab somministrata ai pazienti era di 3 mg/kg per infusione endovenosa ogni 2 settimane fino a tossicità inaccettabile o progressione radiografica.⁹

Come riportato in tabella 4, l'ORR è stato del 28% (IC 95%: 17, 42). Il 67% (IC 95%: 38, 88) dei pazienti ha ottenuto risposte della durata uguale o superiore a 6 mesi. L'1,9%, corrispondente a 1, ha avuto risposta completa, il 26%, cioè 14 pazienti, ha avuto risposte parziali. Le percentuali di PFS e OS a 12 mesi erano del 50% e il 73%.³

Nel 2018 è stato approvato *nivolumab* in combinazione con *ipilimumab* per il trattamento di pazienti adulti e pediatrici con un'età uguale o superiore a 12 anni per il trattamento di CRC metastatico con MSI-H o dMMR che è progredito dopo il trattamento con fluoropirimidina, oxaliplatino ed irinotecano. Queste indicazioni hanno ottenuto un'approvazione accelerata basata sul tasso di risposta globale e sulla durata della risposta.⁹

Ipilimumab è un anticorpo monoclonale, anch'esso inibitore del checkpoint immunitario che agisce bloccando il recettore CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) posto sui linfociti T, impedendo il legame dei ligandi B7-1 o B7-2 delle cellule tumorali che andrebbero a bloccare la risposta immunitaria. L'approvazione seguiva i dati dello studio CHECKMATE 142 (NCT 02060188), menzionato in precedenza, in cui sono stati arruolati 82 pazienti con dMMR o MSI-H CRC metastatico progrediti alla chemioterapia standard.³ La dose somministrata ai pazienti è stata: ipilimumab 1 mg/kg per infusione endovenosa (IV) e nivolumab 3 mg/kg IV ogni 3 settimane per 4 dosi, seguito da nivolumab 3 mg/kg IV come

agente singolo ogni 2 settimane, fino a tossicità inaccettabile o progressione radiografica.⁹

Tra questi 82 pazienti, il tasso di risposta globale (ORR) è stato del 46% (IC 95%: 35,58), le risposte complete sono state del 3,7% pari a 3 pazienti, mentre le risposte parziali il 43%, corrispondente a 35 pazienti. Come riportato in tabella 4, l'89% dei pazienti che hanno risposto ha avuto una durata di risposta uguale o maggiore di 6 mesi.³

Confrontando l'ORR della coorte di 53 pazienti trattata solo con nivolumab e quella della coorte di 82 pazienti trattati con nivolumab in associazione con ipilimumab, si nota che l'ORR di quest'ultima era superiore in quanto si era ottenuta una risposta del 46% rispetto al 28% della prima coorte.

	OPDIVO MSI-H/dMMR Cohort		OPDIVO + Ipilimumab MSI-H/dMMR Cohort	
	All Patients (n=74)	Prior Treatment (Fluoropyrimidine, Oxaliplatin, and Irinotecan) (n=53)	All Patients (n=119)	Prior Treatment (Fluoropyrimidine, Oxaliplatin, and Irinotecan) (n=82)
IRRC Overall Response Rate; n (%)	24 (32%)	15 (28%)	58 (49%)	38 (46%)
(95% CI) ^a	(22, 44)	(17, 42)	(39, 58)	(35, 58)
Complete Response (%)	2 (2.7%)	1 (1.9%)	5 (4.2%)	3 (3.7%)
Partial Response (%)	22 (30%)	14 (26%)	53 (45%)	35 (43%)
Duration of Response				
Proportion with ≥6 months response duration	63%	67%	83%	89%
Proportion with ≥12 ^b months response duration	38%	40%	19%	21%

^a Estimated using the Clopper-Pearson method.

^b In the monotherapy cohort, 55% of the 20 patients with ongoing responses were followed for less than 12 months from the date of onset of response. In the combination cohort, 78% of the 51 patients with ongoing responses were followed for less than 12 months from the date of onset of response.

Tabella 4. Risultati dello studio clinico CHECKMATE-142

Opdivo (nivolumab) highlights of prescribing information. FDA.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/125554s063lbl.pdf

1.4. Diagnosi dMMR/MSI-H

L'instabilità dei microsatelliti viene acquisita in circa il 15% dei carcinomi del colon-retto, sia nelle forme sporadiche (80% circa dei casi) che in quelle ereditarie (sindrome del carcinoma ereditario non poliposico o sindrome di Lynch, il restante 20% circa). Come biomcatore dMMR/MSI-H ha valore sia predittivo che prognostico soprattutto nel caso del carcinoma colo-rettale, ma è presente anche in

diversi altri tipi di tumori (gastrico, endometriale, ovarico, vie epatobiliari, corteccia surrenale).³

Le “raccomandazioni ESMO sui test di instabilità dei microsatelliti per l’immunoterapia nel cancro e la sua relazione con l’espressione di PD-1/PD-L1 e il carico mutazionale del tumore” citate in precedenza, hanno generato 3 differenti raccomandazioni (A, B e C) per l’esecuzione dei test diagnostici comparando 31 studi clinici differenti. In questi studi clinici c’è una grande variabilità dei metodi utilizzati che sottolineano la mancanza di test diagnostici standard, i membri di questo progetto collaborativo e i membri dell’ESMO si sono basati sulle linee guida esistenti per determinare queste raccomandazioni.⁵

La raccomandazione A descrive l’analisi immunoistochimica (IHC) come test per l’instabilità dei microsatelliti (MSI). L’IHC è un test diagnostico ampiamente diffuso nei laboratori e si basa sull’utilizzo di anticorpi contro le quattro proteine del mismatch repair (MMR) che ricordiamo essere MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2.⁵ L’utilizzo del test IHC per le quattro proteine MMR è necessario per valutare la dMMR in qualsiasi tipo di cancro sporadico appartenente allo spettro dei tumori riscontrati nella sindrome di Lynch.³ Il rischio di riscontrare il cancro al colon-retto aumenta in presenza della sindrome di Lynch (LS), una sindrome ereditaria molto comune per la predisposizione al cancro che può essere causata da una variante patogena germinale in uno dei geni MMR o nel gene della molecola di adesione delle cellule epiteliali (EPCAM), le cui delezioni all'estremità 3' inducono il silenziamento epigenetico di MSH2. LS aumenta il rischio di sviluppare un'ampia varietà di tumori: endometrio, ovaio, stomaco, intestino tenue, pancreas, vie epatobiliari, vie urinarie (rene, pelvi renale, uretere, vescica), cervello e ghiandole sebacee. La perdita di espressione di una proteina MMR potrebbe non essere la diretta conseguenza di una variante patogena germinale nel gene corrispondente come accade nella LS, infatti la maggior parte dei CRC sporadici presenta un’ipermetilazione del promotore del gene MLH1 che causa l’inattivazione epigenetica di esso.¹

Il metodo IHC si basa sul fatto che le proteine MMR sono normalmente espresse a livello del nucleo delle cellule.³ La maggior parte delle mutazioni nei geni MMR

interferisce con la dimerizzazione, con conseguente degradazione proteolitica degli eterodimeri e conseguente perdita di espressione della proteina MMR sia obbligatoria che secondaria.⁵ Con il metodo IHC, la perdita di espressione delle proteine MMR è definita dall'assenza di immunocolorazione nucleare delle cellule tumorali, mentre le cellule normali risultano positive. La presenza di colorazione nucleare in cellule non cancerose è necessaria come controllo interno positivo per definire l'adeguatezza del materiale esaminato. Se l'immunocolorazione risulta negativa significa che l'espressione di almeno una di queste quattro proteine MMR è assente e quindi si ha carenza di MMR (dMMR).³

Uno svantaggio dell'IHC è che può dare origine a risultati di immunocolorazione sia falsi positivi che falsi negativi. Le immunocolorazioni false negative sono principalmente dovute a problemi preanalitici come la fissazione dei tessuti. La presenza di un controllo positivo interno (mucosa normale, i linfociti o le cellule stromali) è obbligatorio per l'interpretazione dei risultati. Le immunocolorazioni positive che non riflettono l'effettiva carenza del meccanismo MMR includono mutazioni missenso in qualsiasi gene MMR risultanti in proteine primarie mutanti che sono cataliticamente inattive ma antigenicamente intatte. Le ragioni biologiche per immunocolorazioni false positive dipendono dalla mancanza di PMS2 o MSH6 che sono sostituite da un altro partner secondario MMR (MSH3 in sostituzione di MSH6, MLH3 o PMS1 in sostituzione di PMS2). La perdita isolata dell'espressione PMS2 o quella di MSH6 non sono rare, perciò questa raccomandazione sottolinea l'importanza di utilizzare tutti e quattro gli anticorpi, contemporaneamente oppure in sequenza, ed eventualmente di confermare il risultato attraverso il metodo di PCR in caso di dubbi sull'interpretazione dell'IHC. La decisione di testare tutti e quattro gli anticorpi simultaneamente o in modo sequenziale, vale a dire utilizzando lo screening di due anticorpi (PMS2/MSH6) seguito da IHC riflesso per la proteina partner appropriata (MLH1 e/o MSH2), si basa su decisioni organizzative, temporali ed economiche. L'IHC può essere eseguita su biopsie o campioni chirurgici, tenendo in considerazione le diverse caratteristiche da cui si possono trarre vantaggi per ottenere una miglior diagnosi. Sulle biopsie si ha un miglior grado di fissazione rispetto al campione chirurgico e il vantaggio di conoscere lo stato dell'MSI per la gestione del paziente

da parte del Molecular Tumor Board (MTB) che potrebbe influire sulle strategie terapeutiche da attuare soprattutto in caso di cancro metastatico. I vantaggi dell'utilizzo di campioni chirurgici sono: l'analisi di un numero di cellule nettamente superiore rispetto a quelle presenti sulle biopsie, la possibilità di selezionare il miglior campione per effettuare l'analisi IHC, la possibilità di superare l'eterogeneità del tumore grazie all'analisi di una maggiore quantità di tessuto e la possibilità di eseguire anche un IHC affidabile per PD-1 e PD-L1 sullo stesso materiale.⁵

La raccomandazione B riguarda l'utilizzo del *test molecolare MSI-PCR in caso di risultati IHC indeterminati, inclusi disaccordo o difficoltà nell'interpretazione dell'IHC o in caso di perdita di una sola subunità eterodimerica* (es. solo MLH1 o solo PMS2).⁵

Seguendo le "Linee guida Bethesda" per i tumori del colon-retto, il test si basa sull'amplificazione PCR di marcatori microsatellitari con un pannello che utilizza cinque microsatelliti comprendenti due ripetizioni di mononucleotidi (BAT-25 e BAT-26) e tre dinucleotidi (D5S346, D2S123 e D17S250). Esiste un pannello alternativo con cinque ripetizioni il mononucleotide poli-A si ripete (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, NR-27). Attualmente, quest'ultimo è considerato il pannello standard data la sua maggiore sensibilità e specificità, rispetto al pannello Bethesda;¹ inoltre, il pannello pentaplex può ovviare alla necessità di confrontare il tessuto in esame con un tessuto normale (non neoplastico).⁵

L'MSI è definito come la perdita di stabilità in due o più dei cinque marcatori microsatelliti, cioè quando mostrano un'alterazione della lunghezza delle ripetizioni.

L'uso del test molecolare MSI-PCR è indicato per valutare la dMMR in qualsiasi tipo di cancro sporadico appartenente allo spettro dei tumori riscontrati nella sindrome di Lynch: colon-retto, endometriale, intestino tenue, uroteliale, del sistema nervoso centrale (gliomi/glioblastomi) e delle ghiandole sebacee.

Per valutare l'idoneità del trattamento con gli inibitori di checkpoint immunitario del cancro del colon-retto metastatico e di altri tumori dello spettro della sindrome di Lynch, si raccomanda l'uso di MMR-IHC e MSI-PCR per ottenere una terapia personalizzata in grado di predire la risposta immunitaria.

La raccomandazione C si focalizza sulla next generation sequencing, che rappresenta un test molecolare alternativo per valutare l'MSI. Uno dei principali vantaggi è la possibilità di accoppiare l'analisi MSI con la determinazione del carico mutazionale (TMB). La NGS consente il sequenziamento parallelo ad alto rendimento di un numero elevato di microsatelliti e geni.⁵ Nel 2017 la FDA ha approvato la piattaforma diagnostica MSK-IMPACT (Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Target) per rilevare l'instabilità dei microsatelliti nelle cellule tumorali. Nel 2018, sempre la FDA ha approvato come piattaforma diagnostica FoundationOne CDx (F1CDx) di Foundation Medicine (FMI) per l'analisi genomica dei tumori ma può essere utilizzata anche per l'analisi MSI.³

Il test MSI effettuato con NGS è potenzialmente il metodo elettivo per tutti i tipi di tumore, compresi i tumori rari, che non appartengono allo spettro della sindrome di Lynch.

Il gruppo di consenso ha indicato in base al tipo di tumore, quale sia il test MSI da utilizzare per avere una corretta diagnosi. Il test MSI deve essere eseguito utilizzando il metodo IHC per valutare lo stato delle proteine MMR e MSI-PCR o NGS nei seguenti tipi di cancro: endometriale, intestinale (colorettale e intestino tenue), gastrico, esofageo (adenocarcinomi e non carcinoma a cellule squamose), ovarico e glioblastoma. Per i tipi di tumore con bassa frequenza di MSI e pochi dati disponibili sull'affidabilità di IHC e MSI-PCR, il test MSI dovrebbe essere eseguito utilizzando NGS.

CAPITOLO II

TUMOR MUTATIONAL BURDEN (TMB)

L'accumulo di mutazioni somatiche a livello del DNA delle cellule comporta in esse la trasformazione neoplastica. Nelle cellule tumorali vi sono cambiamenti genetici che possono includere mutazioni non sinonime costituite da mutazioni missenso, ossia mutazioni puntiformi che cambiano un amminoacido all'interno del codone, provocando un'alterazione del filamento codificante con la conseguente produzione di proteine instabili, rapidamente degradate oppure non funzionanti. Possono includere anche mutazioni sinonime, che sono mutazioni silenziose perché non modificano la codifica dell'amminoacido, inserimenti o delezioni, che possono causare frameshift.¹⁰

Il carico mutazionale del tumore, dall'inglese Tumor Mutational Burden (TMB), si riferisce al numero totale di mutazioni nel genoma del tumore. Secondo l'ESMO, una definizione comunemente utilizzata per TMB è: *“numero totale di mutazioni non sinonime per area codificante del genoma tumorale analizzato dal test specifico impiegato”*. Dalla raccomandazione consensuale del consorzio di armonizzazione TMB è stata indicata come soglia $TMB \geq 10$ mut/Mb.¹¹

Le mutazioni somatiche nel DNA tumorale possono dare origine a neoantigeni, piccoli peptidi che vengono processati e caricati sul complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), esposti sulla superficie cellulare per essere riconosciuti dai linfociti T. Non tutte le mutazioni generano neoantigeni, ma se all'interno del tumore si trovano più mutazioni somatiche, è probabile che si formino più neoantigeni. Ne deriva la correlazione tra un TMB alto e una maggiore probabilità di esporre i neoantigeni tumorali sulla superficie cellulare, di conseguenza attraverso il TMB si può stimare il carico di neoantigeni del tumore. TMB è un biomarcatore di tipo quantitativo e per identificare i pazienti che trarranno beneficio dall'immunoterapia, quindi per predire l'efficacia degli inibitori del checkpoint immunitario (ICI).¹⁰

2.1. Pembrolizumab

Nel 2020 l'FDA ha approvato pembrolizumab per il trattamento di pazienti adulti e pediatrici con tumori solidi non resecabili o metastatici con elevato carico mutazionale del tumore (Tumor Mutational Burden-high, TMB-H) [≥ 10 mutazioni/megabase (mut/Mb)], come determinati da un test approvato dalla FDA, che sono progrediti dopo un trattamento precedente e che non hanno soddisfacenti opzioni di trattamento alternative. La nuova indicazione ha ottenuto un'approvazione accelerata come già si era visto per MSI-H e dMMR, in base al tasso di risposta del tumore e alla durata della risposta.

Esiste una limitazione d'uso: la sicurezza e l'efficacia di KEYTRUDA in pazienti pediatrici con tumori del sistema nervoso centrale con TMB-H non sono stati stabiliti.

L'efficacia di pembrolizumab è stata studiata in un'analisi di 10 coorti retrospettive di pazienti con tumori solidi non resecabili o metastatici con alto carico mutazionale (TMB-H) precedentemente trattati che erano arruolati nel KEYNOTE-158 (NCT02628067), uno studio multicentrico, non randomizzato, in aperto. Questo studio escludeva i pazienti che avevano ricevuto in precedenza un anticorpo monoclonale anti-PD-1 o immunomodulatore, che erano affetti da una malattia autoimmune o da una condizione medica che prevedeva l'immunosoppressione.

La dose di KEYTRUDA somministrata era pari a 200 mg per via endovenosa ogni tre settimane, fino a tossicità accettabile o progressione della malattia documentata. La valutazione del tumore è stata eseguita ogni 9 settimane per i primi 12 mesi, in seguito avveniva ogni 12 settimane.

Lo studio KEYNOTE-158 includeva 1050 pazienti, di cui 790 hanno effettuato il test per TMB. Di questo sottogruppo il 13% pari a 102 pazienti presentano tumori con TMB-H, definito come un carico mutazionale ≥ 10 mutazioni per megabase.

Come mostrato in tabella 5, i pazienti arruolati erano affetti da diversi tipi di tumore: polmonare a piccole cellule, cervicale, endometriale, anale, vulvare, neuroendocrino, salivare, tiroideo e mesotelioma.

	N	Objective Response Rate n (%)		95% CI	Duration of Response range (months)
Overall*	102	30 (29%)	(21%, 39%)		(2.2+, 34.8+)
Small cell lung cancer	34	10 (29%)	(15%, 47%)		(4.1, 32.5+)
Cervical cancer	16	5 (31%)	(11%, 59%)		(3.7+, 34.8+)
Endometrial cancer	15	7 (47%)	(21%, 73%)		(8.4+, 33.9+)
Anal cancer	14	1 (7%)	(0.2%, 34%)		18.8+
Vulvar cancer	12	2 (17%)	(2%, 48%)		(8.8, 11.0)
Neuroendocrine cancer	5	2 (40%)	(5%, 85%)		(2.2+, 32.6+)
Salivary cancer	3	PR, SD, PD			31.3+
Thyroid cancer	2	CR, CR			(8.2, 33.2+)
Mesothelioma cancer	1	PD			

* No TMB-H patients were identified in the cholangiocarcinoma cohort
CR = complete response
PR = partial response
SD = stable disease
PD = progressive disease

Tabella 5. Risposta in base al tipo di tumore (TMB>10 mut/Mb)

Keytruda (pembrolizumab) highlights of prescribing information. FDA.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/125514s121s122lbl.pdf

L'ORR è pari al 29% (con IC 95%; 21, 39), con una risposta completa del 4% e una risposta parziale del 25%. Come riportato in tabella 6, la durata della risposta media espressa in mesi non è stata raggiunta, perché KEYNOTE-158 è uno studio di fase II ancora in corso. La durata della risposta superiore a 12 mesi è stata riscontrata nel 57% dei pazienti.⁷

Table 76: Efficacy Results for Patients with TMB-H Cancer in KEYNOTE-158

Endpoint	KEYTRUDA 200 mg every 3 weeks	
	TMB ≥10 mut/Mb n=102*	TMB ≥13 mut/Mb n=70
Objective Response Rate		
ORR (95% CI)	29% (21, 39)	37% (26, 50)
Complete response rate	4%	3%
Partial response rate	25%	34%
Duration of Response	n=30	n=26
Median in months (range) [†]	NR (2.2+, 34.8+)	NR (2.2+, 34.8+)
% with duration ≥12 months	57%	58%
% with duration ≥24 months	50%	50%

* Median follow-up time of 11.1 months
[†] From product-limit (Kaplan-Meier) method for censored data
+ Denotes ongoing response
NR = not reached

Tabella 6. Risultati dello studio clinico KEYNOTE-158 nei pazienti con tumore TMB-H

Keytruda (pembrolizumab) highlights of prescribing information. FDA.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/125514s121s122lbl.pdf

2.2. Relazione tra MSI e TMB

I tumori MSI presentano un elevato carico mutazionale (TMB) in quanto ospitano molte mutazioni non sinonime. Questa associazione permette di ipotizzare che TMB sia un fattore chiave responsabile, come MSI, per predire l'efficacia degli ICI nei tumori dMMR.¹ Sono state studiate le possibili relazioni tra MSI, l'espressione

di PD-1/PD-L1 e TMB come biomarcatori associati ad un aumento del tasso di risposta all'immunoterapia attraverso delle revisioni sistematiche. La relazione è risultata complessa e l'impiego di una combinazione di marcatori non è chiaro se possa essere migliore all'affidarsi ad un solo marcatore.⁵

CAPITOLO III

NTRK

I geni NTRK (Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase) sono tre: NTRK1, NTRK2 e NTRK3; essi codificano per una famiglia di recettori transmembrana, rispettivamente TRKA, TRKB e TRKC, che contengono un dominio extracellulare per il legame con i propri ligandi e un dominio intracellulare con attività chinasi.¹²

I ligandi si legano con alta affinità ai recettori e principalmente sono fattori di crescita: il fattore di crescita nervoso NGF (Neurotrophin Growth Factor) si lega a TRKA, il fattore neurotrofico cerebrale BDNF (Brain derived neurotrophic factor) o neurotrofina 4 (NT-4) si lega a TRKB e la neurotrofina 3 (NT-3) si lega a TRKC.³ Alcuni studi precedenti hanno confermato che i TRK come recettori dei fattori di crescita possono modulare la proliferazione cellulare, la differenziazione, il metabolismo e l'apoptosi attraverso la fosforilazione a valle dei propri bersagli.¹²

La porzione extracellulare dei recettori è costituita da 2 domini Ig-like: Ig1 ed Ig2; quest'ultimo è quello maggiormente interessato per l'interazione con il ligando. La porzione intracellulare presenta un dominio tirosin-chinasi che presenta attività catalitica, che a seguito dell'omodimerizzazione va incontro ad autofosforilazione, con conseguente attivazione e trasduzione del segnale.³ Il dominio catalitico dei recettori TRK è costituito da un piccolo terminale amminico e un grande terminale carbossilico collegati da una regione a cerniera (hinge region). È presente un loop di attivazione con una sequenza amminoacidica DFG (Asp-Phe-Gly) conservata che controlla l'accesso al sito enzimatico regolandone l'attività. Esistono due conformazioni, quella attiva e quella inattiva. Quella inattiva blocca l'ingresso di ATP e del substrato perché il DFG motif si pone davanti alla tasca; in quella attiva il DFG motif si dirige verso l'interno del sito di legame lasciando libero il passaggio. L'interazione con il ligando a livello extracellulare porta alla dimerizzazione del recettore, a livello intracellulare si ha l'autofosforilazione (ciascuna subunità del dimero fosforila l'altra subunità) dei residui di tirosina

attraverso tre molecole di ATP e in seguito avviene lo spostamento dei residui del loop che espongono la tasca catalitica.¹²

Le chinasi hanno la funzione principale di catalizzare la fosforilazione di proteine coinvolte in numerose vie di trasduzione del segnale andando ad attivarle.

Come mostrato in figura, il legame di NGF con TRKA attiva le vie PI3K/MAPK/PLC inibendo le proteine apoptotiche, promuovendo la differenziazione dei neuroni e la crescita degli assoni. L'interazione di BDNF con TRKB attiva numerose vie di segnalazione a valle, tra cui RAS/MAPK, la via PI3K/3-PDK1/AKT e la via PLC γ attivando la proliferazione e la differenziazione delle cellule nervose metaboliche. NT-3 si lega a TRKC aumentando la sopravvivenza e prevenendo l'apoptosi mediante l'attivazione della via PI3K/AKT. La figura 3 rappresenta graficamente il legame dei ligandi con i recettori e le vie di trasduzione che vengono attivate.

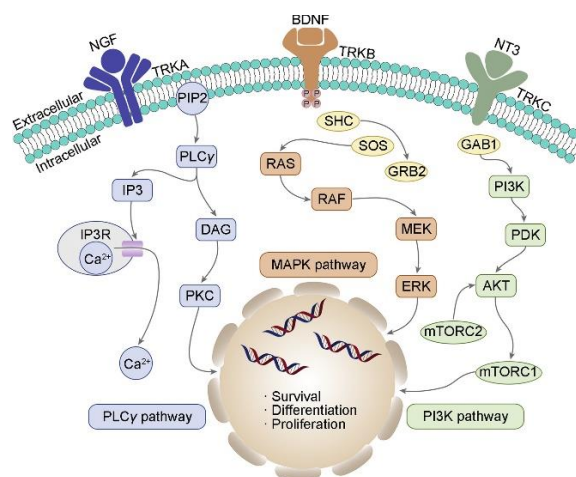


Figura 3. Rappresentazione schematica delle vie di segnalazione dei recettori TRK

Jiang, T.; Wang, G.; Liu, Y.; Feng, L.; Wang, M.; Liu, J.; Chen, Y.; Ouyang, L. Development of small-molecule tropomyosin receptor kinase (TRK) inhibitors for. *Acta Pharm Sin B* **2021**, *11* (2), 355-372. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.05.004.

3.1. Fusione del gene NTRK

Nei tumori maligni, questi recettori sono costitutivamente attivati attraverso vari meccanismi, tra cui la riorganizzazione intracromosomica o intercromosomica nella regione 3' del gene NTRK che si collega con la regione 5' del gene partner di

fusione, aumentando il rischio di sviluppare tumori.¹² La fusione di queste due regioni è rappresentata graficamente nella figura 4.

I riarrangiamenti solitamente coinvolgono la porzione genica corrispondente ai domini di attivazione e trasduzione del segnale. Il gene partner della fusione riveste un ruolo fondamentale nel meccanismo di attivazione, localizzazione intracellulare e via di trasduzione del segnale, a livello dei domini oligomerizzati permette l'attivazione in assenza di ligando.³ Questa oncoproteina porta ad una chinasi costitutivamente attivata o sovraespressa che alimenta la crescita e la diffusione del tumore indipendentemente dalla sede in cui si è originata.

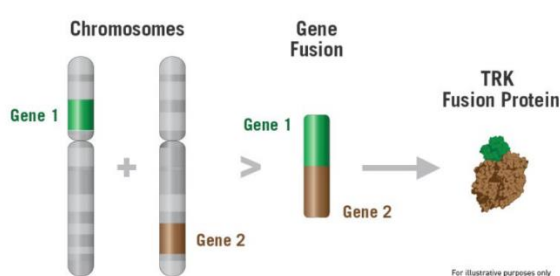


Figura 4. Fusione del gene NTRK

NTRK gene fusions. Genentech.

<https://www.genentechoncology.com/pathways/cancer-tumor-targets/ntrk.html>

Le fusioni geniche che coinvolgono NTRK portano alla formazione di diversi tipi di neoplasie tra cui il cancro al colon-retto, melanoma, cancro ai polmoni non a piccole cellule, leucemia mieloide acuta. Le vie di trasduzione del segnale coinvolte nella formazione di questi tumori sono PLC γ , PI3K e RAS/RAF che stimolano l'amplificazione e la trasmissione del segnale in modo incontrollato.¹²

Queste fusioni transmembrana provocano una mancanza dei domini extracellulari, che sono il target delle terapie di precisione come ad esempio gli anticorpi monoclonali. Mancando il bersaglio farmacologico, non si ha attività e quindi le terapie risultano inefficaci. Per questo motivo, la ricerca oncologica si è concentrata sull'inibizione delle fusioni NTRK studiando gli inibitori di TRK. Questi inibitori possono essere classificati in 3 diverse tipologie in base al sito di legame al recettore e si dividono in tipo I, II e III. Quelli di tipo I hanno come target il sito di legame dell'ATP di una chinasi attivata, quelli di tipo II legano la conformazione inattiva

e interagiscono con le tasche idrofobiche adiacenti al sito di legame dell'ATP mentre quelli di tipo III sono inibitori allosterici, il loro target sono le tasche idrofobiche lontane dal sito di legame dell'ATP e regolano l'attività della chinasi perché causano un cambiamento conformazionale nella tasca di legame dell'ATP. Larotrectinib ed entrectinib sono inibitori di tipo I.¹²

3.2. Larotrectinib

Nel 2018 la FDA ha concesso un'approvazione accelerata per il farmaco Vitrakvi[®], contenente il principio attivo Larotrectinib. Esso è un inibitore di chinasi indicato per il trattamento di pazienti adulti e pediatrici con tumori solidi che hanno una fusione del gene NTRK senza una mutazione di resistenza acquisita nota, tumori solidi che sono metastatici o dove la resezione chirurgica ha come risultato una grave morbosità e che non hanno trattamenti alternativi soddisfacenti o che sono progrediti dopo il trattamento. L'approvazione si basa sul tasso di risposta globale e sulla durata della risposta.¹³

Larotrectinib è un inibitore potente e altamente selettivo per tutti i sottotipi recettoriali di TRK.¹⁴

La molecola presenta un eterociclo aromatico azotato per il legame con la hinge region che aiuta la stabilizzazione dell'inibitore all'interno del sito catalitico, come si può notare in figura 5. Larotrectinib inibisce competitivamente il legame dell'ATP con il recettore grazie al riconoscimento della conformazione del DFG motif (DFG in) che si trova in forma attiva.¹²



Figura 5. Larotrectinib

Jiang, T.; Wang, G.; Liu, Y.; Feng, L.; Wang, M.; Liu, J.; Chen, Y.; Ouyang, L. Development of small-molecule tropomyosin receptor kinase (TRK) inhibitors for. *Acta Pharm Sin B* **2021**, 11 (2), 355-372. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.05.004.

L'efficacia di Larotrectinib si basa su tre studi clinici multicentrici, in aperto, a singolo braccio in cui sono stati arruolati 55 pazienti adulti e pediatrici con tumori solidi non resecabili o metastatici con fusione del gene NTRK. I tre studi clinici sono: LOXO-TRK-14001 (NCT02122913), SCOUT (NCT02637687) e NAVIGATE (NCT02576431). La dose somministrata ai pazienti era pari a 100 mg per via orale due volte al giorno per i pazienti adulti e 100 mg/m² fino ad un massimo di 100 mg per via orale per i pazienti pediatrici con un'età inferiore ai 18 anni, fino a tossicità accettabile o progressione della malattia. Il 98% dei pazienti ha ricevuto un precedente trattamento specifico per la loro malattia, inclusi interventi chirurgici, radioterapia o una terapia sistemica.

I tipi di cancro più comuni sono tumore alla ghiandola salivare (22%), sarcoma dei tessuti molli (20%), fibrosarcoma infantile (13%) e tumore alla tiroide (9%). Gli altri tipi di cancro che sono stati trattati sono riportati in tabella 7 con le relative risposte.¹³

Tumor Type	Patients (N=55)	ORR		DOR Range (months)
		%	95% CI	
Soft tissue sarcoma	11	91%	(59%, 100%)	3.6, 33.2+
Salivary gland	12	83%	(52%, 98%)	7.7, 27.9+
Infantile fibrosarcoma	7	100%	(59%, 100%)	1.4+, 10.2+
Thyroid	5	100%	(48%, 100%)	3.7, 27.0+
Lung	4	75%	(19%, 99%)	8.2, 20.3+
Melanoma	4	50%	NA	1.9, 17.5+*
Colon	4	25%	NA	5.6*
Gastrointestinal stromal tumor	3	100%	(29%, 100%)	9.5, 17.3
Cholangiocarcinoma	2	SD, NE	NA	NA
Appendix	1	SD	NA	NA
Breast	1	PD	NA	NA
Pancreas	1	SD	NA	NA

Tabella 7. Risultati in base al tipo di tumore.

Vitrakvi (larotrectinib) highlight of prescribing information. FDA.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/210861s006lbl.pdf

Il tasso di risposta totale è stato del 75% (95%CI; 61%, 85%), con una risposta completa pari al 22% (12 pazienti) e una risposta parziale del 53% (29 pazienti). La durata della risposta ha un range che va da 1.6 mesi a 33.2 mesi, questi dati denotano una risposta continua. Questi risultati sono riassunti in tabella 8.

Efficacy Parameter	VITRAKVI N = 55
Overall response rate (95% CI)	75% (61%, 85%)
Complete response rate	22%
Partial response rate*	53%
Duration of response**	N = 41
Range (months)	1.6+, 33.2+
% with duration ≥ 6 months	73%
% with duration ≥ 9 months***	63%
% with duration ≥ 12 months****	39%

+ Denotes ongoing response.

*Includes one pediatric patient with unresectable infantile fibrosarcoma who underwent resection following partial response and who remained disease-free at data cutoff.

**Median duration of response not reached at time of data cutoff.

***3 patients with an ongoing response were followed < 9 months from onset of response.

****10 patients with an ongoing response were followed < 12 months from onset of response.

Tabella 8. Risultati di efficacia dei pazienti con tumori solidi con fusioni del gene NTRK.

Vitrakvi (larotrectinib) highlight of prescribing information. FDA.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/210861s0061bl.pdf

Negli studi clinici sono state analizzate le fusioni del gene NTRK mediante NGS in 50 pazienti e mediante metodo FISH in 5 pazienti.¹³

Sulla base dei dati riportati, larotrectinib è stato il primo inibitore tirosin-chinasico ad ottenere l'approvazione da FDA e EMA con indicazione agnostica al tumore.¹⁵

3.3. Entrectinib

Nel 2019 è stata concessa un'approvazione accelerata da parte della FDA per il farmaco Rozlytrek[®] contenente il principio attivo Entrectinib. Come Larotrectinib, si tratta di un inibitore di chinasi indicato per il trattamento di pazienti adulti e pediatrici con un'età superiore a 12 anni con tumori solidi che hanno una fusione del gene NTRK senza una mutazione di resistente acquisita nota, tumori solidi che sono metastatici o dove la resezione chirurgica ha come risultato una grave morbosità e che non hanno trattamenti alternativi soddisfacenti o che sono progrediti dopo il trattamento. Anche per questo inibitore l'approvazione si basa sul tasso di risposta globale e sulla durata della risposta.¹⁶

Entrectinib è un potente inibitore, altamente selettivo di tutti e tre i sottotipi recettoriali di TRK.¹⁴ La figura 6 mostra la formula di struttura di entrectinib.

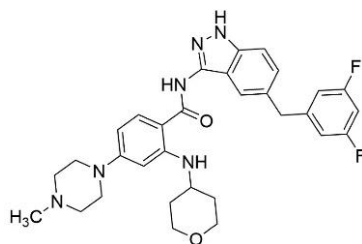


Figura 6. Entrectinib

Jiang, T.; Wang, G.; Liu, Y.; Feng, L.; Wang, M.; Liu, J.; Chen, Y.; Ouyang, L. Development of small-molecule tropomyosin receptor kinase (TRK) inhibitors for. *Acta Pharm Sin B* **2021**, 11 (2), 355-372. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.05.004.

L'efficacia di entrectinib è stata valutata in un sottogruppo di pazienti adulti con tumori solidi non resecabili o metastatici con fusione del gene NTRK arruolati in uno dei 3 studi clinici multicentrici, a singolo braccio, in aperto: ALKA, STARTRK-1 (NCT02097810) e STARTRK-2 (NCT02568267). I pazienti hanno ricevuto diverse dosi di Rozlytrek con una diversa posologia, ma il 94% di essi ha assunto 600 mg del farmaco una volta al giorno per via orale fino a tossicità accettabile o progressione della malattia. I pazienti arruolati in questi tre studi clinici erano 54 e tutti hanno ricevuto un trattamento precedente per il tipo di cancro di cui sono affetti.

Come mostrato in tabella 9, i tipi di cancro più comuni all'interno di questa popolazione selezionata sono il sarcoma (24%), il tumore ai polmoni (19%), tumore alle ghiandole salivari (13%), cancro al seno (11%), tumore alla tiroide (9%) e cancro al colon-retto (7%).

I metodi utilizzati per rilevare le fusioni del gene NTRK sono: per 52 pazienti NGS e per 2 pazienti dei test basati sulla fusione degli acidi nucleici.¹⁶

Tumor Type	Patients N = 54	ORR		DOR
		%	95% CI	Range (months)
Sarcoma	13	46%	19%, 75%	2.8, 33.6+
Non-small cell lung cancer	10	60%	26%, 88%	3.7, 47.8+
Salivary (MASC)	7	86%	42%, 100%	2.8, 38.5+
Breast cancer	6	83%	36%, 100%	4.2, 42.3+
Thyroid cancer	5	60%	NA	7.9, 31.5+
Colorectal cancer	4	25%	NA	15.1
Neuroendocrine cancers	3	CR	NA	32.9+
Pancreatic cancer	3	PR, PR	NA	7.1, 12.9
Gynecological cancers	2	PR	NA	38.2
Cholangiocarcinoma	1	PR	NA	9.3

+ denotes ongoing response

MASC: mammary analogue secretory carcinoma; NA = not applicable; PR = partial response.

Tabella 9. Risultati in base al tipo di tumore

Rozlytrek (entrectinib) highlights of prescribing information. FDA.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/212725s0051bl.pdf

In tabella 10 vengono riportati i risultati ottenuti: la risposta globale è pari al 59% (CI 95%; 45, 72), con una risposta completa per il 13% dei pazienti e una risposta parziale per il 46%. La durata della risposta in mesi va da 2.8 a 47.8.¹⁶

Table 8: Efficacy Results for Patients with Solid Tumors Harboring *NTRK* Gene Fusions

Efficacy Parameter	ROZLYTREK N = 54
Overall Response Rate (95% CI)	59% (45, 72)
Complete Response	13%
Partial Response	46%
Duration of Response*	N = 32
Range (months)	2.8, 47.8+
% with duration ≥ 6 months	72%
% with duration ≥ 9 months	66%
% with duration ≥ 12 months	56%

* Observed DOR
+ denotes ongoing response

Tabella 10. Risultati nei pazienti con tumori solidi con fusioni del gene NTRK.

Rozlytrek (entrectinib) highlights of prescribing information. FDA.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/212725s005lbl.pdf

3.4. Diagnosi

Inizialmente, le metodologie diagnostiche impiegate per la caratterizzazione delle alterazioni a carico di TRK comprendono l'ibridazione in situ con sonde fluorescenti (FISH), l'analisi immunohistochimica (IHC) e la Real-Time PCR (RT-PCR). Successivamente, con l'incremento dei biomarcatori predettivi di risposta al trattamento con farmaci a bersaglio molecolare c'è stato un incentivo sull'utilizzo delle piattaforme di NGS.

L'IHC per la rilevazione delle fusioni dei geni che codificano per le proteine TRK nelle cellule neoplastiche è estremamente indicativa dell'avvenuta fusione e ha una sensibilità e specificità elevate. Questa tecnica consente di verificare che i trascritti aberranti siano effettivamente stati tradotti in proteina. È poco costosa e ha un breve tempo di analisi, ma non ha la capacità di identificare il partner di fusione ed ha una ridotta specificità per le cellule del sistema nervoso, dove l'espressione di TRK è costitutiva seppur a livelli bassi. Per ridurre ulteriormente i tempi e i costi di analisi è stato proposto l'uso del test su tissue microarrays (TMAs) per favorire lo sviluppo di un test di screening per i pazienti con tumori maligni infiltranti.³

La FISH è una metodologia utilizzata comunemente per identificare riarrangiamenti e le copie anormali di segmenti di DNA nei cromosomi. Questa tecnica prevede l'utilizzo di una o più sonde di DNA etichettate con molecole fluorescenti che

permettono di visualizzare la posizione o il numero di segnali. Si possono usare sonde di fusione in cui si conoscono entrambi i geni partner che vengono ibridati per vedere se i due segnali si uniscono in un segnale di fusione oppure si possono usare sonde *break-apart* che vengono realizzate su due parti di un gene che vengono ibridate per vedere se si è verificata una rottura intermedia come parte di una fusione. Per rilevare le fusioni NTRK il metodo FISH risulta efficiente ma ci sono una serie di questioni legate all'identificazione dei riarrangiamenti nei geni NTRK. Tutti e tre i geni devono essere analizzati e i geni partner di fusione non vengono identificati con questa tecnica. Inoltre, FISH rileva solo i riarrangiamenti, dunque non può identificare le fusioni date dalle traslocazioni.

La RT-PCR è ampiamente disponibile nei laboratori e ha un tempo di risposta relativamente breve, individua le fusioni che coinvolgono i tre geni NTRK. Per rilevare queste fusioni è necessario progettare primer che individuino i partner di fusione e anche per gli esoni. A causa del grande numero di geni partner e della continua scoperta di essi, il test non sarà mai completo e quindi nella pratica clinica ha una limitata utilità.¹⁷ Viene consigliata come metodica di secondo livello, per confermare alterazioni già individuate attraverso altri sistemi diagnostici.³

La NGS è un metodo eccellente per rilevare le mutazioni tumorali, ma risulta costoso e relativamente lento. Per l'identificazione delle fusioni NTRK l'NGS è basato su RNA perché permette di identificare il gene partner, gli esoni coinvolti e anche la posizione precisa.¹⁷ Consente di analizzare simultaneamente anche altri marcatori clinicamente rilevanti.³

CAPITOLO IV

RET

Il gene RET (Rearranged during Transfection) è un proto-oncogene che si trova sul cromosoma 10 e codifica per un recettore tirosin-chinasico che è coinvolto nello sviluppo fetale dei sistemi nervoso, ematopoietico, gastrointestinale e genitourinario. Come visto in precedenza, questa classe di recettori sono in forma dimerica e presentano 3 domini: un dominio extracellulare, un dominio transmembrana e un dominio intracellulare tirosin-chinasico. Il dominio extracellulare contiene quattro domini cadherin-like (CLD1-4), un sito di legame per il calcio e un dominio ricco di cisteina. La regione intracellulare presenta il sito catalitico e i siti di fosforilazione della tirosina situati vicino alla regione C terminale.¹⁸

RET si lega al complesso ligando-corecettore della famiglia dei ligandi del fattore neurotrofico derivato dalla cellule gliali (GDNF) che include GDNF, neurturina (NRTN), artemina (ARTN) o persefina (PSPN) e uno dei quattro recettori alfa della famiglia GDNF (GFR α). Come mostrato in figura 7, RET forma un complesso eterodimerico con questi co-recettori, quando i ligandi si legano ad essi avviene la dimerizzazione con formazione del complesso e l'autosforilazione del dominio intracellulare, portando all'attivazione della via di segnalazione a valle.¹⁹

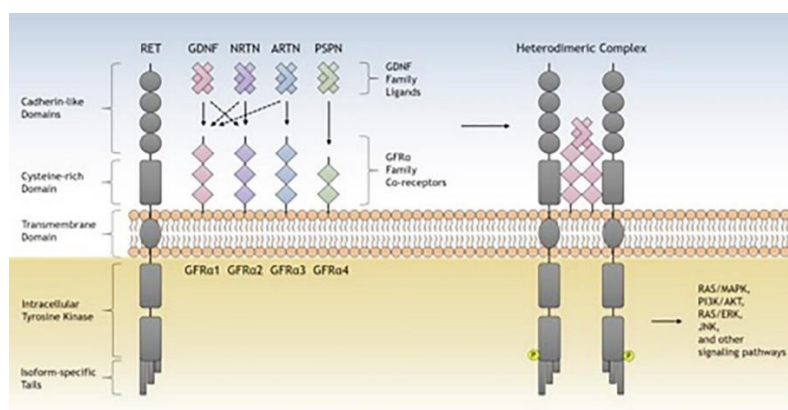


Figura 7. Formazione del complesso eterodimerico di RET

Li, A. Y.; McCusker, M. G.; Russo, A.; Scilla, K. A.; Gittens, A.; Arensmeyer, K.; Mehra, R.; Adamo, V.; Rolfo, C. RET fusions in solid tumors. *Cancer Treat Rev* **2019**, *81*, 101911. DOI: 10.1016/j.ctrv.2019.101911

Le vie coinvolte sono: RAS/MAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT, PKA e PKC; queste sono tutte vie di trasduzione del segnale implicate nella proliferazione e sopravvivenza cellulare.¹⁸

L'attivazione oncogenica di RET avviene mediante diversi meccanismi, come per esempio tramite riarrangiamenti e mutazioni puntiformi. Queste alterazioni genetiche portano all'attivazione costitutiva di RET tramite dimerizzazione indipendentemente dalla presenza del ligando, mediante espressione aberrante o attivazione del recettore in forma monomeric.²⁰

4.1. Riarrangiamenti di RET

I riarrangiamenti somatici di RET coinvolgono il braccio lungo del cromosoma 10 e provocano la fusione del dominio 3' con il dominio 5' del gene partner. Quando le proteine di fusione del gene RET vengono trascritte presentano le proprietà oncogeniche mediante due meccanismi. Se il gene partner è espresso in modo ubiquitario, l'attivazione costitutiva e l'espressione aberrante di RET sono presenti anche nelle cellule in cui è solitamente silente dal punto di vista trascrizionale. Se, invece, il gene partner contiene un dominio di dimerizzazione, quando avviene la fusione col dominio delle chinasi di RET, si ottiene una dimerizzazione indipendentemente dalla presenza del ligando con conseguente attivazione del recettore. La maggior parte dei geni di fusione sono localizzati nel citosol e quindi non vengono degradati dall'ubiquitina attraverso i lisosomi.

I riarrangiamenti di RET si verificano più frequentemente nel carcinoma papillare della tiroide (PTC) e nel carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC).²⁰

4.2. Le mutazioni di RET

Le mutazioni puntiformi che avvengono a carico del gene RET sono localizzate più frequentemente nei domini extracellulari e nei domini tirosin-chinasi.

Le mutazioni vengono riscontrate maggiormente nel carcinoma midollare della tiroide (MTC) e nella neoplasia endocrina multipla di tipo 2 (MEN2), suddivisa in

MEN2A e MEN2B, in cui le mutazioni svolgono un ruolo patognomiconico, cioè permettono una diagnosi certa. Le mutazioni del dominio extracellulare vengono frequentemente osservate in MEN2A e causano la sostituzione di una cisteina con un altro amminoacido, provocando la rottura di un legame disolfuro, di conseguenza rimane un residuo di cisteina spaiato che potrebbe legarsi ad una seconda molecola di RET mutata andando a creare un legame disolfuro tra le due. Questo legame porta alla dimerizzazione in assenza di ligando, a cui consegue l'attivazione costitutiva del recettore. Invece, per quanto riguarda MEN2B, le mutazioni coinvolgono il dominio della chinasi, favorendo l'attivazione del recettore indipendentemente dalla dimerizzazione di esso perché causano un aumento dell'affinità di legame con l'ATP alterando l'autofosforilazione di RET.²⁰

4.3. Pralsetinib

Nel 2020 la FDA ha concesso un'approvazione accelerata per Gavreto[®] contenente il principio attivo *pralsetinib*, un inibitore di chinasi. Pralsetinib è indicato per il trattamento di:

- pazienti adulti con tumore metastatico ai polmoni non a piccole cellule (NSCLC) con fusione RET positiva,
- pazienti adulti e pediatrici con un'età pari o superiore a 12 anni con carcinoma midollare della tiroide (MTC) metastatico con mutazione di RET che richiedono un trattamento sistemico,
- per pazienti adulti e pediatrici con un'età pari o maggiore di 12 anni con tumore alla tiroide avanzato o metastatico con fusione positiva di RET che richiedono un trattamento sistemico o che sono refrattari alla terapia con iodio radioattivo.

L'approvazione si è basata sul tasso di risposta globale e sulla durata della risposta.

Pralsetinib è un inibitore selettivo di RET, ma ha azione anche su altri tipi di chinasi. Essendo un inibitore multichinasico è molto efficace perché bloccando più vie di trasmissione del segnale aumenta la probabilità di bloccare la proliferazione

incontrollata delle cellule tumorali.²¹ Esso inibisce l'autosforilazione di RET con una potenza maggiore rispetto agli altri antitumorali.

Nel dominio catalitico chinasi è presente un residuo gatekeeper, posizionato tra la hinge region e la tasca idrofobica, le mutazioni a carico di questo residuo possono portare ad una conformazione diversa della tasca idrofobica con conseguente impossibilità degli inibitori di chinasi di legarsi. Pralsetinib ha dimostrato di sopprimere la proliferazione in vitro delle cellule tumorali che presentano questi residui mutati.¹⁹ La struttura chimica di pralsetinib è riportata in figura 8.

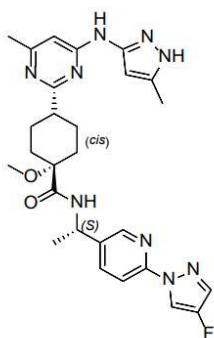


Figura 8. Pralsetinib.

Gavreto (pralsetinib) highlights of prescribing information. FDA.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/213721s0051bl.pdf

Pazienti con cancro ai polmoni non a piccole cellule metastatico con fusione positiva di RET

L'efficacia di pralsetinib è stata valutata nei pazienti con tumori NSCLC metastatici con fusione positiva di RET nello studio clinico ARROW (NCT03037385), uno studio di fase I/II ancora in corso, multicentrico, non randomizzato, in aperto e multi-coorte. Lo studio ha arruolato in coorti separate i pazienti con NSCLC metastatico con fusione positiva di RET che sono progrediti in seguito al trattamento chemioterapico a base di platino e i pazienti con NSCLC metastatico che non avevano ancora ricevuto alcun trattamento. Per l'identificazione delle fusioni di RET sono stati utilizzati NGS, FISH e altri test; in particolare, per quanto riguarda questo tipo di tumore, la FDA ha approvato "Oncomine Dx Target Test" (ODxTT), un test NGS in grado di valutare 23 geni clinicamente associati con NSCLC metastatico per pazienti candidati al trattamento con pralsetinib.

La dose somministrata ai pazienti è pari a 400 mg per via orale una volta al giorno, fino a tossicità accettabile o progressione della malattia.

I pazienti che avevano precedentemente ricevuto un trattamento chemioterapico a base di platino erano 87. L'ORR è stata misurata nel 57% dei pazienti (95% CI; 46; 68), con una risposta completa nel 5,7% e una risposta parziale nel 52% dei pazienti. La durata della risposta media in mesi non è stato possibile stimarla, ma i pazienti con DOR (duration of response) maggiore di 6 mesi sono pari all'80% dei responders.²¹ I risultati sono riportati in tabella 11.

Efficacy Parameter	GAVRETO (N=87)
Overall Response Rate (ORR)^a (95% CI)	57 (46, 68)
Complete Response, %	5.7
Partial Response, %	52
Duration of Response (DOR)	(N=50)
Median, months (95%CI)	NE (15.2, NE)
Patients with DOR ≥ 6-months ^b , %	80

NE = not estimable

^a Confirmed overall response rate assessed by BICR

^b Based on observed duration of response

Tabella 11. Risultati di pralsetinib in pazienti con NSCLC precedentemente trattati.

Gavreto (pralsetinib) highlights of prescribing information. FDA.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/213721s005lbl.pdf

I pazienti con trattamento naïve arruolati nello studio ARROW sono stati 27, come schematizzato in tabella 12. Il 70% di essi ha avuto una risposta al trattamento con pralsetinib (95% CI; 50; 86); l'11% ha avuto una risposta completa mentre il 59% risposta parziale. La durata della risposta media è stata di 9 mesi.

Efficacy Parameter	GAVRETO (N=27)
Overall Response Rate (ORR)^a (95% CI)	70 (50, 86)
Complete Response, %	11
Partial Response, %	59
Duration of Response (DOR)	(N=19)
Median, months (95% CI)	9.0 (6.3, NE)
Patients with DOR ≥ 6-months ^b , %	58

NE = not estimable

^a Confirmed overall response rate assessed by BICR

^b Based on observed duration of response

Tabella 12. Risultati di pralsetinib in pazienti con NSCLC che non hanno ricevuto trattamenti precedenti.

Gavreto (pralsetinib) highlights of prescribing information. FDA.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/213721s005lbl.pdf

Pazienti con carcinoma midollare alla tiroide con mutazione di RET

L'efficacia di pralsetinib è stata valutata in pazienti affetti da MTC con mutazione di RET nello studio clinico citato in precedenza, lo studio ARROW. Anche in questo caso i pazienti sono stati divisi in due coorti: pazienti precedentemente trattati con cabozantinib o vandetanib e pazienti non trattati precedentemente. La mutazione di RET è stata rilevata mediante NGS e PCR.

I pazienti trattati con cabozantinib o vandetanib, o con entrambi, arruolati in questa coorte erano 55 e il tasso di risposta era pari al 60% (95% CI). La tabella 13 riporta i risultati. La risposta parziale era pari al 58% mentre quella completa l'1,8%. La durata della risposta media non è ancora definita in quanto si tratta di uno studio non completato, ancora in corso. I pazienti responders con una durata della risposta maggiore o uguale a 6 mesi sono il 79%.²¹

Efficacy Parameters	GAVRETO (N=55)
Overall Response Rate (ORR) ^a (95% CI)	60 (46, 73)
Complete Response, %	1.8
Partial Response, %	58
Duration of Response (DOR)	(N=33)
Median in months (95% CI)	NR (15.1, NE)
Patients with DOR ≥ 6 months ^b , %	79

NR = Not Reached; NE = Not Estimable

^a Confirmed overall response rate assessed by BICR

^b Based on observed duration of response

Tabella 13. Risultati di pralsetinib nei pazienti con MTC precedentemente trattati

Gavreto (pralsetinib) highlights of prescribing information. FDA.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/213721s005lbl.pdf

I pazienti naïve arruolati erano 29, con un tasso di risposta globale pari al 66%; risposta completa nel 10% dei pazienti e parziale nel 55%. La durata della risposta media espressa in mesi non è ancora disponibile, come detto in precedenza. Tuttavia, i pazienti responders con una DOR pari o maggiore di 6 mesi sono l'84%.²¹

I risultati ottenuti sono schematizzati in tabella 14.

Efficacy Parameters	GAVRETO (N=29)
Overall Response Rate (ORR)^a (95% CI)	66 (46, 82)
Complete Response, %	10
Partial Response, %	55
Duration of Response (DOR)	(N=19)
Median in months (95% CI)	NR (NE, NE)
Patients with DOR ≥ 6 months ^b , %	84

NR = Not Reached; NE = Not Estimable

^a Confirmed overall response rate assessed by BICR

^b Based on observed duration of response

Tabella 14. Risultati di pralsetinib in pazienti con MTC che non hanno ricevuto trattamenti precedenti.

Gavreto (pralsetinib) highlights of prescribing information. FDA.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/213721s005lbl.pdf

Pazienti con cancro alla tiroide con fusione positiva di RET

L'efficacia di pralsetinib è stata valutata nello studio clinico ARROW, citato in precedenza, in pazienti con cancro alla tiroide metastatico con fusione positiva di RET che sono progrediti in seguito a trattamenti standard. I metodi diagnostici per individuare le fusioni di RET usati per questa coorte erano NGS e FISH. I pazienti arruolati erano 9 e l'ORR era pari all'89%. Essendo uno studio ancora in corso non è possibile definire la durata della risposta, ma al momento dell'approvazione tutti i pazienti responders avevano dimostrato una durata pari o superiore a 6 mesi. La tabella 15 riporta i risultati ottenuti con pralsetinib nei pazienti affetti da questo tipo di tumore.

Efficacy Parameters	GAVRETO N=9
Overall Response Rate (ORR)^a (95% CI)	89 (52, 100)
Complete Response, %	0
Partial Response, %	89
Duration of Response (DOR)	(N=8)
Median in months (95% CI)	NR (NE, NE)
Patients with DOR ≥ 6 months ^b , %	100

NR = Not Reached; NE = Not Estimable

^a Confirmed overall response rate assessed by BICR

^b Based on observed duration of response

Tabella 15. Risultati di pralsetinib in pazienti con cancro alla tiroide con fusione di RET positiva

Gavreto (pralsetinib) highlights of prescribing information. FDA.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/213721s005lbl.pdf

4.4. Selpercatinib

Sempre nel 2020, la FDA ha concesso l'approvazione accelerata per Retevmo™, un farmaco contenente il principio attivo *selpercatinib*, inibitore selettivo di RET. Selpercatinib è indicato per il trattamento di:

- pazienti adulti con NSCLC metastatico con fusione positiva di RET;
- pazienti adulti e pediatrici con un'età pari o maggiore a 12 anni con MTC con mutazione di RET che richiedono un trattamento sistemico;
- pazienti adulti e pediatrici con un'età pari o maggiore a 12 anni con cancro alla tiroide avanzato o metastatico con fusione positiva di RET che richiedono un trattamento sistemico o sono refrattari al trattamento con iodio radioattivo.

Selpercatinib è un inibitore multichinasico con elevata selettività per RET e per le isoforme mutate di esso a causa di fusioni e mutazioni a livello genico; valgono le stesse considerazioni del farmaco precedente.²² La struttura chimica di selpercatinib è riportata in figura 9.

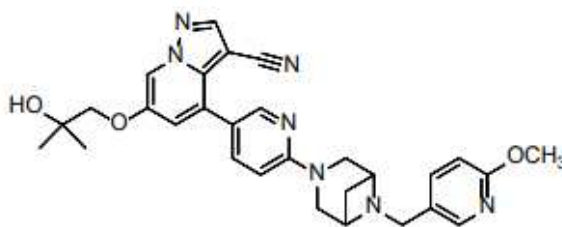


Figura 9. Selpercatinib.

Retevmo (selpercatinib) highlight of prescribing information.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/213246s002lbl.pdf

Pazienti con NSCLC metastatico con fusione positiva di RET

L'efficacia di selpercatinib è stata valutata nei pazienti con NSCLC metastatico con fusione positiva di RET arruolati nello studio clinico LIBRETTO-001 (NCT03157128), uno studio di fase I/II ancora in corso, multicentrico, in aperto, multicoorte. Lo studio ha arruolato in coorti separate pazienti progrediti dopo il trattamento chemioterapico a base di platino e pazienti che precedentemente non

hanno ricevuto alcun trattamento sistemico. Per identificare le fusioni a carico del gene RET si sono utilizzati NGS, FISH e PCR.

La dose somministrata in pazienti adulti era di 160 mg per via orale due volte al giorno, fino a tossicità accettabile o progressione della malattia.

I pazienti che hanno ricevuto un precedente trattamento a base di platino erano 105. L'ORR, riportato in tabella 16, è pari al 64% (95% CI), con una risposta completa dell'1,9% e una risposta parziale del 62%. La durata della risposta media in mesi è pari a 17.5 e i pazienti con una durata della risposta maggiore a 6 mesi sono l'81%.²²

	RETEVMO (n = 105)
Overall Response Rate¹ (95% CI)	64% (54%, 73%)
Complete response	1.9%
Partial response	62%
Duration of Response	
Median in months (95% CI)	17.5 (12, NE)
% with ≥6 months ²	81

¹ Confirmed overall response rate assessed by BICR.

² Based on observed duration of response

Tabella 16. Risultati nei pazienti con NSCLC precedentemente trattati.

Retevmo (selpercatinib) highlight of prescribing information.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/213246s002lbl.pdf

I pazienti che non hanno ricevuto alcun trattamento che sono stati arruolati nella coorte erano 39. L'ORR è pari a 85% (95% CI), ma la risposta è stata parziale per tutti i pazienti. La durata della risposta non è al momento stimabile e la percentuale di pazienti che hanno risposto al trattamento con selpercatinib con una durata della risposta maggiore o uguale a 6 mesi sono il 58%. I risultati sono riportati in tabella 17.²²

	RETEVMO (n =39)
Overall Response Rate¹ (95% CI)	85% (70%, 94%)
Complete response	0
Partial response	85%
Duration of Response	
Median in months (95% CI)	NE (12, NE)
% with ≥6 months ²	58

¹ Confirmed overall response rate assessed by BICR.

² Based on observed duration of response

NE = not estimable

Tabella 17. Risultati dei pazienti con NSCLC che non hanno ricevuto trattamenti precedenti.

Retevmo (selpercatinib) highlight of prescribing information.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/213246s002lbl.pdf

Pazienti con carcinoma midollare alla tiroide con mutazione di RET

L'efficacia di selpercatinib è stata valutata in pazienti affetti da MTC avanzato o metastatico con mutazione di RET nello studio clinico LIBRETTO-001. Anche in questo caso i pazienti sono stati divisi in due coorti: pazienti precedentemente trattati con cabozantinib o vandetanib e pazienti non trattati precedentemente. In tabella 18 sono stati riportati i risultati ottenuti nei pazienti precedentemente trattati, invece, in tabella 19 i risultati dei pazienti che non hanno ricevuto trattamenti in precedenza.

La mutazione di RET è stata rilevata mediante NGS e PCR.

I pazienti trattati con cabozantinib o vandetanib arruolati in questa coorte erano 55 e l'ORR è pari al 69% (95% CI). La risposta parziale era pari al 60% mentre quella completa il 9%. La durata della risposta media non è ancora definita in quanto si tratta di uno studio non completato, ancora in corso. I pazienti responders con una durata della risposta maggiore o uguale a 6 mesi sono il 76%.²²

	RETEVMO (n = 55)
Overall Response Rate¹ (95% CI)	69% (55%, 81%)
Complete response	9%
Partial response	60%
Duration of Response	
Median in months (95% CI)	NE (19.1, NE)
% with ≥6 months ²	76

¹ Confirmed overall response rate assessed by BICR.

² Based on observed duration of response

NE = not estimable

Tabella 18. Pazienti con MTC che hanno ricevuto un trattamento precedente.

Retevmo (selpercatinib) highlight of prescribing information.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/213246s002lbl.pdf

I pazienti che non hanno ricevuto alcun trattamento e che sono stati arruolati nella coorte erano 88. Il tasso di risposta globale è pari al 73% (95%CI), con una risposta completa nell'11% dei pazienti e parziale nel 61%. La durata della risposta media espressa in mesi è pari a 22. I pazienti responders con una DOR pari o maggiore di 6 mesi sono il 61%.

	RETEVMO (n = 88)
Overall Response Rate¹ (95% CI)	73% (62%, 82%)
Complete response	11%
Partial response	61%
Duration of Response	
Median in months (95% CI)	22.0 (NE, NE)
% with ≥6 months ²	61

¹ Confirmed overall response rate assessed by BICR.

² Based on observed duration of response

NE = not estimable

Tabella 19. Pazienti con MTC che non hanno ricevuto trattamenti in precedenza.

Retevmo (selpercatinib) highlight of prescribing information.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/213246s002lbl.pdf

Pazienti con cancro alla tiroide con fusione positiva di RET

L'efficacia di selpercatinib è stata valutata nello studio clinico LIBRETTO-001, citato in precedenza, in pazienti con cancro alla tiroide metastatico con fusione positiva di RET. I pazienti sono stati arruolati in due coorti separate: i pazienti che sono refrattari al trattamento con iodio radioattivo (RAI) ed erano naïve alla terapia sistemica e pazienti che sono refrattari alla RAI e avevano ricevuto un trattamento sistemico precedentemente. I pazienti arruolati erano 27: 19 quelli trattati precedentemente e 8 quelli che non hanno mai ricevuto trattamenti sistemici.²² la tabella 20 mostra a confronto i risultati ottenuti nelle due coorti.

	RETEVMO Previously Treated (n = 19)	RETEVMO Systemic Therapy Naïve (n = 8)
Overall Response Rate¹ (95% CI)	79% (54%, 94%)	100% (63%, 100%)
Complete response	5.3%	12.5%
Partial response	74%	88%
Duration of Response		
Median in months (95% CI)	18.4 (7.6, NE)	NE (NE, NE)
% with ≥6 months ²	87	75

¹ Confirmed overall response rate assessed by BICR.

² Based on observed duration of response

NE = not estimable

Tabella 20. Risultati nei pazienti con cancro alla tiroide precedentemente trattati e naïve.

Retevmo (selpercatinib) highlight of prescribing information.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/213246s002lbl.pdf

L'ORR osservata per la prima coorte è 79% (95% CI) con una risposta completa pari a 5,3% e una risposta parziale del 74%. Nella seconda coorte l'ORR è pari al 100% (95% CI) con una risposta completa del 12,5% e una risposta parziale

dell'88%. La DOR media nella prima coorte espressa in mesi è pari a 18,4 e i pazienti che hanno risposto con una durata maggiore o uguale a 6 mesi sono l'87%; nella seconda coorte non è ancora possibile stabilire una durata della risposta media, nel 75% dei pazienti si è osservata una durata della risposta pari o superiore a 6 mesi.²²

4.5. Diagnosi

La scelta del test da eseguire per rilevare le alterazioni del gene RET dipende da diversi fattori: il tipo di alterazione (fusione o mutazione), dalla quantità/qualità di tessuto disponibile e dal numero di potenziali alterazioni da sottoporre all'analisi in base al tipo di tumore.

L'ESMO ha pubblicato delle raccomandazioni sui metodi standard per rilevare le fusioni e mutazioni di RET nella pratica quotidiana e nella ricerca clinica.

L'IHC è un metodo di analisi in grado di rilevare le fusioni e le mutazioni di RET grazie all'uso di anticorpi diretti alla porzione C-terminale della proteina chimerica. Tuttavia, la rilevazione dell'espressione di RET viene riscontrata anche in lesioni benigne oltre che a lesioni di tipo tumorale, quindi viene sconsigliato l'uso di questa metodologia e si utilizzano test come FISH o test molecolari con maggiore affidabilità e accuratezza.

L'ibridazione fluorescente in situ (FISH) è lo standard attualmente utilizzato per l'identificazione delle fusioni RET perché presenta una buona sensibilità e specificità. Le sonde break-apart sono preferite rispetto alle sonde di fusione perché le fusioni di RET sono pericentriche o paracentriche e possono coinvolgere un numero elevato di geni partner. Tuttavia, si possono riscontrare difficoltà nell'interpretazione dei risultati che potrebbero richiedere ulteriori test per confermare la diagnosi.

La PCR viene utilizzata per rilevare le mutazioni puntiformi con una buona specificità e un buon limite di rilevamento. Per rilevare i trascritti di fusione del gene RET e identificare il gene partner è preferibile utilizzare la RT-PCR.

I test NGS basati sul DNA possono analizzare più geni contemporaneamente con un'elevata sensibilità nell'identificazione delle mutazioni somatiche con frequenze alleliche a bassa variazione o in campioni di tessuti con una bassa percentuale di

cellule tumorali. I pannelli NGS possono identificare anche fusioni geniche, se opportunamente progettati per l'analisi degli introni. Per avere un'analisi più accurata sugli introni si possono usare i test NGS basati sull'RNA perché permettono di analizzare grandi sequenze.²⁰

CAPITOLO V

MOLECULAR TUMOR BOARD

Uno dei cambiamenti che ha portato l'oncologia di precisione riguarda la diagnosi del tumore e la scelta del trattamento più indicato per il paziente. Si è vista necessaria la collaborazione di più figure professionali per permettere la personalizzazione della terapia, un team di lavoro multidisciplinare di specialisti che studiano assieme il singolo paziente a partire dalla diagnosi con l'esecuzione di un test di profilazione genomica, in cui identificare le alterazioni genetiche coinvolte nel tumore, fino alla scelta della terapia più indicata e al controllo di essa. Il *Molecular Tumor Board* (MTB) prevede la presenza di professionisti come il genetista, il patologo, il biologo, l'oncologo, il farmacologo, il radiologo, il chirurgo, il farmacista ospedaliero e il bioinformatico. Il MTB permette una corretta gestione del paziente ed ha come obiettivo principale la definizione delle specifiche strategie in materia di profilazione genomica e di interpretazione dei risultati ottenuti dalle analisi molecolari del tumore.²³ Questi team multidisciplinari hanno l'obiettivo di tradurre le nuove conoscenze scientifiche nella pratica clinica quotidiana.²⁴ La collaborazione di diversi specialisti permette una migliore integrazione delle conoscenze scientifiche di ognuno dei componenti del mtb al fine di garantire la corretta diagnosi e la terapia farmacologica più appropriata. Il MTB analizza il genoma del paziente andando ad identificare i target tumorali, ponendoli a confronto con banche dati condivise da altri mtb per scegliere il miglior trattamento che spesso è off-label. La scelta del trattamento si basa sulla probabilità di risposta di un paziente ad un farmaco già presente sul mercato ed utilizzato per indicazioni diverse ovvero disponibile in sperimentazione clinica, ponendo una particolare attenzione sull'etica, i principi deontologici e normativi.²³

Gli obiettivi del MTB riguardano anche la scelta del materiale appropriato per condurre l'analisi molecolare in relazione alle condizioni cliniche generali del paziente (tumore primitivo oppure recidiva/metastasi, campione istologico, citologico o biopsia liquida), alla metodica molecolare (multiplex o target) ed al pannello genico che andrebbero utilizzati e riguardano anche l'interpretazione dei

risultati ottenuti. Nella figura 10 viene rappresentato schematicamente il flusso di lavoro dall'arruolamento del paziente fino alla decisione clinica del trattamento idoneo.

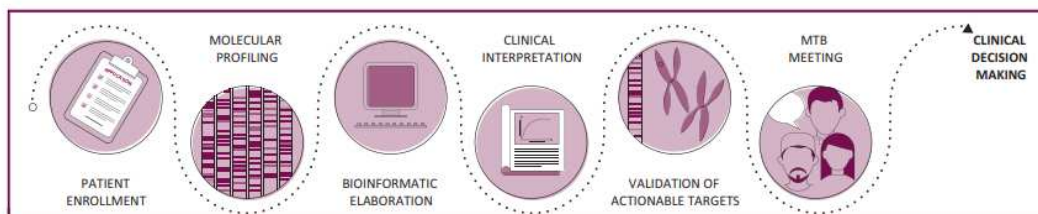


Figura 10. Flusso di lavoro del MTB per raggiungere la scelta del trattamento.

Danesi, R.; Fogli, S.; Indraccolo, S.; Del Re, M.; Dei Tos, A. P.; Leoncini, L.; Antonuzzo, L.; Bonanno, L.; Guarneri, V.; Pierini, A.; et al. Druggable targets meet oncogenic drivers: opportunities and limitations of target-based classification of tumors and the role of Molecular Tumor Boards. *ESMO Open* 2021, 6 (2), 100040. DOI: 10.1016/j.esmoop.2020.100040.

5.1. Componenti del MTB

Il MTB supporta il Servizio Sanitario Nazionale ed in particolare la Rete Oncologica Regionale in riferimento sia alla governance del sistema che sugli aspetti clinici, al fine di governare l'accesso ai nuovi approcci terapeutici mantenendo l'appropriatezza, promuovendo l'omogeneità nelle procedure e la sostenibilità economica basata sull'equilibrio costo/efficacia.

Le figure professionali che costituiscono il MTB collaborano tra loro sulla base delle proprie competenze in ambito scientifico e ognuna di loro ha un ruolo ben definito. Il clinico, che in base al tipo di tumore (solido oppure ematologico) può essere l'oncologo e/o l'ematologo, e gli altri specialisti, come il radioterapista e il chirurgo, selezioneranno il paziente idoneo alla discussione in sede di MTB, documentando l'assenza di terapie standard, valutando i rischi/benefici di una sperimentazione clinica proposta dal team e la sua compatibilità con terapie pregresse.

L'anatomo-patologo con competenze molecolari o affiancato dal biologo avrà il ruolo di diagnosticare le alterazioni molecolari, valutando e discutendo la rilevanza clinica. Inoltre, valuterà l'idoneità della metodologia utilizzata e se necessario

suggerirà quali test condurre in caso di materiale insufficiente. Il radiologo fornirà la valutazione dell'entità della malattia e della sua progressione, fornendo un'analisi comparativa dei dati di imaging e selezionerà le immagini rappresentative per facilitare la discussione multidisciplinare. Il genetista, con competenze in oncogenetica, valuterà i casi da sottoporre a test su DNA germinale, in base al risultato ne discuterà poi il ruolo e l'eventuale rischio di ereditarietà. Il farmacologo clinico valuterà la presenza di biomarcatori predittivi di sensibilità o di resistenza ai trattamenti, valuterà i trattamenti precedentemente somministrati al paziente, la congruenza del target (alterazioni molecolari) con il farmaco candidato, il rischio di eventuali reazioni avverse o di interazioni tra diversi farmaci assunti dal paziente. L'esperto di metodologia/componente del clinical trial center e l'esperto di bioinformatica analizzeranno i dati molecolari attraverso sistemi informatici integrati con database pubblici. Inoltre, dovranno ottenere i dati di sequenziamento e fornire informazioni sulle *pipelines bioinformatiche* utilizzate per le analisi dei campioni e sulla base di questo indirizzeranno i pazienti a trials clinici idonei. Il farmacista dovrà valutare la prescrivibilità e l'applicazione di leggi specifiche per l'accesso ed utilizzo dei farmaci off-label. L'infermiere di ricerca raccoglierà i dati dei pazienti (consensi, dati demografici, diagnostici, precedenti trattamenti e risposte) che verranno poi gestiti dal clinical trial center al fine di realizzare un database di informazioni accessibile agli specialisti coinvolti nella gestione del paziente oncologico, importanti anche per la valutazione delle decisioni del MTB sull'outcome.

Ci sono altre figure che compongono il MTB come il bioeticista, il rappresentante delle associazioni di pazienti, l'epidemiologo clinico, il segretario e il coordinatore. Il coordinatore gestisce gli aspetti operativi del MTB, si assicura che ogni decisione presa rispetti gli standard delle procedure operative, si interfaccia con il clinico e lo informerà delle decisioni del MTB fornendogli la documentazione riguardante la decisione e i dati utilizzati per arrivare ad essa. Il segretario gestisce le riunioni, condivide i materiali da discutere in sede di MTB e si occupa della stesura dei reports.²³

5.2. Selezione dei pazienti candidati alla valutazione del profilo molecolare da sottoporre al MTB

Tutti i tipi di tumore, indipendentemente dall'organo di origine, sono potenzialmente idonei per una discussione all'interno del MTB, ma quelli più frequentemente discussi sono i tumori rari, su cui si pone una particolare attenzione.

Secondo le raccomandazioni dell'Associazione Italiana dell'Oncologia Medica (AIOM) riguardanti il "Tumor Board Molecolare" pubblicate a novembre 2020, *i criteri proposti dal MTB per la selezione dei pazienti da sottoporre a valutazione si basa sull'analisi delle esperienze internazionali recentemente pubblicate*. I pazienti possono essere proposti solamente da Gruppi Multidisciplinari di Patologia.

I pazienti che possono essere proposti sono affetti da: neoplasie con alterazioni molecolari rare o per le quali non vi sono farmaci approvati in pratica clinica, neoplasie rare che non hanno approcci terapeutici riconosciuti oppure neoplasie "oncogene-addicted" non responsive ai farmaci disponibili.

Non vi è alcuna limitazione riguardante l'età, il tipo o la sede di origine del tumore.

Sono esclusi i pazienti per i quali è possibile l'accesso a terapie sulla base dei target molecolari identificati (ad eccezione dei pazienti resistenti a tali trattamenti), i pazienti con un'aspettativa di vita inferiore a sei mesi e i pazienti che presentano altre possibilità terapeutiche considerate efficaci, ad eccezione della presenza di alterazioni molecolari con evidenze emergenti che indicano resistenza ai trattamenti disponibili. Sono esclusi i pazienti in cui non è possibile ottenere un campione tumorale, prelevato mediante biopsia tissutale o biopsia liquida, adeguato all'indagine molecolare.

Se dall'indagine molecolare vengono identificate potenziali varianti patogenetiche germinali o alterazioni associate ad una possibile sindrome genetica, il MTB deve proporre la possibilità di effettuare un eventuale test genetico costituzionale, che in seguito potrebbe coinvolgere anche i familiari del paziente.²³

Il “documento di consenso sullo sviluppo e sull’organizzazione dell’oncologia mutazionale in Italia” è stato redatto da diverse Società Scientifiche ed Associazioni, tra cui l’Alleanza Contro il Cancro (ACC) e l’AIOM. Questo documento pone l’attenzione sui test di profilazione genomica disponibili in Italia, l’analisi dei dati e la condivisione di essi sulla piattaforma genomica condivisa, l’accesso a questi test e ai farmaci. Tratta anche l’impatto economico e la fase sperimentale di avvio.

L’accesso dei pazienti alle nuove terapie oncologiche comporta una serie di decisioni mediche che hanno un impatto diretto sull’omogeneità ed equità di accesso a questi trattamenti e indirettamente sull’efficacia di essi. La gestione di questo processo necessita di una conoscenza scientifica omogenea e una standardizzazione a livello nazionale. Non esiste un modello organizzativo unico nel nostro Paese che sia in grado di contrastare l’eterogeneità sanitaria locale e regionale data dalle diverse strutture oncologiche ed apparecchiature tecnologiche in dotazione. Secondo questo documento è necessario un nuovo modello organizzativo per l’integrazione dell’oncologia mutazionale nel Servizio Sanitario Nazionale, un modello che unisca le strutture oncologiche più avanzate e definisca gli standard operativi. I MTB sono un elemento centrale di questa organizzazione e hanno un approccio agnostico rispetto alla sede di origine del tumore a differenza dei Gruppi Oncologici Multidisciplinari (GOM) e Disease Management Team (DMT), che si occupano di specifiche patologie e non hanno competenze scientifiche adeguate alla gestione e interpretazione dei dati mutazionali. Una federazione dei MTB, GOM e DMT già esistenti e attivi sul territorio potrebbe essere la base per il nuovo modello organizzativo. In questa fase di transizione è importante che questi gruppi di specialisti regolamentino la modalità di accesso alla profilazione genomica escludendo le richieste di singoli specialisti o le richieste dirette dei pazienti, per evitare procedure invasive fortemente impattanti sulla qualità della vita del paziente e per evitare costi elevati alle strutture sanitarie. Secondo gli esperti e secondo le società scientifiche, ad oggi, non è ancora possibile indicare in modo univoco l’accesso alla profilazione genomica.²⁵

5.3. Scelta del campione biologico

Per una terapia oncologica personalizzata si deve iniziare da un'analisi molecolare che sia il più possibile accurata partendo da una elevata qualità e un'adeguata quantità di materiale genetico ottenuto dal prelievo di un campione tumorale di tipo citologico, biotico o operatorio. L'anatomo-patologo è la figura professionale con le competenze necessarie per fare una valutazione quali-quantitativa del campione ottenuto per verificare che esso sia rappresentativo della neoplasia andando a valutare l'eventuale presenza di necrosi tumorale, errori di campionamento o per verificare che non ci siano stati passaggi preanalitici che abbiano danneggiato il campione. La sua valutazione risulta fondamentale per la scelta della metodica corretta in base alla sensibilità della tecnologia molecolare utilizzata. La quantità totale delle cellule, da cui avviene l'estrazione degli acidi nucleici, presenti nel campione deve comunque essere superiore alla soglia minima richiesta dall'apparecchiatura utilizzata per l'analisi. La qualità del materiale riguarda, invece, la frazione delle cellule tumorali presenti nel campione affinché siano compatibili con il limite di rilevazione del dispositivo utilizzato.

Quando i campioni citologici/biotici non sono prelevabili o non sono disponibili per l'analisi, si può ricorrere alla biopsia liquida, una valida alternativa al campionamento tissutale che potrebbe acquisire grande importanza nel prossimo futuro perché permette di seguire l'evoluzione della neoplasia grazie alle numerose componenti cellulari e subcellulari. In questo modo si effettuerebbe l'analisi del DNA tumorale circolante che viene isolato dal sangue periferico (plasma). Sicuramente uno dei vantaggi riguarda la non invasività del prelievo, inoltre viene rappresentata in modo esaustivo l'eterogeneità molecolare del tumore.²³

5.4. Test di profilazione genomica

Le tecnologie di profilazione molecolare si dividono tra "singleplex", che sono in grado di analizzare specifici target (ad esempio la RealTime-PCR), oppure "multiplex" che sono in grado di analizzare differenti biomarcatori

contemporaneamente (ad esempio NGS). L'utilizzo della *Next Generation Sequencing* (NGS) permette l'utilizzo di ampi pannelli genici che sono preferibili rispetto ai pannelli genici ristretti per riscontrare un numero maggiore di alterazioni.²³ Tuttavia, questa metodologia presenta dei costi elevati e necessità di un campione di DNA di elevata qualità.¹

A livello nazionale si ottengono risultati non comparabili nei diversi laboratori a causa di molti fattori, tra cui il livello di validazione dei pannelli multigenici (sensibilità e specificità), il tipo di campione analizzato, il tipo di tecnologia o la piattaforma di sequenza utilizzate, l'approccioagnostico o dedicato, il numero di geni e il numero di fusioni geniche analizzate, il tipo di pipeline informatica utilizzata. Per evitare la produzione di dati non confrontabili e la disparità di accuratezza diagnostica è possibile ipotizzare una serie di interventi che portino all'implementazione di una Piattaforma Genomica Nazionale condivisa che permetta una corretta profilazione e una raccolta di dati omogenei e analizzabili dei pazienti oncologici. Sarà dunque necessario sviluppare dei criteri minimi e comuni per l'utilizzo dei pannelli genici. Come riportato nel "documento di consenso sullo sviluppo e sull'organizzazione dell'oncologia mutazionale in Italia", ciascun laboratorio dovrebbe dotarsi di almeno due pannelli "*pan-cancer*" standard per i tumori solidi e per quelli ematopoietici, ciascuno di essi dovrebbe garantire l'analisi dei geni per i quali vi sono evidenze cliniche sull'efficacia terapeutica di un trattamento mirato. I MTB dovranno aggiornare periodicamente l'elenco delle alterazioni sulla base dei progressi della ricerca. È opportuno quindi che i pannelli adottati includano tutte le regioni genomiche individuate dal MTB come essenziali sulla base dei criteri ESCAT. I pannelli e le tecnologie utilizzate devono essere conformi alle normative europee vigenti e garantire il risultato delle analisi in breve tempo (entro 10 giorni dall'arrivo del campione), oltre ad essere validati in termini di specificità e sensibilità rispetto alle mutazioni azionabili che si ripetono frequentemente. Inoltre, ciascun laboratorio dovrebbe poter eseguire analisi dell'intero genoma (WES, WGS) per specifici tumori. Lo sviluppo di criteri minimi e comuni permetterà di individuare i centri appropriati per la profilazione genomica dei pazienti, andando così a creare un network di laboratori accreditati come base su cui fondare la Piattaforma Genomica Nazionale condivisa.²⁵

5.5. Classificazione delle mutazioni ESCAT

L'ESMO ha proposto una scala di *actionability* dei bersagli molecolari su diversi livelli in base all'evidenza clinica chiamata ESCAT (ESMO Scale of Clinical Actionability for molecular Targets). Questa classificazione fornisce un quadro sistematico per classificare i bersagli molecolari e permette di armonizzare il linguaggio scientifico per aiutare gli specialisti nella corretta interpretazione delle alterazioni molecolari, facilitando così il passaggio di informazioni tra i diversi MTB, tra il mondo accademico, tra gli operatori sanitari ma anche per i pazienti. L'obiettivo principale è quello di aiutare gli oncologi a stabilire le diverse priorità dei potenziali bersagli terapeutici. Un'alterazione molecolare, sulla base delle evidenze cliniche, può essere supportata da diversi livelli in diversi tipi di cancro e può quindi rientrare in diverse classi di utilità clinica a seconda della malattia. Il sistema di classificazione si basa su diversi livelli:

- I. Target adatto per l'uso di routine e quando è rilevata una specifica alterazione molecolare si deve raccomandare un farmaco specifico. Il livello I si divide in I-A, I-B e I-C in base ai dati di supporto degli studi clinici. Il farmaco somministrato ha portato ad un miglioramento dell'esito clinico, pertanto, l'accesso al trattamento dovrebbe essere considerato standard nella pratica clinica.
 - I-A) Studi clinici prospettici randomizzati dimostrano un miglioramento clinicamente significativo dell'endpoint di sopravvivenza quando c'è la correlazione alterazione-farmaco in uno specifico tipo di tumore.
 - I-B) Studi clinici prospettici non randomizzati mostrano che la correlazione alterazione-farmaco in uno specifico tipo di tumore determina un beneficio clinicamente significativo simile tra i diversi tipi di tumore.
 - I-C) Studi clinici in diversi tipi di tumore o basket trials mostrano benefici clinici associati alla corrispondenza alterazione-farmaco. Ad esempio, larotrectinib e pembrolizumab hanno mostrato un'attività antitumorale nei tumori con fusione dei geni TRK e carenti di MMR, rispettivamente, indipendentemente dall'istologia del tumore.

- II. Target investigativi che probabilmente definiscono una popolazione di pazienti che beneficia di un farmaco mirato, ma sono necessari dati aggiuntivi. La correlazione alterazione-farmaco è associata all'attività antitumorale ma risulta sconosciuta l'entità del beneficio, è probabile che una popolazione di pazienti che riscontra la stessa alterazione molecolare abbia un beneficio clinico in un determinato tipo di tumore a seguito della somministrazione di un farmaco, ma sono necessari ulteriori dati.
- II-A) Studi clinici retrospettivi dimostrano che i pazienti che presentano un'alterazione molecolare specifica in uno specifico tipo di tumore sperimentano un beneficio clinicamente significativo con un farmaco mirato rispetto a pazienti con alterazione negativa.
- II-B) Studi clinici prospettici dimostrano tassi di risposta tumorale maggiori in pazienti con un'alterazione specifica trattati con un farmaco mirato ma non sono attualmente disponibili i dati sul miglioramento degli endpoints di sopravvivenza.
- III. Il beneficio clinico è stato precedentemente dimostrato in altri tipi di tumore o per bersagli molecolari correlati. L'efficacia del trattamento con il farmaco è prevista ma non dimostrata.
- III-A) Il beneficio clinico è stato dimostrato in pazienti con un'alterazione specifica ma in un diverso tipo di tumore. C'è una limitata oppure un'assenza di evidenze cliniche disponibili per il tipo di cancro in esame o in generale per tutti i tipi di cancro.
- III-B) Un'alterazione che ha un impatto funzionale previsto simile ad un'anomalia di livello I già studiata nello stesso gene o in un gene con una simile funzione ma i dati clinici di supporto non sono sufficienti.
- IV. Esiste un'evidenza preclinica di attuabilità. L'actionability è prevista sulla base di studi preclinici, il trattamento dovrebbe riguardare solo studi clinici. Il paziente deve essere informato sulla mancanza di dati clinici, come la sicurezza e l'efficacia, dei potenziali rischi e sulle opzioni terapeutiche alternative.
- IV-A) L'alterazione influenza la sensibilità ai farmaci *in vitro* o *in vivo* di modelli preclinici.
- IV-B) L'attuabilità è prevista *in silico*.

- V. Evidenza di attività antitumorale che non determina un beneficio clinico significativo come trattamento singolo ma supporta lo sviluppo di terapie combinate. La corrispondenza alterazione-farmaco è associata ad una risposta obiettiva ma senza un beneficio clinicamente significativo ed è dimostrato da studi di tipo prospettico. Il farmaco è attivo ma non migliora la PFS (Progression Free Survival) o OS (Overall Survival). Potrebbero essere presi in considerazione degli studi clinici per valutare la combinazione di farmaci.
- X. Mancanza di prove per l'actionability, non ci sono evidenze cliniche o precliniche che l'alterazione genomica sia un potenziale bersaglio terapeutico, pertanto, il risultato non deve essere preso in considerazione per la decisione clinica.

La scala ESCAT utilizza le evidenze degli studi clinici per assegnare i livelli, perciò alcuni obiettivi si sposteranno di livello all'aumentare della disponibilità di dati.²⁶

5.6. Trattamento dei dati e coinvolgimento dei pazienti

Ai pazienti verrà fornito un consenso informato accompagnato da una modulistica contenente la descrizione del test (scopo e modalità di esecuzione), il significato dei risultati del test compresi i falsi positivi o falsi negativi, la possibilità di usare i dati nella ricerca scientifica, la garanzia per la protezione dei dati personali, la possibilità che il test implichi rischi di natura ereditaria, il destino del campione concluso l'esame molecolare e una dichiarazione che il paziente ha compreso e acconsentito allo svolgimento della procedura che è stata discussa con il personale sanitario.

Il referto contiene i dati anagrafici del paziente, il reparto o servizio di provenienza, la data di arrivo del campione e la data di refertazione, il tipo di campione analizzato e il nome del medico che ha richiesto l'analisi molecolare per conto del gruppo multidisciplinare. Riporta poi le principali caratteristiche del campione, le informazioni riguardanti i biomarcatori analizzati (stato mutazionale) con commenti specifici.

Per la selezione dei pazienti deve essere garantita la trascrizione in appositi registri di tutti i dati clinici, molecolari, delle scelte terapeutiche ed esiti delle eventuali

terapie somministrate.²³ La piattaforma Nazionale condivisa proposta dal documento citato in precedenza, non dovrà sostituire i sistemi informatici già disponibili ma dovrà affiancarsi alle piattaforme locali e creare un sistema di condivisione dei dati genomici.²⁵

I MTB dovrebbero essere pianificati in base alla numerosità della popolazione e dell'organizzazione della Rete Oncologica Regionale. Il MTB riceve la richiesta a discutere il caso del paziente, che se ritenuto idoneo, verrà sottoposto all'analisi molecolare e all'avvio dell'intero iter. Un aspetto fondamentale per il corretto funzionamento del MTB è rappresentato dal tempo di risposta ai vari quesiti specifici, in quanto dovrebbe garantire l'inizio della terapia mirata in un intervallo temporale utile e coerente con l'aspettativa di vita del paziente. Si dovrebbero abbreviare al massimo i tempi di refertazione molecolare, di discussione multidisciplinare e di consegna delle valutazioni effettuate. La medicina di precisione richiede degli standard elevati, pertanto, è importante monitorare costantemente i tempi in ogni fase.²³

CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo elaborato è di fornire una visione di tipo globale sulla terapia agnostica, descrivendo i biomarcatori e i farmaci fino ad ora approvati. La ricerca medica, soprattutto quella oncologica, si sta evolvendo velocemente. Lo scambio di informazioni a livello globale, porta ad un continuo aggiornamento sulle scoperte in campo oncologico e permette lo studio di nuovi approcci nella lotta contro il cancro.

La terapia agnostica è un'evoluzione della classica terapia tumorale, essa pone le basi per le strategie terapeutiche del futuro, in cui il paziente ha un ruolo di tipo centrale. L'approccio di tipo agnostico sostituisce il classico approccio istologico, mirando ad una terapia personalizzata sulla base delle caratteristiche del paziente, evitando terapie non efficaci con conseguenti effetti avversi ai non responders. Questo perché partendo dai test di profilazione genomica che identificano le alterazioni genetiche responsabili del tumore, come ad esempio le fusioni del gene NTRK e del gene RET, il deficit di riparazione del mismatch repair (dMMR), l'alta instabilità dei microsatelliti (MSI) e l'elevata carica mutazionale (TMB), si arriva poi alla scelta terapeutica idonea per il paziente con discussione da parte del Molecular Tumor Board (MTB). I risultati ottenuti dalla caratterizzazione genomica del cancro vengono confrontati con le banche dati nazionali per ottenere le informazioni necessarie per una corretta diagnosi e successivo approccio terapeutico.

I farmaci approvati con indicazione agnostica sono in continuo studio e potrebbero in futuro ottenere ulteriori indicazioni terapeutiche in base al beneficio riscontrato nei pazienti, come è successo per pembrolizumab che ha ottenuto prima l'approvazione per i tumori con dMMR/MSI e, successivamente, a distanza di pochi anni, ha raggiunto la seconda approvazione agnostica per i tumori con TMB.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

(1) Fanale, D.; Corsini, L. R.; Scalia, R.; Brando, C.; Cucinella, A.; Madonia, G.; Dimino, A.; Filorizzo, C.; Barraco, N.; Bono, M.; et al. Can the tumor-agnostic evaluation of MSI/MMR status be the common denominator for the immunotherapy treatment of patients with several solid tumors? *Crit Rev Oncol Hematol* **2022**, *170*, 103597. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2022.103597.

(2) *Immuno-oncologia. Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM)*. https://www.medinews.it/bin/Immuno-oncologia_la_nuova_arma_per_gombattere_i_tumori.pdf

(3) *Raccomandazioni farmaci agnostici 2020. AIOM*. https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2020/09/2020_RaccFarmaciAgnostici.pdf

(4) *Immune checkpoint inhibitors and their side effects. American Cancer Society*. <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy/immune-checkpoint-inhibitors.html>

(5) Luchini, C.; Bibeau, F.; Ligtenberg, M. J. L.; Singh, N.; Nottegar, A.; Bosse, T.; Miller, R.; Riaz, N.; Douillard, J. Y.; Andre, F.; et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol* **2019**, *30* (8), 1232-1243. DOI: 10.1093/annonc/mdz116.

(6) *Keytruda. European Medicines Agency (EMA)*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/keytruda>

(7) *Keytruda (pembrolizumab) highlights of prescribing information. FDA*. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/125514s121s1221bl.pdf

(8) Seligson, N. D.; Knepper, T. C.; Ragg, S.; Walko, C. M. Developing Drugs for Tissue-Agnostic Indications: A Paradigm Shift in Leveraging Cancer Biology for Precision Medicine. *Clin Pharmacol Ther* **2021**, *109* (2), 334-342. DOI: 10.1002/cpt.1946.

(9) *Opdivo (nivolumab) highlights of prescribing information. FDA*. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/125554s0631bl.pdf

(10) Chan, T. A.; Yarchoan, M.; Jaffee, E.; Swanton, C.; Quezada, S. A.; Stenzinger, A.; Peters, S. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol* **2019**, *30* (1), 44-56. DOI: 10.1093/annonc/mdy495.

- (11) Subbiah, V.; Solit, D. B.; Chan, T. A.; Kurzrock, R. The FDA approval of pembrolizumab for adult and pediatric patients with tumor mutational burden (TMB) ≥ 10 : a decision centered on empowering patients and their physicians. *Ann Oncol* **2020**, *31* (9), 1115-1118. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.07.002.
- (12) Jiang, T.; Wang, G.; Liu, Y.; Feng, L.; Wang, M.; Liu, J.; Chen, Y.; Ouyang, L. Development of small-molecule tropomyosin receptor kinase (TRK) inhibitors for. *Acta Pharm Sin B* **2021**, *11* (2), 355-372. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.05.004.
- (13) *Vitrakvi (larotrectinib) highlight of prescribing information. FDA.* https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/210861s006lbl.pdf
- (14) Lavacchi, D.; Roviello, G.; D'Angelo, A. Tumor-Agnostic Treatment for Cancer: When How is Better than Where. *Clin Drug Investig* **2020**, *40* (6), 519-527. DOI: 10.1007/s40261-020-00915-5.
- (15) Hong, D. S.; DuBois, S. G.; Kummar, S.; Farago, A. F.; Albert, C. M.; Rohrberg, K. S.; van Tilburg, C. M.; Nagasubramanian, R.; Berlin, J. D.; Federman, N.; et al. Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. *Lancet Oncol* **2020**, *21* (4), 531-540. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30856-3.
- (16) *Rozlytrek (entrectinib) highlights of prescribing information. FDA.* https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/212725s005lbl.pdf
- (17) Weiss, L. M.; Funari, V. A. NTRK fusions and Trk proteins: what are they and how to test for them. *Hum Pathol* **2021**, *112*, 59-69. DOI: 10.1016/j.humpath.2021.03.007.
- (18) Thein, K. Z.; Velcheti, V.; Mooers, B. H. M.; Wu, J.; Subbiah, V. Precision therapy for RET-altered cancers with RET inhibitors. *Trends Cancer* **2021**, *7* (12), 1074-1088. DOI: 10.1016/j.trecan.2021.07.003.
- (19) Li, A. Y.; McCusker, M. G.; Russo, A.; Scilla, K. A.; Gittens, A.; Arensmeyer, K.; Mehra, R.; Adamo, V.; Rolfo, C. RET fusions in solid tumors. *Cancer Treat Rev* **2019**, *81*, 101911. DOI: 10.1016/j.ctrv.2019.101911.
- (20) Belli, C.; Penault-Llorca, F.; Ladanyi, M.; Normanno, N.; Scoazec, J. Y.; Lacroix, L.; Reis-Filho, J. S.; Subbiah, V.; Gainor, J. F.; Endris, V.; et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect RET fusions and mutations in daily practice and clinical research. *Ann Oncol* **2021**, *32* (3), 337-350. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.11.021.
- (21) *Gavreto (pralsetinib) highlights of prescribing information. FDA.* https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/213721s005lbl.pdf

(22) *Retevmo (selpercatinib) highlights of prescribing information. FDA.*
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/213246s002lbl.pdf

(23) *Raccomandazioni AIOM "Tumor Board Molecolare". Edizione novembre 2020.*
https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2020/11/2020_RaccTumorBoardMolecolare.pdf

(24) Danesi, R.; Fogli, S.; Indraccolo, S.; Del Re, M.; Dei Tos, A. P.; Leoncini, L.; Antonuzzo, L.; Bonanno, L.; Guarneri, V.; Pierini, A.; et al. Druggable targets meet oncogenic drivers: opportunities and limitations of target-based classification of tumors and the role of Molecular Tumor Boards. *ESMO Open* **2021**, *6* (2), 100040. DOI: 10.1016/j.esmoop.2020.100040.

(25) *Documento di consenso sullo sviluppo e sull'organizzazione dell'oncologia mutazionale in italia.* <https://oncoinfo.it/sviluppo-e-organizzazione-della-oncologia-mutazionale-in-italia/>

(26) Mateo, J.; Chakravarty, D.; Dienstmann, R.; Jezdic, S.; Gonzalez-Perez, A.; Lopez-Bigas, N.; Ng, C. K. Y.; Bedard, P. L.; Tortora, G.; Douillard, J. Y.; et al. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Ann Oncol* **2018**, *29* (9), 1895-1902. DOI: 10.1093/annonc/mdy263.